

Université de Montréal

Rôle du ribosome dans la sénescence

par

Neylen Del Toro Del Toro

Département de Biochimie et Médecine Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor

(PhD)

en Biochimie

Décembre, 2019

© Neylen Del Toro Del Toro, 2019

Université de Montréal
Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée

Rôle du ribosome dans la sénescence

Présentée par

Neylen del Toro del Toro

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Luc Desgroseillers

Président-rapporteur

Gerardo Ferbeyre

Directeur de recherche

Léa Brakier-Gingras

Co-directeur

Éric Lécuyer

Membre du jury

François Dragon

Examineur externe

Résumé

La sénescence est considérée comme un mécanisme de suppression tumorale puisque les cellules potentiellement dangereuses, activent leurs protéines de sauvegarde pour arrêter leur prolifération. Les protéines de sauvegarde telles que RB et p53 sont activées suite à différents stress comme des dommages à l'ADN, le raccourcissement des télomères ou l'induction oncogénique. Les cellules sénescents restent métaboliquement actives, subissent des modifications dans leur expression génique, et sécrètent des cytokines et des chimiokines qui ont des effets paracrines pro-oncogéniques, mais peuvent également contribuer à la stabilité de l'arrêt du cycle cellulaire dans la sénescence de façon autocrine. Une des particularités du phénotype sénescents est la dégradation sélective des protéines dépendante de l'ubiquitination et du protéasome. Parmi les cibles de dégradation se trouvent des protéines impliquées dans la biogenèse du ribosome, ainsi que celles d'autres voies cellulaires requises pour la croissance de cellules cancéreuses. Ceci est lié à un stress nucléolaire qui affecte la biogenèse du ribosome, menant à l'accumulation, dans le nucléoplasme ou le nucléole, de protéines ribosomiques. Ce comportement suggère que les ribosomes des cellules sénescents seraient structurellement différents. Par conséquent, ceci pourrait entraîner des effets sur leurs capacités à réguler l'initiation, l'élongation et/ou la terminaison de la traduction des ARN messagers (ARNm). Par ailleurs, la déplétion de certaines protéines impliquées dans la ribogenèse, ainsi que la surexpression de protéines ribosomiques telles que RPS14/uS11 amènent à la sénescence.

Malgré le stress nucléolaire et les défauts de ribogenèse associés à la sénescence, les cellules sénescents présentent des niveaux de translecture du codon d'arrêt très diminué, suggérant l'existence de défauts de production de protéines allongées en C-terminal.

Nous émettons l'hypothèse que les défauts de la ribogenèse affecteraient la fonction des protéines ribosomiques et des ribosomes. Cette perturbation aurait un impact sur le rôle de suppresseur tumoral de la sénescence.

Le premier objectif de cette thèse consiste à démontrer le rôle de RPL22/eL22 en tant que régulateur du cycle cellulaire et inducteur de la sénescence. Le deuxième but est de démontrer que, malgré la perturbation nucléolaire, les ribosomes des fibroblastes sénescents reconnaissent les codons d'arrêt de façon plus efficace que les ribosomes des cellules transformées, ou des cellules normales en prolifération.

Nous avons démontré que le phénotype de sénescence peut être induit quand l'expression de RPL22/eL22 est augmentée. RPL22/eL22 s'accumule principalement dans le nucléole, de manière différente de RPS14/uS11, dont l'accumulation est nucléoplasmique. En effectuant des essais kinases *in vitro*, nous avons montré que RPL22/eL22, tout comme RPS14/uS11, peuvent interagir et inhiber le complexe CDK4-Cycline D1 afin d'activer la voie de RB et établir l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence.

Afin de démontrer la fidélité de la terminaison de la traduction dans les cellules sénescents, nous avons utilisé un système de rapporteurs de luciférase, pour détecter les erreurs de translecture ainsi que pour avoir un contrôle interne du système. L'inactivation de la voie du suppresseur tumoral RB par surexpression de CDK4 ou de l'oncoprotéine virale E7, nous a permis d'observer l'augmentation de la translecture dans les cellules sénescents. Tandis que l'activation de la voie de suppression tumorale RB, à l'aide du suppresseur de tumeur PML, de la surexpression de RPL22/eL22 et de RPS14/uS11, ainsi que de l'utilisation de Palbociclib (PD-0332991), un inhibiteur des kinases CDK4/6, a montré une réduction des erreurs de translecture.

Ces résultats indiquent une nouvelle fonction des protéines du ribosome en tant que suppresseurs de tumeur, permettant d'inhiber les erreurs de translecture du codon d'arrêt de façon dépendante de la voie de RB. Ces travaux suggèrent que de petites molécules ou peptides pourraient simuler les fonctions inhibitrices de ces protéines ribosomiques afin de traiter certains cancers où la voie de RB est activable.

Mots-clés: Sénescence, biogenèse du ribosome, RPL22/eL22, CDK4-Cycline D1, translecture, terminaison de la traduction, suppresseur tumoral rétinoblastome (RB), rapporteur à deux luciférase.

Abstract

Senescence is considered a mechanism for tumor suppression since potentially dangerous cells activate their protective proteins to stop their proliferation. Safeguard proteins such as RB and p53 are activated as a result of stress such as DNA damage, telomere shortening or oncogenic induction. Senescent cells are metabolically active, they undergo changes in their gene expression and secrete cytokines and chemokines with pro-oncogenic paracrine effects, but which can also contribute to the stability of the senescent cell cycle arrest in an autocrine way. One of the peculiarities of the senescent phenotype is the selective ubiquitination and proteasome dependent-degradation of proteins involved in ribosome biogenesis and other cellular pathways required for cancer cell growth, leading to the accumulation, in the nucleoplasm or nucleolus, of ribosomal proteins. This behavior suggests that the ribosomes of senescent cells are structurally different. Therefore, this could have effects on their ability to regulate the initiation, elongation and/or translation termination of messenger RNAs (mRNAs). Moreover, the depletion of some proteins involved in ribogenesis, as well as the overexpression of ribosomal proteins such as RPS14/uS11 lead to senescence.

Despite nucleolar stress and ribogenesis defects associated to senescence, global translation does not seem to be affected in senescence. Strikingly, senescent cells have reduced translational readthrough suggesting that they have defects in the production of C-terminal extended proteins.

We hypothesize that defects in ribogenesis would affect the function of ribosomal proteins and ribosomes influencing the tumor suppressor role of senescence. The first aim of this thesis is to demonstrate the role of RPL22/eL22 as a regulator of the cell cycle and senescence inducer. The second aim of this thesis is to demonstrate that, despite the nucleolar disruption, the

ribosomes of senescent fibroblasts recognize stop codons more efficiently than ribosomes from transformed cells, but also than ribosomes from proliferating normal cells.

We found that the senescent phenotype can be induced by enhancing the expression of RPL22/eL22. RPL22/eL22 accumulates mainly in the nucleolus, unlike RPS14/uS11, whose accumulation is nucleoplasmic. By performing an *in vitro* kinase assay, we showed that RPL22/eL22, just like RPS14/uS11, can interact and inhibit the CDK4-Cyclin D1 complex in order to activate the RB pathway and establish cellular arrest and senescence.

To assess translation termination accuracy in senescent cells, we used a system of luciferase reporters to measure the fidelity of translation termination. Inactivation of the RB tumor suppressor pathway using CDK4 or the viral oncoprotein E7 also increased readthrough in senescent cells while overexpression of PML, a tumor suppressor that activates the RB pathway, overexpression of RPL22/eL22 and RPS14/uS11, as well as the use of Palbociclib (PD-0332991), a CDK4/6 inhibitor, reduce readthrough errors.

These results indicate a novel function of ribosomal proteins as tumor suppressors, making it possible to inhibit translational readthrough errors, in a RB-dependent pathway. This work suggests that small molecules or peptides could mimic the inhibitory functions of these ribosomal proteins in order to treat cancers where the RB pathway is activatable.

Keywords: Senescence, ribosome biogenesis, RPL22/eL22, CDK4-Cyclin D1, readthrough, translation termination, retinoblastoma tumor suppressor (RB), dual-luciferase reporter.

Table de matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table de matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des Figures	ix
Liste d'abréviations	xi
1. Introduction	1
1.1. Les suppresseurs de tumeurs.....	2
1.1.1. TP53	3
1.1.2. RB (protéine du rétinoblastome), p107, p130.....	3
1.1.3. PML (Protéine de leucémie promyélocytaire).....	4
1.2. La sénescence comme mécanisme de suppression tumorale.....	5
1.2.1. Dégradation protéique associée à la sénescence (SAPD).....	8
1.2.2. Le ribosome et la perturbation nucléolaire dans la sénescence	9
1.2.3. Protéines ribosomiques en tant que suppresseurs de tumeurs	14
1.3. Quelques données sur le fonctionnement du ribosome eucaryote.....	18
1.3.1. Initiation de la traduction	19
1.3.2. Élongation de la traduction	21
1.3.3. Terminaison de la traduction et recyclage	23
1.4. Erreurs de traduction.....	25
1.4.1. La translecture du codon d'arrêt	27
1.4.2. La translecture du codon d'arrêt et le cancer	29
1.5. Problématique et objectifs de la thèse.....	31

1.5.1. Un rôle extra-ribosomique de RPL22/eL22 en tant que suppresseur tumoral.....	31
1.5.2. Diminution de la translecture du codon d'arrêt dans la sénescence	31
2. RPL22/eL22 en tant que suppresseur tumoral	33
2.1. Mise en contexte de l'article 1	33
2.2. Contribution à l'article 1	34
2.3. Article 1	35
2.3.1. Summary.....	36
2.3.2. Introduction.....	37
2.3.3. Materials and Methods.....	38
2.3.4. Results.....	43
2.3.5. Discussion.....	52
2.3.6. Acknowledgments.....	53
2.3.7. Supplementary material	54
3. La sénescence diminue les erreurs de translecture du ribosome.....	73
3.1. Mise en contexte de l'article 2	73
3.2. Contribution à l'article 2	74
3.3. Article 2	75
3.2.1. Summary.....	76
3.2.2. Introduction.....	77
3.3.3. Materials and Methods.....	78
3.3.4. Results.....	83
3.3.5. Discussion.....	96
3.3.6. Acknowledgements.....	99
3.2.7. Supplementary material	100
4. Discussion générale	110

4.1. RPL22/eL22, nouveau régulateur de la voie de RB	112
4.1.1. Rôle nucléolaire de RPL22/eL22.....	113
4.1.2. Implication de RPL22/eL22 dans le SASP.....	114
4.2. Diminution de la translecture du codon d'arrêt dans la sénescence.	115
4.2.1. Protéines endogènes allongées en C-terminal.....	116
4.2.3. Modifications post-transcriptionnelles.....	117
4.2.4. RPS14/uS11 et RPL22/eL22 en tant qu'inhibiteurs des erreurs de la translecture.....	119
4.2.5. L'autophagie pourrait contribuer à une meilleure efficacité de terminaison de la traduction	119
5. Conclusion	121
6. Bibliographie	124

Liste des tableaux

Tableau 1. SAPD des protéines nucléolaires compromises dans la biogénèse des ribosomes *	11
Tableau 2. Facteurs de traduction	18
Table S1. Sequence of shRNAs, QPCR primers and PCR cloning primers	59
Table S2. Statistics source data for QPCR, growth curves, SA-β-gal and IF.....	59
Table S3. Less stringent analysis of CDK4(K35M) interactome in RSL1D1 knockdown-induced senescence	60
Table S3. PCR cloning primers.....	105
Table S4. Readthrough region	106
Table S5. Readthrough candidates	106

Liste des Figures

Figure 1. Réponse aux dommages à l'ADN.....	6
Figure 2. Facteurs inducteurs de la sénescence	8
Figure 3. Structure des snoRNA à boîtes H/ACA et C/D	10
Figure 4. Caractéristiques des cellules sénescents	13
Figure 5. Stabilisation de p53 via des protéines du ribosome	15
Figure 6. Initiation de la traduction eucaryote.....	20
Figure 7. Élongation de la traduction eucaryote	22
Figure 8. Bases conservées de l'ARNr 18S chez l'humain.....	23
Figure 9. Terminaison de la traduction et recyclage.....	25
Figure 10. RPL22/eL22 can interact with CDK4 and/or cyclin D1	44
Figure 11. RPL22/eL22 regulates senescence in normal human diploid fibroblasts and decreases proliferation of p53-null PC3 cells.....	47
Figure 12. E6 or E7 can bypass RPL22/eL22-induced senescence	49
Figure 13. RPL22/eL22 directly binds and inhibits CDK4-cyclin D1 complex.....	51
Figure S1. RPL22/eL22 induces senescence but without strong induction of PML foci, DNA damage foci or SASP.....	54
Figure S2. RPL22/eL22 depletion decreases proliferation of p53-WT IMR-90 and p53-null PC3 cells	55
Figure S3. Unprocessed blots of Figure 10C-D, F and 11C.....	56
Figure S4. Unprocessed blots of Figure 11F and 12C-D.....	57
Figure S5. Unprocessed blots of Figure 13A-B and Supplementary Figure S1A, S2B, D....	58
Figure 14. Readthrough is reduced in OIS	85

Figure 15. Gentamicin-dependent translation errors are reduced in OIS and PML-induced senescence.....	88
Figure 16. Bypassed-OIS shows increased readthrough	90
Figure 17. RB pathway disruption affects the efficiency of readthrough	92
Figure 18. Palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, contributes to readthrough reduction.....	94
Figure 19. Ribosomal proteins RPS14/uS11 and RPL22/eL22 limit readthrough.....	96
Figure S6. Readthrough is reduced in OIS	100
Figure S7. Senescent cells are resistant to gentamicin-induced readthrough	101
Figure S8. RB pathway disruption affects the efficiency of readthrough.....	103
Figure S9. E2Fs target genes	105
Figure 20. Modèle proposé lors du rôle nucléolaire de RPL22/eL22	114
Figure 21. Modèle proposé pour le rôle régulateur de RPL22/eL22 dans le cycle cellulaire	115

Liste d'abréviations

ABCE1	<i>ATP-binding cassette sub-family E member 1</i>
ADN	<i>Acide désoxyribonucléique</i>
ADNc	<i>ADN complémentaire</i>
AKT	<i>Ak strain transforming</i>
AMV	<i>Avian Myeloblastosis Virus</i>
APC	<i>Anaphase-promoting complex</i>
AQP4	<i>Aquaporin 4</i>
ARF (p19ARF)	<i>Alternative reading frame protein</i>
ARN	<i>Acide ribonucléique</i>
ARNm	<i>ARN messenger</i>
ARNr	<i>ARN ribosomique</i>
ARN pol I	<i>ARN polymérase I</i>
ARN pol III	<i>ARN polymérase III</i>
ARNt	<i>ARN de transfert</i>
ASPH	<i>Aspartate β-hydroxylase</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ADP	<i>Adenosine diphosphate</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>

BAX	<i>BCL-2 Associated X</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1/2	<i>Breast cancer 1 or 2</i>
BrdU	<i>Bromodeoxyuridine</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCDC86	<i>Coiled-coil domain containing 86</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CDKN1A (p21)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN2A (p16)	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN1B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDS	<i>Coding DNA sequence</i>
CENPA	<i>Centromere protein A</i>
CHK1/2 (CHEK1/2)	<i>Checkpoint kinase 1 or 2</i>
CHX	<i>Cycloheximide</i>
CIP1	<i>Cdk interacting protein 1</i>
CK2 α	<i>Casein kinase 2α</i>
CM	<i>Conditioned medium</i>
CS3	<i>Coli surface antigen 3</i>

CXCL5	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole xvi</i>
DBA	<i>Diamond-Blackfan Anaemia</i>
DDB1/2	<i>Damage-specific DNA binding protein 1 or 2</i>
DDR	<i>DNA damage response</i>
DDX21/24/51	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 21, or 24, or 51</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Désoxynucléotide-tri-phosphate</i>
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
DUSP	<i>Dual-specificity phosphatase</i>
EBNA1	<i>Epstein-Barr nuclear antigen 1</i>
EBP2	<i>EBNA1 binding protein 2</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
eEF1A	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1A</i>
eEF1B	<i>Eukaryotic translation elongation factor 1B</i>
eEF2	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2</i>
eIF1	<i>Eukaryotic translation initiation factor 1</i>

eIF1A	<i>Eukaryotic translation initiation factor 1A</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2α</i>
eIF2 β	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2β</i>
eIF2 γ	<i>Eukaryotic translation elongation factor 2γ</i>
eIF2B α	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2Bα</i>
eIF2B β	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2Bβ</i>
eIF2B γ	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2Bγ</i>
eIF2 δ	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2δ</i>
eIF2B ϵ	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2Bϵ</i>
eIF3	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3</i>
eIF4A	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4A</i>
eIF4B	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4B</i>
eIF4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>
eIF4F	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4F</i>
eIF4G	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4G</i>
eIF4H	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4H</i>
eIF5	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5</i>
eIF5B	<i>Eukaryotic translation initiation factor 5B</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
eRF1	<i>Eukaryotic release factor 1</i>

eRF3	<i>Eukaryotic release factor 3</i>
ESC	<i>Embryonic stem cell</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic E.coli</i>
E1A	<i>Adenovirus early region 1A</i>
E2F	<i>E2 promoter binding factor</i>
FANCD2	<i>Fanconi anemia complementation group 2</i>
FAS	<i>Fas cell surface death receptor</i>
FBL	<i>Fibrillarin</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FOS (c-FOS)	<i>Finkel–Biskis–Jenkins murine osteogenic sarcoma virus</i>
GADD45a	<i>Growth arrest and DNA damage-inducible 45a</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GSK3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GST	<i>Glutathione S transferase</i>

GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>
G0	<i>Gap 0</i>
G1	<i>Gap 1</i>
G2	<i>Gap 2</i>
HDAC	<i>Histone déacétylase</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney cell</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HMBS	<i>Hydroxymethylbilane synthase</i>
HPN	<i>Hepsin</i>
HRAS (H-RAS)	<i>Harvey RAS viral oncogene homolog</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
HSPA1A (HSP70)	<i>Heat shock 70kDa protein 1A</i>
hTERT	<i>Human telomerase reverse transcriptase</i>
H3	<i>Histone H3</i>
IgG	<i>Immunoglobuline G</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IL	<i>Interleukine</i>
INK4A/B	<i>Inhibitor of CDK 4A or 4B</i>
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>

IRIC	<i>Institut de recherche en immunologie et en cancérologie</i>
ITS1/2	<i>Internal transcribed spacer 1 or 2</i>
Klf2	<i>Kruppel like factor 2</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
LincRNA	<i>Large intergenic non-coding RNA</i>
Lin28B	<i>Lin-28 Homolog B</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPK10	<i>Mitogen-activated protein kinase 10</i>
MCM	<i>Minichromosome maintenance complex component</i>
MDM2 (HDM2)	<i>Mouse double minute 2 homolog, E3 ubiquitin protein ligase</i>
MDH1	<i>Malate dehydrogenase 1</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase</i>
MMuLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
MLH1	<i>Human mutL homolog 1</i>
M phase	<i>Mitosis phase</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSH2	<i>Human mutS homolog 2</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>

MYC (c-MYC)	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NCL	<i>Nucleolin</i>
NF-κB (NFKB)	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMD	<i>Non-sense mediated decay</i>
NOC2L (NIR)	<i>Nucleolar complex associated 2 homolog</i>
NOLC1	<i>Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1</i>
NOL6 (NRAP)	<i>Nucleolar protein 6 (RNA-associated)</i>
NOP5 (NOP58)	<i>NOP5(NOP58) ribonucleoprotein</i>
NOP56	<i>NOP56 ribonucleoprotein</i>
NOXA/PMAIP1	<i>Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1</i>
NPM1 (B23)	<i>Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)</i>
NS	<i>Nucleostemin</i>
NSCLC	<i>Non-small-cell lung carcinoma</i>
OAZ	<i>Ornithin decarboxylase antizyme</i>
OD	<i>Optical density</i>
ODC	<i>Ornithin decarboxylase</i>
OIS	<i>Oncogene-induced senescence xxi</i>
OPRK1	<i>Opioid Receptor Kappa 1</i>
OPRL1	<i>Opioid Related Nociceptin Receptor 1</i>

ORF	<i>Open reading frame</i>
PAI-1	<i>Plasminogen activator-1</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS-T	<i>PBS-Tween 20</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PKD1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
pH	<i>Potentiel hydrogène</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PML	<i>Promyelocytic leukemia protein</i>
PML-NB	<i>PML nuclear body</i>
Pol I	<i>RNA Polymerase 1</i>
Pol III	<i>RNA Polymerase 3</i>
PRIC	<i>Protein ribosomal inhibitor of CDK-Cyclin</i>
PTC	<i>Peptidyl termination center</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTS1	<i>Peroxisomal targeting signal type 1</i>
P/S	<i>Penicillin G/Streptomycin sulfate</i>
PUMA	<i>p53-upregulated modulator of apoptosis</i>
p38MAPK	<i>p38 Mitogen-activated protein kinase</i>

p90RSK/RPS6KA1-3	<i>90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RB	<i>Retinoblastoma protein</i>
rDNA	<i>Ribosomal DNA</i>
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RP	<i>Ribosomal protein</i>
RPLP1	<i>Ribosomal protein, large, P1</i>
RPL5/uL18	<i>Ribosomal protein L5</i>
RPL7/uL22	<i>Ribosomal protein L7</i>
RPL8/uL2	<i>Ribosomal protein L8</i>
RPL10/uL16	<i>Ribosomal protein L10</i>
RPL11/uL5	<i>Ribosomal protein L11</i>
RPL15/eL15	<i>Ribosomal protein L15</i>
RPL19/eL19	<i>Ribosomal protein L19</i>
RPL22/eL22	<i>Ribosomal protein L22</i>
RPL24/eL24	<i>Ribosomal protein L24</i>

RPL26/uL24	<i>Ribosomal protein L26</i>
RPL29/eL29	<i>Ribosomal protein L29</i>
RPL31/eL31	<i>Ribosomal protein L31</i>
RPL34/eL34	<i>Ribosomal protein L34</i>
RPL36/eL36	<i>Ribosomal protein L36</i>
RPL36A/eL42	<i>Ribosomal protein L36A</i>
RPM	<i>Rotation per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RPS3A/eS1	<i>Ribosomal Protein S3A</i>
RPS4X	<i>Ribosomal Protein S4 X-Linked</i>
RPS7/eS7	<i>Ribosomal protein S7</i>
RPS10/eS10	<i>Ribosomal protein S10</i>
RPS14/uS11	<i>Ribosomal protein S14</i>
RPS17/eS17	<i>Ribosomal protein S17</i>
RPS19/eS19	<i>Ribosomal protein S19</i>
RPS24/eS24	<i>Ribosomal protein S24</i>
RPS26/eS26	<i>Ribosomal protein S26</i>
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i>
RSD	<i>Relative standard deviation</i>
RSL1D1/CSIG	<i>Ribosomal L1 domain containing 1 xxiii</i>

SACM1L	<i>Suppressor of actin mutations 1-like</i>
SAHF	<i>Senescence-associated heterochromatic foci</i>
SAPD	<i>Senescence-associated protein degradation</i>
SARD	<i>Senescence-associated ribogenesis defects</i>
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
SA- β -Gal	<i>Senescence-associated β-galactosidase</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SMAD1	<i>Mothers against aecantaplegic homolog 1</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
shCTR	<i>Control shRNA (nontargeting)</i>
snoRNA	<i>Small nucleolar RNA</i>
snoRNP	<i>Small nucleolar ribonucleoprotein</i>
Snu13	<i>Small Nuclear Ribonucleoprotein 13</i>
S Phase	<i>Synthesis phase</i>
SV40 ER	<i>Simian virus 40 early region</i>
S1PR1	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>
T-ALL	<i>Acute T lymphoblastic leukemia/lymphoma</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>TBS-Tween 20</i>

TBP	<i>TATA box binding protein</i>
TER	<i>Termination regions</i>
TF	<i>Transcription factor</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TP53 (p53)	<i>Tumor protein p53</i>
UBF	<i>Upstream binding factor</i>
uORF	<i>Upstream open reading frame</i>
UPP	<i>Ubiquitin-proteasome pathway</i>
UTR	<i>Untranscribed region</i>
VASP	<i>Vasodilator -stimulated phosphoprotein</i>
VEGF-Ax	<i>Vascular endothelial growth factor Ax</i>
WT	<i>Wild type</i>
X-Gal	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>
γ H2AX	<i>H2A histone family, member X – phosphorylated</i>
53BP1	<i>p53-binding protein 1</i>

À mon cher fils Sasha et mon tendre époux Ivan

Remerciements

Laboratoire Ferbeyre:

Je voudrais tout d'abord remercier grandement mes directeurs de thèse Léa et Gerardo pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire:

Léa Brakier-Gingras : Merci pour votre encadrement, votre expérience et votre sagesse tout au long de cette thèse. Votre passion pour la recherche et votre ténacité sont des sujets d'admiration, vous êtes un exemple à suivre. Merci pour votre gentillesse et pour les nombreux encouragements que vous m'avez prodigués. Vous m'avez soutenue non seulement dans l'évolution du doctorat mais aussi moralement, toujours soucieuse de mon bien être. Sur beaucoup d'aspects j'ai toujours pu compter sur vous. Cette complicité entre directeur de recherche et étudiant est rare et précieuse. Votre présence a été chaleureuse, rassurante et bienveillante. Merci de la confiance que vous m'avez témoignée et de tout ce que vous avez fait pour moi durant toutes ces années.

Gerardo : Nos rapports ont évolué au cours de mon doctorat et je peux dire aujourd'hui que j'ai eu beaucoup de chance de t'avoir comme directeur de thèse. Une joie de vivre à toute épreuve malgré des situations stressantes, énormément d'idées originales, une passion intarissable et communicative pour ton métier, toujours positif et enthousiaste quand il s'agit de recherche. Une pensée claire et accessible. Comment ne pas être reconnaissante que tu m'acceptes au sein du laboratoire et d'avoir pu y évoluer pendant 6 années. Au cours de ces années, tu t'es impliqué dans l'orientation de mes travaux et tu t'es également investi dans celle de mon avenir. Merci pour m'avoir appris à être moins « bonne élève » et plus autonome tout au long de ce travail de recherche. Ton esprit scientifique a sans aucun doute participé à l'aboutissement de mon doctorat. Tu as eu un réel impact positif sur mon parcours professionnel et personnel. Je suis heureuse que tu fasses ainsi partie aujourd'hui des personnes qui ont marqué ma vie.

Véronique : Merci pour tes idées éclairantes, pour toujours nous venir en aide afin de débloquer nos projets, pour ton partage de connaissances en culture cellulaire et sur la plupart

des techniques de notre laboratoire, pour exceller dans tout ce que tu gères. Merci d'être le noyau maternelle qui soude tous les membres du laboratoire, et de nous raccompagner sains et saufs après certaines soirées arrosées.

Maire-Camille : Merci pour toutes tes qualités; travailleuse, intelligente, responsable, généreuse, très mature pour ton âge et très gentille. Merci pour l'aide et les conseils que tu m'as offert. Nous sommes chanceux de t'avoir dans le labo. Stéphane est également très chanceux de t'avoir dans sa vie.

Stéphane : Merci pour ton énergie de travail, pour ta rigueur scientifique, ta soif de connaissance et ta persévérance, pour être si organisé, si enthousiaste. Tu es une machine de travail. Merci aussi pour ton bon cœur, ton amour pour la musique, et pour toujours garder vivant l'enfant qui est en toi. Marie-Camille est chanceuse de t'avoir dans sa vie également. Je vous souhaite à tous les deux de beaux bébés et une vie harmonieuse et intéressante.

Ana : Gracias por tu optimismo, alegría de vivir, sonrisa y entusiasmo. Siempre miras todo con buenos ojos y esperanza, le das luz al laboratorio. Gracias por colaborar juntas y publicar con nuestro Fred, ha sido un inmenso placer compartir contigo en todo momento, fuera y dentro del plano científico. Nos hemos divertido bastante todos estos años, espero seguir en contacto contigo y espero colaborar contigo en otros proyectos dentro y fuera del contexto científico.

Lian : Tu es pleine d'énergie positive, toujours prête à sourire à la moindre facétie de nos garçons si déchaînés. Bonne humeur, travailleuse et efficace, excellente acrobate. Gerardo a de la chance de t'avoir dans le labo. Merci pour être telle que tu es, ne change jamais.

Paloma : Merci pour ton humanité et ta tendresse, comme ton nom l'indique, tu es comme une colombe, apaisante et libre. Merci pour tes cours improvisés de samba. J'ai été ravie que tu rejoignes notre laboratoire. Reste comme tu es.

Sebastian : Merci pour ton sens de la critique constructive, pour toujours remettre en question les résultats de nos expériences afin d'améliorer notre travail, pour être si assoiffé de connaissances et pour ne jamais arrêter d'apprendre. Merci pour être si présent et actif lors de nos lab meetings. Tu as été quelqu'un d'important dans nos réunions.

Jacob : Nous n'avons pas eu le temps de faire beaucoup connaissance depuis ta récente arrivée dans le laboratoire, néanmoins, ton aide a été inestimable et je tiens à te remercier chaleureusement de poursuivre mon projet. Merci également d'avoir obtenu les résultats qui ont permis de finaliser notre article.

Fred : Je devrais écrire un bouquin pour te remercier, quelques lignes ne suffiront certainement pas à te donner toute la mesure de ma gratitude. Tu as toujours été là pour me soutenir et me guider au cours de mon doctorat, tes remarquables conseils ont beaucoup compté pour moi et ont été indispensables à la réussite de ce projet. Merci pour ta capacité à transmettre tes visions positives des choses. Gentil, humble, brillant, patient, pédagogue et d'un grand cœur, voici quelques qualités parmi tant d'autres que tu possèdes. Merci d'être venu m'encourager à l'hôpital, malgré ton manque de temps, c'était une surprise très agréable et j'étais très émue. J'ai été honorée et chanceuse d'avoir travaillé en ta compagnie et d'avoir pu profiter de tes qualités tant scientifiques qu'humaines. J'espère que nous aurons d'autres opportunités de travailler ensemble.

Mariana : Tu ayuda y consejos maternales me han servido de mucho, sobre todo en estos últimos momentos, bastante tormentosos. Gracias por ser una ejemplo de mujer a seguir, por ser una excelente madre sin dejar de priorizar tus deberes científicos, no sé como encuentras tiempo para todo y como organizas todo tan bien.

Max : Merci pour nos discussions, pour tes idées et l'intérêt que tu as toujours porté à mon projet. Merci pour ton conseil sur la fidélité de la terminaison de la traduction des cellules sénescents contournées. Cela a été essentiel pour mon projet. J'ai écouté et tenu compte de tes remarques pertinentes à chaque fois. Bon courage pour ta carrière.

Emmanuelle : Merci pour ta rigueur et ton efficacité. Capable de gérer tellement d'activités en même temps, jouer du violon, exceller dans la recherche, enseigner, administrer, explorer le monde, etc...

Laurie : Nous avons eu de bonnes conversations en salle de culture et dans mon local qui m'ont permis de te connaître un peu mieux. J'ai apprécié ta compagnie et ces discussions. Je te souhaite à toi aussi beaucoup de réussite dans ta vie personnelle et professionnelle.

Marinieve : No olvidaré tus sabios consejos, tu experiencia en los clonajes y en microscopia, tu amistad. Nunca olvidaré el día que me salvaste la vida y estuviste a mi lado en

ese momento tan duro. Te recuerdo con mucho cariño y me siento honrada de haber compartido contigo tantas cosas en el laboratorio y fuera de él.

Xavier : Tu es à l'origine de nombreux travaux de recherche de notre équipe et tu as été primordial au bon déroulement de ma thèse. Tes sujets ont donné naissance à des recherches clés pour mon projet et pour ceux du laboratoire. Merci.

Camille : Nous nous sommes peu connues mais il a été facile de remarquer ta gentillesse, ton sérieux et ta motivation. Merci pour la sympathie que tu m'as témoignée et ta douceur de caractère. Je ne te souhaite que de très belles choses pour l'avenir !

Aux membres du comité de thèse et jury :

Je tiens à vous remercier chaleureusement d'avoir accepté de juger mes travaux et d'avoir dégagé du temps pour vous y consacrer. J'ai été touchée que vous ayez répondu si rapidement, et avec enthousiasme, à ma demande. Je vous en suis reconnaissante.

Dr. Luc Desgroseillers : Merci pour votre bonne humeur permanente, votre humilité malgré votre position et vos précieux conseils scientifiques. Je suis honorée que vous ayez accepté d'être membre du jury de mon examen pré-doctorale et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Dr. Eric Lécuyer : Je suis admirative de vos recherches et je suis très honorée que vous ayez porté votre regard d'expert sur mon manuscrit et de vos remarques on ne peut plus pertinentes pour l'améliorer.

Dr. François Dragon : Je vous suis vraiment grée pour votre investissement dans l'évaluation de mon travail et pour votre implication très positive.

Dr. Przemyslaw Sapielha : Je tiens à vous remercier pour l'intérêt que vous portez sur mes travaux ainsi que d'avoir accepté de venir assister à la soutenance de ma thèse.

Las kendys:

Lidice : Querida Lili, gracias por tu amistad y apoyo incondicionales, tanto en lo profesional como en lo personal. Puedo contar contigo para todo, y esta dicha muy pocos la

tienen. Puedes contar conmigo también para todo. Gracias por tu bondad, la cual conservas a pesar de los momentos duros, y esta bondad me ha hecho admirarte mucho. Me siento afortunada de considerarme tu amiga. Eres sacrificada, talentosa y modesta. Despiada a veces, tímida otras, reúnes tantas características adorables que me hacen quererte mucho. De nuevo gracias por tu amistad y por ser como eres.

Lorea : Mi querida kendy ibérica, gracias por los grandes momentos de distracción siempre originales y variados. Ellos me han ayudado a continuar sin volverme mas kendy aun durante el doctorado. Gracias por tus ocurrencias y tu buen humor en los buenos y malos momentos, gracias por tu amistad y tu apoyo.

Juliana : Mi argentina preferida, gracias por tus consejos científicos y personales. Fuimos cómplices de varias aventuras, compartimos mucho y tu amistad fue vital durante esta etapa tan ardua e interminable.

Laboratoire Luc Desgroseillers :

La collaboration et l'entraide entre nos laboratoires ont été fondamentales à l'accomplissement de nos recherches.

Florence : Merci pour ton originalité et ta fraîcheur. J'ai eu beaucoup de plaisir avec toi sur les murs d'escalade de Shakti, les tours de vélo, les mojitos sur mon balcon. Qu'est-ce que j'ai pu rigoler ! Merci pour tes conseils et ta maturité. Je te souhaite que du bonheur dans ta vie et que tu deviennes un PI.

Lionel : Merci pour ta gentillesse, pour tous les petits coups de mains que tu m'as donnés, toujours avec enthousiasme. Merci aussi pour tes agréables attentions quasi quotidiennes comme nous ramener des croissants, une carte postale personnalisée de tes voyages. Merci d'être un si bon leader pour les étudiants et d'organiser avec tes collègues des activités de qualité. Je te souhaite une bonne fin de maîtrise et te félicite pour la qualité de ton travail.

Yulemi : On n'a pas eu l'occasion de travailler ensemble mais je garde un bon souvenir de nos rigolades quand on se croisait dans les couloirs et avec les filles aussi. Merci pour les services que tu nous a rendus avec Ivan. Merci pour les moments de détente au spa de ton immeuble, les moments de relaxation sont aussi importants pour la réussite d'un doctorat. Merci

pour les crêpes du petit déjeuner du département et pour être si bien informée de tout ce qui se passe dans l'entourage.

Sami : Merci pour ton attitude posée et positive, pour ta confiance en toi. Je te souhaite un avenir radieux.

Laboratoire Pascale Chartrand

Pascale Chartrand : Vous avez été témoin de mes recherches tout au long de cette thèse. En tant que membre du comité de thèse, en tant que professeur de communication scientifique ou dans mon examen pré-doctorale, vous avez toujours posé des questions clés pour ma recherche et apporté des outils qui ont permis d'avancer mon projet. Merci beaucoup pour votre participation, ça a été pour moi un vrai privilège d'interagir avec vous.

Laboratoire Ivan Topisirovic

Au sein de ce laboratoire j'ai appris, et avec beaucoup de plaisir, les techniques du polysome profiling. Kristofferson et Matthew, merci pour votre gentillesse, pour nos aventures gastronomiques, pour nos conversations croustillantes. Nous nous sommes toujours bien entendus et je garderai un impérissable souvenir de notre collaboration. Merci de tout le temps que vous avez consacré à essayer de combler le puits sans fond de mon ignorance.

Famille :

A mis padres Ruben y Liuba : A mis queridos padres por haberme brindado tanta ayuda incondicional, por guiarme, educarme y darme los mejores valores de sí, por todo su inmenso amor. Por ser como son, auténticos, transparentes, sinceros, honrados, y otros muchos valores que no pararía de nombrar, les agradezco por ser tan afortunada de tenerlos siempre conmigo, aunque estén físicamente lejos de mí.

Mon Ivan : À toi mon « amore », mon loyal complice, mon éditeur personnel; les mots ne suffisent pas pour te remercier. Si ce doctorat pouvait se diviser en deux maîtrises, un titre de master serait pour moi et l'autre tu le mériterais sans aucune hésitation. Tu m'as toujours soutenue pendant cette aventure, tu m'as donné des forces, de précieux conseils, tu ne m'as jamais laissé tomber. Tu as traversé les océans pour moi plusieurs fois, et je suis sûre que tu pourrais aller au-delà si c'était possible. Nous avons passé de dures épreuves et des moments inoubliables. Tu m'as donné le plus beau cadeau au monde, notre cher Sasha. Je t'aime.

Sasha : Mon courageux et battant hijito. Llegaste luchando por tu vida valientemente, enfrentando a todos, luchamos los dos arduamente, sin perder la fe y sin dejarnos vencer. Llegaste temprano a este mundo pero con euforia y frenesí te recibimos. Gracias por darme fuerzas y por darme buena suerte, tu es ma lumière au but du tunnel, eres mi luz y mi felicidad.

Rafael (Felo) : Sobrino querido, siempre tan preocupado por este doctorado : « cuando terminas ? »... cómo te va Ney ?... Cuando dejas de estudiar y vienes a vernos?.. Siempre esperando por mí, mi sobrino sensible y sentimental. Gracias por cuidar tan bien a nuestro Bobby, que te quiere con locura y « satería ». Estás lejos y es difícil encontrarnos en estos momentos, pero no te olvido y te agradezco por todo inmensamente.

Natacha (mamma) : Merci pour ton support inconditionnel et pour mon cher Ivan. Je suis honorée d'être ta belle-fille et de faire partie de la famille. Merci pour me traiter comme une fille au point de trop me gâter, pour nous faire découvrir à Ivan et à moi de beaux endroits partout en France, pour ton sens des détails, pour tes repas hebdomadaires et pour tes conseils. Merci pour ton altruisme et ton sacrifice envers notre petite famille, pour toujours nous montrer la valeur d'une famille soudée.

Mamie Jacqueline : Je te considère comme ma vraie mamie. Merci pour ton amour, de m'avoir accueillie dans ton foyer en tant que membre de la famille, merci de m'avoir fait sentir comme un membre important de la dynastie des « Sevestre ». Pour tes savoureux plats, pour tes connaissances sur la nature et le jardin, pour tes recettes et tes conseils, pour ta sagesse et pour avoir si bien élevé ton petit fils Ivan. Merci de d'être tout le temps inquiétée pour ce doctorat qui pour toi était interminable.

Christian et Nina : J'ai été très sensible à votre générosité, à votre souci de mon bien-être et à votre soutien au cours de cette thèse. Vous avez été vraiment adorables avec moi. Merci de la confiance que vous m'avez témoigné et de tout ce que vous avez fait pour moi durant toutes ces années.

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

1. Introduction

1.1. Les suppresseurs de tumeurs

L'accumulation des changements génétiques comprenant l'activation d'oncogènes, des perturbations des gènes de réparation de l'ADN et des gènes garde-barrières mènent à une transformation maligne (1). Cela signifie que des cellules avec un comportement anormal, s'échappent des suppresseurs de croissance, prolifèrent sans contrôle et activent l'angiogenèse, l'invasion et la métastase (2). Les mutations peuvent avoir lieu dans les cellules germinales, constituant une prédisposition héréditaire au cancer (1). D'autre part, les mutations dans les cellules somatiques occasionnent des tumeurs sporadiques (3).

Lorsque les cellules qui n'abritent pas ces changements génétiques si nuisibles, subissent plusieurs stress endommageant l'ADN, les mécanismes de sauvegarde s'activent en arrêtant de manière transitoire la prolifération cellulaire afin de réparer les dommages. Si ceux-ci sont trop importants, l'arrêt de la prolifération cellulaire sera permanent afin d'induire, soit la mort cellulaire programmée ou apoptose, soit la sénescence (4).

La sénescence est considérée comme un mécanisme anti-tumoral puisque les cellules potentiellement dangereuses, activent leurs mécanismes de sauvegarde pour arrêter leur prolifération (5). Il existe deux familles de gènes suppresseurs des tumeurs: les gènes de réparation de l'ADN (par exemple, ATM, BRCA1/2, MLH1, MSH2), qui suppriment les altérations génétiques et les maintiennent à des niveaux négligeables (6), et les gènes garde-barrières (par exemple, RB, CDKN1B, APC, PTEN), qui garantissent l'inhibition de la prolifération et peuvent déclencher l'apoptose (1,7). P53 appartient à la famille des gènes garde-barrières ainsi qu'à celle des gènes de réparation de l'ADN (8). Dans les prochaines sections, nous consacrerons notre attention sur les suppresseurs de tumeurs p53, RB et PML.

1.1.1. TP53

Ce senseur de stress cellulaire restreint le développement du cancer en répondant à plusieurs signaux tels que les dommages à l'ADN, l'expression oncogénique ou la perturbation des ribosomes (9). Dans les cellules soumises à de forts signaux de stress, causés par des dommages irréparables ou par la transformation maligne, p53 déclenche des programmes irréversibles ou stables tels que l'apoptose ou la sénescence, respectivement. Au contraire, dans des conditions de faible stress, p53 déclenche un arrêt transitoire du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou la production des protéines anti-oxydantes (10).

P53 peut être activée par des modifications post-traductionnelles et/ou par sa stabilisation. Une fois active, elle peut lier l'ADN pour stimuler la transcription des gènes codants, et des gènes non-codants tels que les micro-ARN ou les ARN intergéniques non codants à grande taille (*large intergenic non-coding RNAs: lincRNAs*) (11,12). P53 subit des phosphorylations directes Ser¹⁵ par ATM (*Ataxia Telangiectasia mutated*)/ATR (*Ataxia Telangiectasia and Rad3 related*) ou par médiation de CHK1 et CHK2 (*Checkpoint Kinase 1,2*). CHK1 et CHK2 phosphorylent également p53 sur Ser²⁰. Ces modifications post-traductionnelles atténuent l'inhibition ou la dégradation par la protéine E3 ubiquitine ligase HDM2 (MDM2 chez la souris, *Mouse double minute 2 homolog*) de p53, contribuant à sa stabilisation et à son activation (13-15). En réponse aux signaux de stress endommageant le fonctionnement de la cellule, l'induction transcriptionnelle via p53 impliquera des voies apoptotiques incluant BAX (*BCL-2 Associated X*), FAS (*Fas cell surface death receptor*), NOXA (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*) et PUMA (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) (16), tandis que l'induction de la sénescence sera effectuée par l'activation transcriptionnelle des gènes tels que p21, PML (*Promyelocytic leukemia protein*) et PAI-1 (*Plasminogen activator-1*) (17).

1.1.2. RB (protéine du rétinoblastome), p107, p130

La protéine du rétinoblastome (RB) a été considérée comme un suppresseur de tumeur suite à des expériences où l'allèle sauvage de RB a été réintroduit dans des cellules déficientes en RB,

dérivées de différentes tumeurs humaines. Cette réintroduction de RB supprimait le phénotype néoplasique (18,19). RB, ainsi que les membres de sa famille p107 (*retinoblastoma-like protein 1*) et p130 (*retinoblastoma-like protein 2*), subissent des phosphorylations périodiques au cours du cycle cellulaire. Tout au long de la phase G1, ils passeront progressivement d'un état d'hypophosphorylation (actif) à un état d'hyperphosphorylation (inactif) à la fin de cette phase, ainsi que pendant la phase S du cycle cellulaire. Lors de la sortie de la phase mitotique, RB, p107 et p130 seront déphosphorylés (20,21). L'activation de RB, p107 et p130 permet l'arrêt de la prolifération, dû à leur rôle de suppresseur de la transcription des gènes requis pour le cycle cellulaire. Le complexe des kinases dépendantes des cyclines Cycline D-CDK4/CDK6 (*Cyclin-dependent kinase 4 or 6*) est responsable de leurs phosphorylations et de leurs inactivations au milieu de la phase G1, tandis qu'à la fin de la phase G1, le complexe Cycline E-CDK2 prend le relai (22,23). Cette hyperphosphorylation de RB permet la libération des facteurs de transcription de la famille des E2F (*E2 promoter binding factor*) et la transcription de ses gènes cibles potentiellement mitogéniques (24,25).

1.1.3. PML (Protéine de leucémie promyélocytaire)

PML a été initialement identifiée dans les leucémies promyélocytaires dues à une translocation entre les chromosomes 15 et 17 (26). Elle est souvent supprimée dans différents cancers chez l'humain, tandis que chez la souris son inactivation génétique favorise la transformation (27). Elle constitue le composant de structures connues comme les corps nucléaires PML. De plus, son expression dans les cellules primaires conduit à un arrêt stable du cycle cellulaire via la suppression dépendante de RB des cibles transcriptionnelles des E2F (28-30). PML recrute également p53 vers les corps nucléaires, et réciproquement p53 induit la transcription de PML (31). PML présente également des fonctions antivirales. Son expression augmente en présence de l'interféron de type I et II et est corrélée avec la résistance aux infections aux virus d'ARN (32-34). PML, ou les corps PML, inhibent la réplication des certains virus au niveau de l'expression de l'ARNm viral et au niveau de l'expression protéique (32).

Les suppresseurs des tumeurs décrits antérieurement constituent des facteurs clés lors de l'établissement de la sénescence. Étant donné l'importance de ce phénotype dans cette thèse, nous y consacrons une attention plus détaillée dans les sections qui suivent.

1.2. La sénescence comme mécanisme de suppression tumorale

Jusqu'en 1960, le dogme de la culture cellulaire se basait sur l'immortalité et la prolifération infinie des cellules en culture. Il était considéré que la cause de la mort des cellules était due à de mauvaises manipulations ou au manque de connaissances sur la possibilité de les cultiver indéfiniment (35). Hayflick a observé que les cellules normales (non transformées) avaient un nombre limité de divisions dû à l'érosion des télomères à chaque cycle de réplication de l'ADN (36). Ce phénomène est appelé sénescence répllicative. La sénescence cellulaire est un arrêt stable de la réplication, généralement en phase G1, dans lequel les cellules restent viables et métaboliquement actives. Son établissement s'accompagne du remodelage de la chromatine, de la reprogrammation métabolique ainsi que de l'augmentation de l'autophagie (37-39). Même si elle est causée en réponse à des situations de stress, la sénescence est également importante pour le développement normal, le maintien de l'homéostasie tissulaire ainsi que la limitation de la progression tumorale (37).

Comme présenté précédemment, la sénescence cellulaire a initialement été décrite comme étant le résultat de l'érosion de l'extrémité des chromosomes, les télomères (40,41). À chaque division cellulaire l'extrémité des chromosomes se raccourcit, et lorsque ces régions télomériques deviennent trop courtes, leur structure protectrice est perturbée, ce qui enclenche une réponse aux dommages à l'ADN et l'activation de p53 et RB (5). Il a été constaté que certains types de cellules subissent une sénescence prématurée indépendamment du raccourcissement des télomères. Ces cellules sont probablement exposées à une stimulation oncogénique qui peut induire des dommages à l'ADN et entraîner un arrêt dans le cycle cellulaire, via l'activation de p53 ou RB. Les dommages à l'ADN peuvent être induits par des

oncogènes mitogéniques ou par la perte de gènes suppresseurs de tumeurs anti-mitogéniques (42).

Dans plusieurs types de sénescence, telles que celle induite par l'oncogène *ras* ou lors de la sénescence réplivative, les cellules manifestent une activation constitutive de la réponse aux dommages à l'ADN. Il en résulte une accumulation sur la chromatine du variant de l'histone H2A phosphorylé γ H2AX (*H2A histone family, member X-phosphorylated*) ainsi que de 53BP1 (*p53-binding protein 1*), activant ensuite la cascade des kinases qui comprend d'abord ATM, ATR suivis de CHK1 et CHK2 (43). Éventuellement, l'activation des suppresseurs de tumeur p53 et RB sera déclenchée (**Figure 1**).

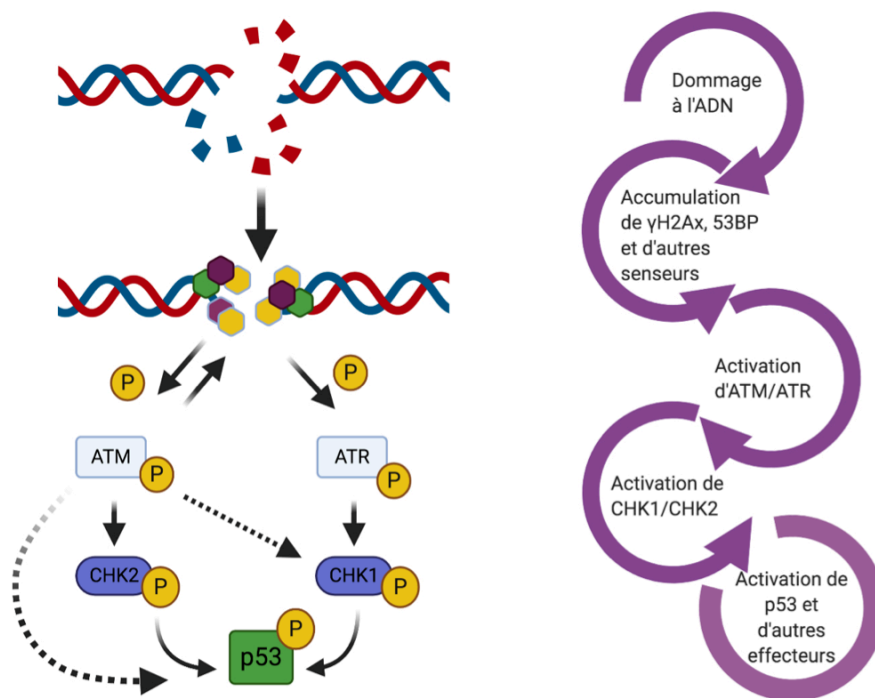


Figure 1. Réponse aux dommages à l'ADN

La rupture du simple ou du double brin de l'ADN déclenche la réponse aux dommages à l'ADN. Différents senseurs, tels que 53BP1 et H2AX s'accumulent sur le site de rupture. La protéine kinase ATM qui est également recrutée, s'active par autophosphorylation et phosphoryle H2AX. L'accumulation d'ATM s'incrémente progressivement ainsi que le taux de phosphorylation, et par conséquent, il y a également une accumulation de γ H2AX (H2AX phosphorylé). ATR est également

recruté. CHK1 et CHK2 sont phosphorylés et activés pas ATR et ATM, respectivement, qui sont les responsables de la cascade de signalisation de dommage à l'ADN dans les régions nucléaires éloignées du site de rupture de l'ADN (43). L'activation de p53 induit l'arrêt du cycle cellulaire à travers l'activation de p21.

Cet état non prolifératif est principalement dû à l'expression et à l'accumulation des inhibiteurs du cycle cellulaire tels que p21^{CIP1}, qui est induit par p53, et de p16^{INK4A}, qui bloque CDK4 permettant l'accumulation de RB dans son état actif hypophosphorylé, en empêchant l'entrée en phase S du cycle cellulaire (5,44,45). Le locus *INK4 (Inhibitor of CDK 4)/ARF (Alternative reading frame protein)* est d'une importance clé lors de l'établissement de la sénescence car il contient trois suppresseurs de tumeurs: p16^{INK4A} et ARF, codés par le gène *CDKN2A*, et p15^{INK4B}, codé par *CDKN2B* (37). P21^{CIP1}, p16^{INK4A} et p15^{INK4B} sont des inhibiteurs de CDKs qui affectent la progression du cycle cellulaire en inhibant CDK4/6 (43). ARF, de son côté, inhibe MDM2 permettant l'activation de p53 (46).

L'importance de PML lors de l'établissement de la sénescence induite par des oncogènes tels que *ras* a été démontrée. PML interagit directement avec p53 mais des complexes E2F/RB relocalisés dans des corps nucléaires PML avec des foyers d'hétérochromatine associés à la sénescence (SAHF) ont été observés, suggérant l'implication de PML dans la répression des cibles d'E2F (28,29,31).

Plusieurs drogues chimiothérapeutiques peuvent aussi provoquer des dommages à l'ADN et par conséquent, peuvent induire la sénescence de cellules normales et également de cellules tumorales (47). Des études récentes révèlent que les radicaux libres dérivés de l'oxygène peuvent également induire la sénescence (48,49). La sénescence provoquée par les facteurs mentionnés ci-dessus est appelée sénescence induite par les oncogènes ou sénescence associée au stress. La **Figure 2** résume les principaux facteurs inducteurs de la sénescence.

Enfin, les cellules sénescentes sécrètent des cytokines et des chimiokines ayant des effets paracrines pro-oncogéniques, mais pouvant également induire un arrêt du cycle cellulaire de façon autocrine et renforcer le phénotype sénescents (50,51). De plus, les cellules du système immunitaire recrutées par les cytokines sécrétées élimineront éventuellement les cellules sénescents. Plusieurs protéines associées à la sénescence ont été identifiées en tant que cibles de la modification réversible par SUMOylation. Par exemple, une accumulation des protéines SUMOylées a été observée dans les cellules sénescents comparée aux cellules en prolifération (52).

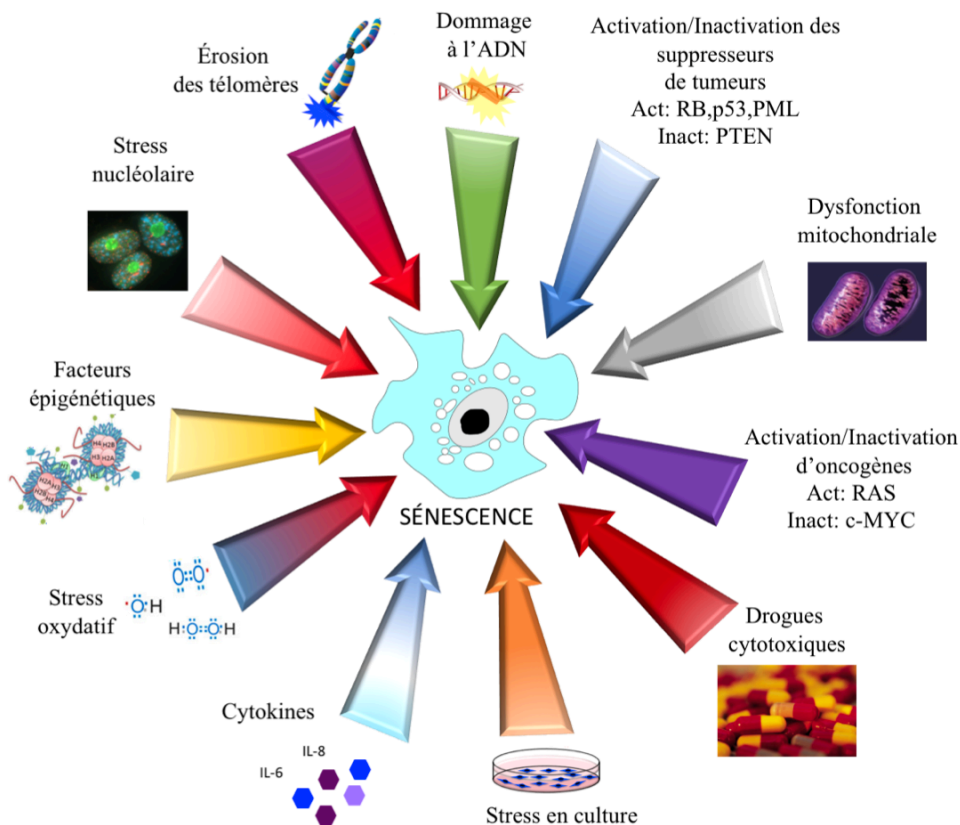


Figure 2. Facteurs inducteurs de la sénescence

Le phénotype sénescents peut être induit par un ou plusieurs facteurs de stress. La figure résume les principaux inducteurs, tenant en compte que la sénescence résulte de la combinaison de plusieurs caractéristiques.

1.2.1. Dégradation protéique associée à la sénescence (SAPD)

Une des caractéristiques de la sénescence induite par des oncogènes dans des cellules normales humaines est la signalisation constitutive de la voie ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*)/MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*). L'hyperactivation de cette voie, ainsi que le raccourcissement des télomères, conduisent à une dégradation sélective des protéines dépendante de l'ubiquitination et du protéasome (53). Nous avons nommé ce phénomène: SAPD (*Senescence-associated protein degradation*). La plupart des protéines dégradées contiennent des motifs de phosphorylation cibles des kinases telles que les CDK, ERK1, ERK2 et GSK (*Glycogen synthase kinase*). De plus, elles participent à la biogenèse des ribosomes, la progression du cycle cellulaire, les fonctions mitochondriales et la migration cellulaire (54). La diminution des niveaux de ces protéines contribue à l'établissement de la sénescence. Nous nous concentrerons sur cette diminution protéique associée aux défauts de la ribogenèse dans la sénescence.

1.2.2. Le ribosome et la perturbation nucléolaire dans la sénescence

Le ribosome est un complexe macromoléculaire chargé de catalyser la synthèse des protéines en utilisant les directives de l'ARNm. La biogenèse des ribosomes comprend la participation d'environ 200 facteurs d'assemblage (55,56). La vitesse de production des sous-unités ribosomiques reportée dans les cellules HeLa s'estime à 7500 sous-unités par minute (57). Ce processus consomme donc une grande quantité de l'énergie cellulaire. Le ribosome eucaryote est composé de 80 protéines chez les mammifères (79 chez la levure (58)) associées avec des ARN ribosomiques (ARNr). Les ARNr sont synthétisés par l'ARN polymérase I (ARN pol I) et III (ARN pol III). L'assemblage des ARNr et des protéines forme la petite sous-unité 40S et la grande sous-unité 60S du ribosome dans le nucléole, cette organite non-membranaire localisée dans le noyau. Chez les mammifères, la sous-unité 40S contient l'ARNr 18S et 33 protéines ribosomiques différentes, alors que la sous-unité 60S contient l'ARNr 28S, 5.8S et 5S assemblés avec 47 différentes protéines ribosomiques (59). Les ARNr sont synthétisés sous forme de précurseurs qui sont ensuite soumis à un processus de maturation. Ce processus de maturation comprend non seulement le clivage et l'élimination des séquences excédentaires,

mais aussi les modifications telles que, principalement, les pseudouridylations (Ψ) catalysées par la dyskérine (60) et les 2'-O-méthylations catalysées par la fibrillarine (61). Autant le processus de maturation que les modifications de l'ARNr nécessitent des petits ARN nucléolaires (snoRNA) qui guident les modifications à travers l'appariement des bases avec le pré-ARNr (62). Dans le mécanisme de 2'-O-méthylation, les snoRNA à boîtes C/D guident de petites particules ribonucléoprotéiques (snoRNP) contenant la fibrillarine (63), tandis que lors des pseudouridylations, les snoRNA à boîtes H/ACA, guident les snoRNP contenant la dyskérine (**Figure 3**) (64-66). Les ribosomes humains présentent un nombre majeur de ces modifications par rapport aux bactéries et aux levures. Chez les humains, il existe environ 106 2'-O-méthylations et 95 Ψ , dans la levure *S.cerevisiae* 55 2'-O-méthylations et 44 Ψ , et dans la bactérie *E.coli* quatre 2'-O-méthylations et onze Ψ (67-71). Chez tous ces organismes, on constate que ces modifications se trouvent dans des régions du ribosome fonctionnellement cruciales (72).

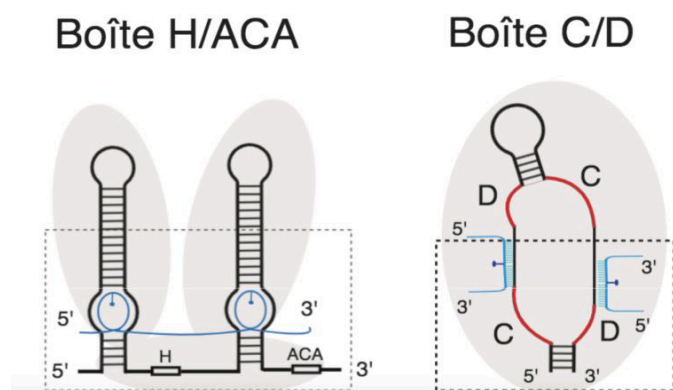


Figure 3. Structure des snoRNA à boîtes H/ACA et C/D

Les petits ARN nucléolaires à boîtes H/ACA ciblent la formation de la pseudouridine. Les petits ARN nucléolaires à boîtes C/D ciblent la formation de la 2'-O-méthylation sur le ribose de l'ARNr. Les ARNr sont représentés en bleu, tandis que les composants protéiques sont représentés en gris clair.

Lors de l'induction oncogénique ou dans le vieillissement cellulaire, par exemple, les cellules rendues sénescents présentent un seul et grand nucléole, suggérant que la sénescence entraîne un stress nucléolaire. Dans notre laboratoire, nous avons trouvé, en utilisant une

approche protéomique, plusieurs protéines dégradées ayant un rôle dans le nucléole (**Tableau 1**).

Tableau 1. SAPD des protéines nucléolaires compromises dans la biogénèse des ribosomes *

PROTÉINE	FONCTION
CCDC86	Protéine nucléolaire à domaine en spirale enroulé, PMID: 173007833
DDX21	Hélicase nucléolaire d'ARN, maturation de pré-ARNr, PMID: 19106111
DDX24	Hélicase d'ARN
DDX42	Hélicase d'ARN
DDX51	Composant nucléolaire, maturation de l'ARNr, PMID: 2040493
NOC2L	Protéine nucléolaire, inhibiteur de p53, PMID: 16322561
NOLC1	Activateur de la Pol I, nucléologénèse, PMID: 7657714
NOL6/NRAP	Protéine nucléolaire, PMID: 11895476
NOP5/NOP58	Protéine nucléolaire, biogénèse de la 60S, PMID: 11583964
NOP56	Protéine nucléolaire, biogénèse de la 60S, biogénèse des snoRNPs, PMID: 19620283
Nucléoline	Protéine nucléolaire et cofacteur de la Pol I, PMID: 17130237, inhibiteur de p53, PMID: 22013067
RPLP1	Composant structurel du ribosome, PMID: 16572171, contournement de la sénescence, PMID: 19233166
RPL23	Protéine nucléolaire
RSL1D1	Protéine nucléolaire, inhibe PTEN et p27, elle est inhibée dans la sénescence répllicative, PMID: 18678645, régule la localisation de la nucléostémine, PMID: 17158916

* *Adapté de Dêschenes-Simard et al. (53)*

Nous avons ensuite confirmé que la dégradation ou la déplétion du facteur de la ribogénèse RSL1D1 (*ribosomal L1 domain-containing 1 protein*) était un mécanisme effecteur observé lors

de l'établissement de la sénescence dans des fibroblastes humains primaires (54). Une des fonctions de RSL1D1 consiste à réguler la localisation nucléolaire de la nucléostémine (NS). La nucléostémine, pour sa part, régule la localisation nucléolaire de DDX21 (*DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 21*) et EBP2 (*EBNA1 binding protein 2*) (73,74), également diminuées dans la sénescence induit par *ras*. Tant la nucléostémine que DDX21 et EBP2, participent à la maturation des ARNr (74-76). Plus spécifiquement, DDX21 connecte la transcription du pré-ARNr avec la maturation, et facilite l'accès des snoRNP d'action tardive aux complexes de la pré-40S (77,78), Chez l'humain, le rôle exact d'EBP2 n'a pas été démontré, mais il a été constaté que l'inhibition de la transcription par l'ARN Pol I augmente sa mobilité dans le nucléole, suggérant qu'elle pourrait être associée aux pré-ARNr comme protéine d'échafaudage pendant la biogenèse des ribosomes (79). Ceci évoque l'existence d'un stress nucléolaire et de défauts de la biogenèse des ribosomes associés à la diminution des protéines nucléolaires.

En faisant des marquages par impulsions de l'ARNr, nous avons pu observer une diminution de la synthèse totale de l'ARNr dans les cellules sénescents induites par l'oncogène *ras*, par le suppresseur de tumeur PML et dans les cellules sénescents répliquatives, par rapport aux cellules infectées par un vecteur contrôle ou par rapport aux jeunes cellules (80).

Nous avons constaté que, non seulement la synthèse, mais aussi la maturation de l'ARNr était compromise dans la sénescence. Par hybridation de type Northern et à l'aide des différentes sondes complémentaires aux régions ITS1 et ITS2 (*Internal transcribed spacer 1 or 2*) des gènes ribosomiques, nous avons montré une accumulation du précurseur 47S dans les cellules sénescents avec l'oncogène *ras* ainsi que dans de vieilles cellules (80). Nous avons également observé une diminution des précurseurs de l'ARNr 40S tandis que les précurseurs de l'ARNr 60S s'accumulaient lors de la sénescence. Ceci implique un débalancement dans la synthèse des différentes sous-unités du ribosome.

Malgré le stress nucléolaire, la traduction globale n'est pas diminuée dans la sénescence (81). Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'activation aberrante de la voie de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), qui de plus, n'est pas sensible au manque d'acides aminés ou de sérum à

cause, en partie, de la dépolarisation de la membrane plasmique (82). De plus, l'autophagie augmentée fournit des acides aminés pour la synthèse protéique. La **Figure 4** résume les principales caractéristiques des cellules sénescentes.

Ce déséquilibre entre la diminution de la maturation des ARNr et la traduction active dans la sénescence a comme conséquence, en partie, la délocalisation dans le noyau de certaines protéines ribosomiques. RPL29/eL29, par exemple, s'accumule dans le nucléole des cellules sénescentes induites par PML, *ras*, les cellules sénescentes répliquatives ou induites par la camptothécine. RPS14/uS11 s'accumule également dans le nucléoplasme des cellules sénescentes (80). Cette accumulation en dehors des sous-unités ribosomiques nous ont conduits à approfondir l'implication de ces protéines dans les cellules sénescentes. Nous apporterons une attention particulière aux protéines ribosomiques dans les sections qui suivent.

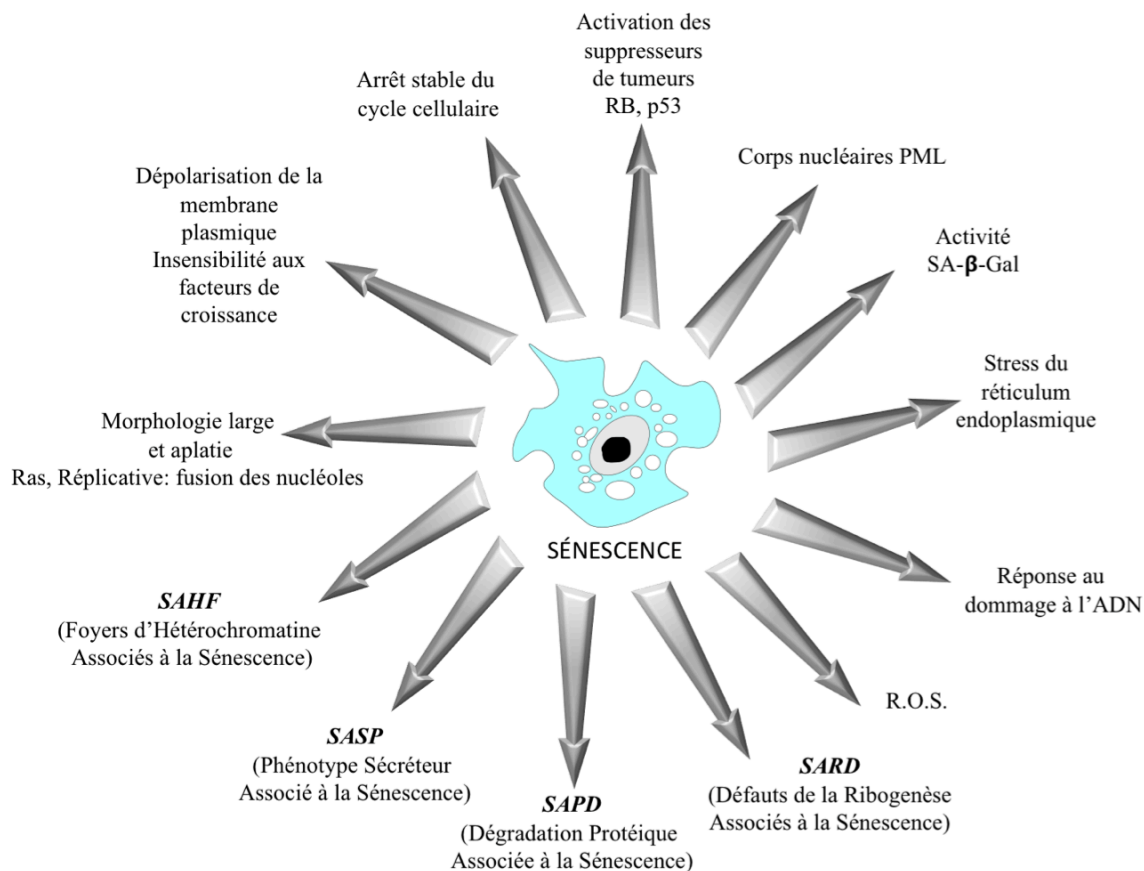


Figure 4. Caractéristiques des cellules sénescentes

La figure résume les caractéristiques principales des cellules sénescentes dont le phénotype résulte de la combinaison de différentes caractéristiques. La complexité du phénotype sénescence peut varier selon le facteur inducteur de la sénescence, le niveau de stress ainsi que le type de cellule.

1.2.3. Protéines ribosomiques en tant que suppresseurs de tumeurs

Plusieurs protéines ribosomiques exercent des fonctions indépendantes de leurs rôles en tant que composantes du ribosome, et ces fonctions sont potentiellement liées à la suppression tumorale. RPL5/uL18, RPL11/uL5, RPL6/eL6, RPL23/uL24, RPS3/uS3, RPS7/eS7, RPS15/uS19, RPS25/eS25, RPS26/eS26, RPS27/eS27, RPS27a/eS31, RPS27L/eS27 like, RPL37/eL37, RPL22/eL22 et RPS14/uS11, connectent le stress nucléolaire à l'activation de la voie de p53 pour induire l'arrêt cellulaire, l'apoptose ou la sénescence (83-88) (**Figure 5**).

Les gènes de plusieurs protéines ribosomiques sont souvent mutés, supprimés ou dérégulés dans différents types de cancer. Par exemple, des mutations dans RPL5/uL18, RPL11/uL5, RPL15/eL15, RPL26/uL24, RPL31/eL31, RPL36A/eL42, RPS7/eS7, RPS10/eS10, RPS17/eS17, RPS19/eS19, RPS24/eS24, ou RPS26/eS26 sont trouvées dans la ribosomopathie congénitale, causant l'anémie de Diamond-Blackfan (DBA) ainsi qu'une incidence accrue de cancers chez les patients souffrant de cette maladie (89-93). RPL22/eL22 est fréquemment mutée ou supprimée dans des cancers tels que les cancers endométriaux, gastriques et colorectaux (94,95). Chez les souris, la perte partielle de RPL22/eL22 accélère la lymphomagenèse (96). De plus, elle est inactivée mono-alléliquement dans environ 10% de leucémies lymphoblastiques aiguës à cellules T (T-ALL) (94).

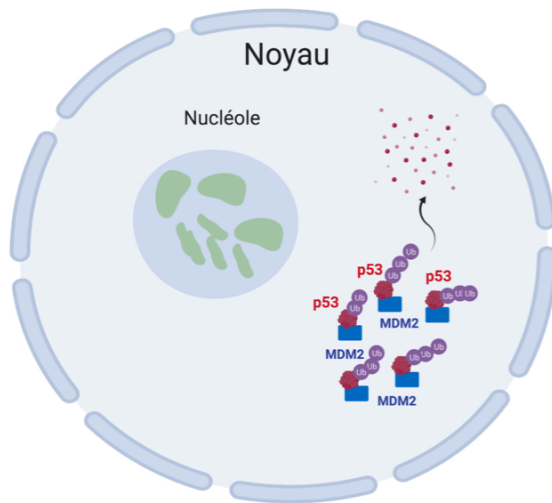
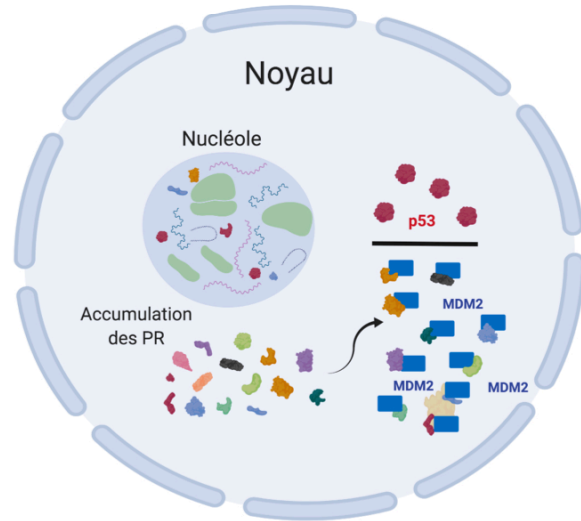
A**B**

Figure 5. Stabilisation de p53 via des protéines du ribosome

(A) Dans des conditions sans stress nucléolaire, où la biogenèse des ribosomes s'effectue normalement, p53 est rapidement lié par MDM2. MDM2 agit comme une ubiquitine ligase E3 facilitant la dégradation de p53 dépendante de l'ubiquitination et du protéasome. **(B)** Lors d'un stress nucléolaire où la ribogenèse est perturbée, une plus grande quantité de protéines ribosomiques (PR) reste libre pour se lier à MDM2, ce qui soulage son activité inhibitrice vis-à-vis de p53 et permet à p53 de s'activer pour induire l'arrêt cellulaire, l'apoptose ou la sénescence.

1.2.3.1. Fonctions particulières de RPS14/uS11 et RPL22/eL22

Les protéines ribosomiques jouent un rôle structural et potentiellement régulateur dans ce complexe macromoléculaire qui est le ribosome. Or plusieurs études corroborent que les fonctions de ces protéines, telles que RPS14/uS11 et RPL22/eL22, ne ciblent pas exclusivement les ribosomes. Dans notre laboratoire nous avons observé que l'activité catalytique de CDK4 était importante pour le contournement de la sénescence lors de la déplétion du facteur RSL1D1 (80).

Dans ces cellules sénescentes, nous avons identifié par spectrométrie de masse, non seulement RPS14/uS11, mais aussi RPL22/eL22, comme partenaire ou régulateur potentiel de CDK4.

Nous avons montré que RPS14/uS11 forme des complexes avec CDK4 et la Cycline D1, et que son expression, à des niveaux modérés, active la voie de RB et l'établissement de la sénescence. De plus, ce mécanisme est indépendant de la voie de p53 (80).

RPL22/eL22, aussi identifiée comme régulateur potentiel de CDK4, est une protéine de surface de la sous-unité 60S qui s'associe tardivement au ribosome lors de sa maturation (97). La délétion ou mutation de RPL22/eL22 n'affecte pas la viabilité de la cellule, mais au contraire, cette affectation est souvent trouvée chez différents types de cancer. Un effet de compensation suite à la délétion de RPL22/eL22 a été observé chez des souris RPL22/eL22 nulles. Cette compensation est due à l'expression augmentée du paralogue de RPL22/eL22: RPL22-like 1, dont le messenger est directement réprimé par RPL22/eL22 lui-même (98). Malgré le haut degré d'homologie que partagent RPL22/eL22 et RPL22-like 1, et leurs rôles équivalents dans la traduction des protéines, elles présentent des fonctions uniques. Wiest et collègues ont observé un rôle antagoniste de RPL22/eL22 et de RPL22-like 1 lors du développement hématopoïétique chez le poisson zèbre. Plus précisément, RPL22/eL22 semble être critique lors du développement des progénitures des cellules T $\alpha\beta$ après leurs implantations dans le thymus. Cependant, RPL22/eL22 réprime l'expression de Smad1 (*Mothers Against Aecantaplegic Homolog 1*) et l'apparition de cellules souches hématopoïétiques (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*). RPL22-like 1, au contraire, se lie directement à l'ARNm de Smad1 pour stimuler sa traduction, ce qui facilite l'apparition des HSCs (99). L'équilibre entre l'expression de RPL22/eL22 et celle de son paralogue semble important, non seulement lors du développement mais aussi lors de la transformation maligne. Il est à noter que le gène de RPL22-like 1, se trouve dans le locus 3q26 chez l'humain, qui est souvent amplifié dans des cancers tels que les leucémies, les cancers d'ovaire, du poumon, du foie ou du sein (100,101). Le gène de RPL22/eL22 réside dans le locus 1p36, qui contient aussi plusieurs suppresseurs tumoraux, et est souvent supprimé dans plusieurs types de cancer (94,102).

Le rôle physiologique de RPL22/eL22 est peu connu. Cette protéine de liaison à l'ARN n'est pas indispensable pour la biogenèse du ribosome, ni pour la traduction cap-dépendante (103). Cependant, elle a des implications spécifiques à certains tissus. Il a été déterminé que

RPL22/eL22 peut être considérée comme un suppresseur de tumeur haploinsuffisant dans la leucémie T-ALL. Si la perte d'une copie du gène n'affecte pas le développement normal des cellules T chez les souris, elle accélère le développement des lymphomes thymiques dans des modèles de souris T-ALL, à travers l'activation de la voie de NF- κ B et sa cible: le facteur à caractère «souche» (*stemness factor*) Lin28B (104). L'inactivation bi-allélique de RPL22/eL22, jusqu'à maintenant seulement observée dans des tumeurs solides (95), accélère également la lymphomagenèse, par contre, le comportement est différent de son inactivation mono-allélique. Cette inactivation bi-allélique favorise la formation de masses médiastinales, mais le développement et la progression vers les organes périphériques sont restreints. Il est suggéré que ce défaut de dissémination vers les organes périphériques est causé par la diminution, associée à la double inactivation de RPL22/eL22, d'une des cibles du facteur de transcription Klf2 (*Kruppel-like factor 2*): S1PR1 (*Sphingosin-1-Phosphate Receptor 1*), impliquée dans la migration cellulaire (105).

Le syndrome 5q (délétion interstitielle du chromosome 5q), est une maladie caractérisée par une anémie sévère et une faible vitesse de progression vers la leucémie myélogène (106). L'haploinsuffisance de RPS14/uS11 joue un rôle dans ce syndrome (107). De plus, RPS14/uS11 est impliquée dans l'inhibition de CDK4-Cycline D1, ce qui suggère que l'haploinsuffisance de RPL22/eL22 pourrait, en partie, avoir également son effet par l'intermédiaire d'un déséquilibre de la régulation de CDK4 et de la voie de RB. Par ailleurs, le fait que ces protéines se trouvent en dehors des ribosomes, suggère que ceux-ci auraient une composition différente dans les cellules sénescentes, ayant des répercussions au niveau de leur capacité de traduction.

Au cours des dernières années, des nombreuses études ont mis en lumière le concept de ribosomes spécialisés. Les évidences montrant l'hétérogénéité dans la composition des ribosomes dérivent des ribosomopathies causées par l'haploinsuffisance de gènes codant pour les protéines ribosomiques. La perte de l'expression de ces protéines ribosomiques peut avoir un impact sur la traduction de certains ARNm, affectant sélectivement des organes ou des tissus

(108). La composition protéique des ribosomes n'est pas le seul facteur d'hétérogénéité. Les modifications de l'ARNr sont également une source de variabilité qui peut affecter la traduction. Dans la prochaine section nous nous concentrerons sur le fonctionnement du ribosome lors de la traduction.

1.3. Quelques données sur le fonctionnement du ribosome eucaryote

Le ribosome possède trois sites de liaison pour les ARNt: le site A, dans lequel va se placer un aminoacyl-ARNt (aa-ARNt); le site P, destiné à un peptidyl-ARNt (pept-ARNt) et le site E, pour les ARNt désaminoacylés. Ces sites de liaison sont composés principalement par les ARNr dont les séquences sont conservées. Ceci suggère que le mécanisme par lequel le ribosome distingue un aa-ARNt correct d'un aa-ARNt non-correct est aussi conservé entre espèces (109).

La traduction des protéines est divisée en 4 étapes: Initiation, élongation, terminaison et recyclage. Ces étapes sont orchestrées par des facteurs de traduction indiqués dans le **Tableau 2** (110).

Tableau 2. Facteurs de traduction

ÉTAPE DE LA TRADUCTION	FACTEURS DE TRADUCTION
<i>Initiation</i>	eIF1A, 5B, 1, 2 α , 2 β , 2 γ , 2B α , 2B β , 2B γ , 2B δ , 2B ϵ , 3
	(13 sous-unités), 4A, 4B, 4F (4E, 4G, 4H), 5, 6, PABP
<i>Élongation</i>	eEF1A, eEF1B (2 ou 3 sous-unités), eEF2
<i>Terminaison</i>	eRF1, eRF3, eIF5a
<i>Recyclage</i>	ABCE1, eIF3, eIF3j, eIF1A, eIF1; eIF2D (111)

1.3.1. Initiation de la traduction

Le processus de traduction dans les eucaryotes commence par le recrutement de la petite sous-unité 40S associée aux facteurs d'initiation eIF1A et eIF3 (112). Ceci est suivi par la liaison du complexe Met-ARN_{ti}^{Met} /eIF2-GTP, et du facteur eIF1, formant ensemble le complexe de pré-initiation 43S. Le recrutement de 43S a lieu à proximité de la coiffe ou cap 7-méthyl-guanosine, à l'extrémité 5'UTR (*untranslated region*) de l'ARNm. Cette coiffe interagit avec un facteur d'initiation trimérique, eIF4F (eIF4G, eIF4A, eIF4E), dont la présence est requise pour la liaison de 43S (113). Le facteur eIF5 s'associe au complexe 43S. Celui-ci balaie ensuite l'ARNm jusqu'à la reconnaissance du codon initiateur AUG, permettant la formation du complexe de pré-initiation 48S.

Le codon AUG est intégré dans la séquence consensus de Kozak 5'-GCCRCCAUGG-3'. Des mutations de la purine R dans le troisième nucléotide avant AUG et de la G après AUG peuvent réduire jusqu'à dix fois l'efficacité de l'initiation de la traduction (114). Le complexe de pré-initiation continue donc le balayage jusqu'à reconnaître le prochain AUG optimal. Ce phénomène est appelé *leaky-scanning* (115). D'autre part, il peut exister des codons d'initiation non-AUG qui donnent plus de flexibilité aux mécanismes alternatifs d'initiation de la traduction (115).

La formation du complexe 48S dépend de l'hydrolyse d'eIF2-GTP en eIF2-GDP + Pi, suivie par la libération des autres facteurs d'initiation et le positionnement du Met-ARN_{ti}^{Met} sur le site P de la sous-unité 40S. Cette réaction est stimulée par le facteur eIF5 (112). Le recyclage du complexe eIF2-GDP est effectué par eIF2B, qui catalyse la conversion du GDP en GTP permettant au complexe eIF2-GTP de reconnaître le Met-ARN_{ti}^{Met}. Le recrutement de la sous-unité 60S au complexe de pré-initiation, par médiation de l'hydrolyse du GTP lié au facteur eIF5B, permet la formation du ribosome 80S (**Figure 6**).

Il existe un mécanisme d'initiation de la traduction différent de cette initiation dite cap-dépendante: c'est l'initiation de la traduction IRES (site d'entrée interne du ribosome)-dépendante, que l'on rencontre dans certains virus et aussi certains messagers cellulaires (116,117). Elle consiste en une liaison directe du complexe 43S sur l'IRES, à l'intérieur de l'ARNm, indépendamment de la coiffe et sans interaction avec le facteur d'initiation eIF4F (118).

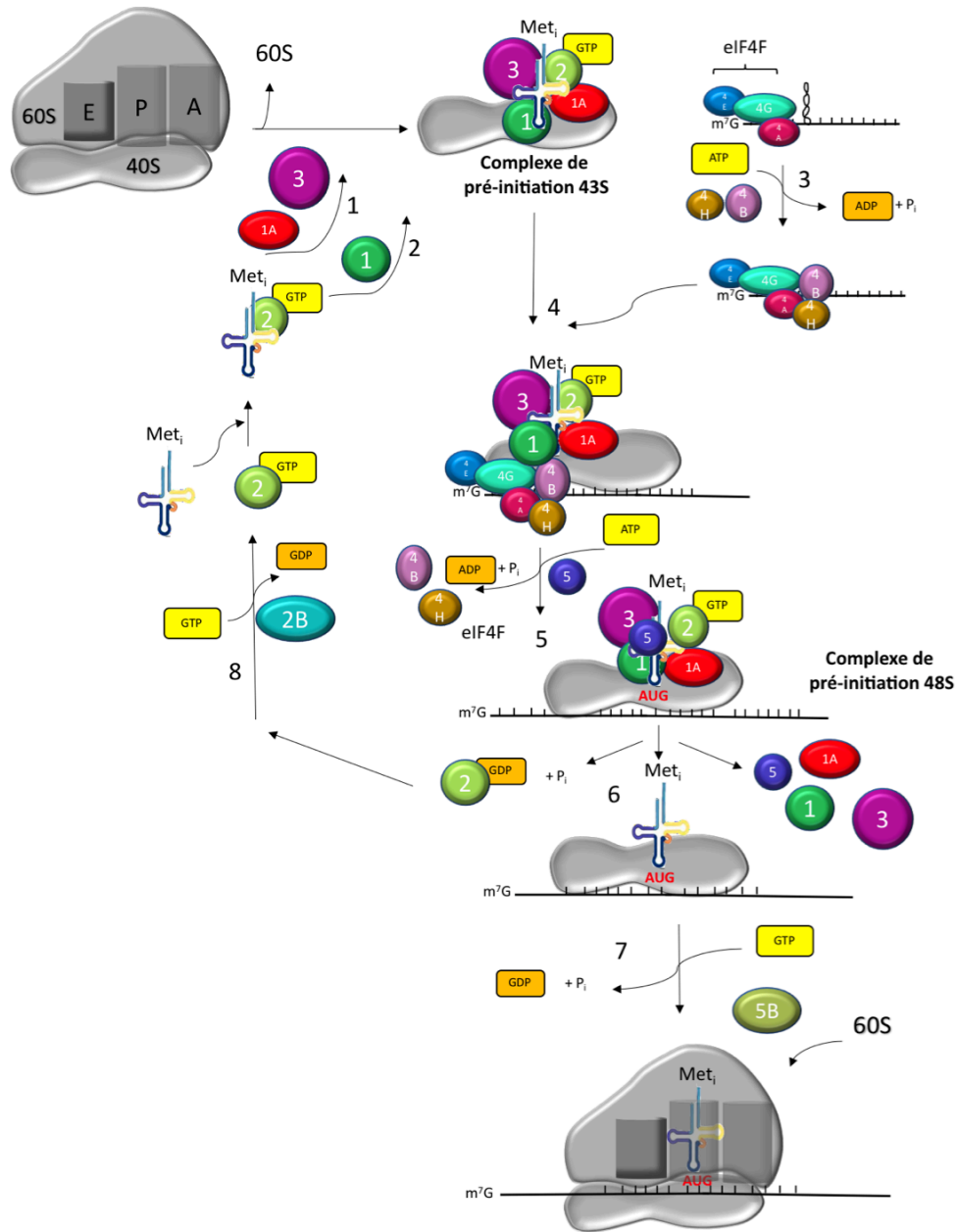


Figure 6. Initiation de la traduction eucaryote

La figure représente une brève description de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes, l'étape critique lors de la biosynthèse des protéines. 1 et 2- Recrutement de la sous-unité 40S associée aux facteurs eIF1A et eIF3, suivi de la liaison du facteur eIF1 et du complexe Met-ARNt^{Met}/eIF2-GTP pour former le complexe de pré-initiation 43S. 3- Reconnaissance de la coiffe ou cap 7-méthyl-guanosine par le facteur trimérique eIF4F. Les facteurs eIF4B et eIF4H s'associent au complexe et stimulent le décompactage de l'ARNm. 4- Recrutement de la sous-unité 40S sur l'ARNm. 5- Le facteur eIF5 rejoint la sous-unité 40S et l'ARNm pour former le complexe de pré-initiation 48S et le balayage de l'ARNm jusqu'à la reconnaissance du codon d'initiation. 6- La formation du complexe 48S stimule l'hydrolyse du GTP en GDP et Pi du facteur eIF2 et la libération de tous les facteurs d'initiation. 7- Association de la sous-unité 60S dépendante de l'hydrolyse du GTP par médiation du facteur eIF5B. 8- Recyclage du facteur eIF2 par l'entremise du facteur eIF2B.

1.3.2. Élongation de la traduction

L'étape suivante, l'élongation, se divise en trois sous-étapes: le placement d'un aa-ARNt au site d'entrée suivi de son positionnement au site A; la transpeptidation, où la chaîne en croissance liée à l'ARNt au site P est transférée sur le résidu aminoacylé de l'aa-ARNt du site A du ribosome, avec la formation d'un lien peptidique; et, finalement, la translocation, dans laquelle les ARNt du site A et P sont transloqués vers les sites P et E respectivement, entraînant l'ARNm (115). Dans cette étape d'élongation, divers facteurs d'élongation sont impliqués, (**Figure 7**).

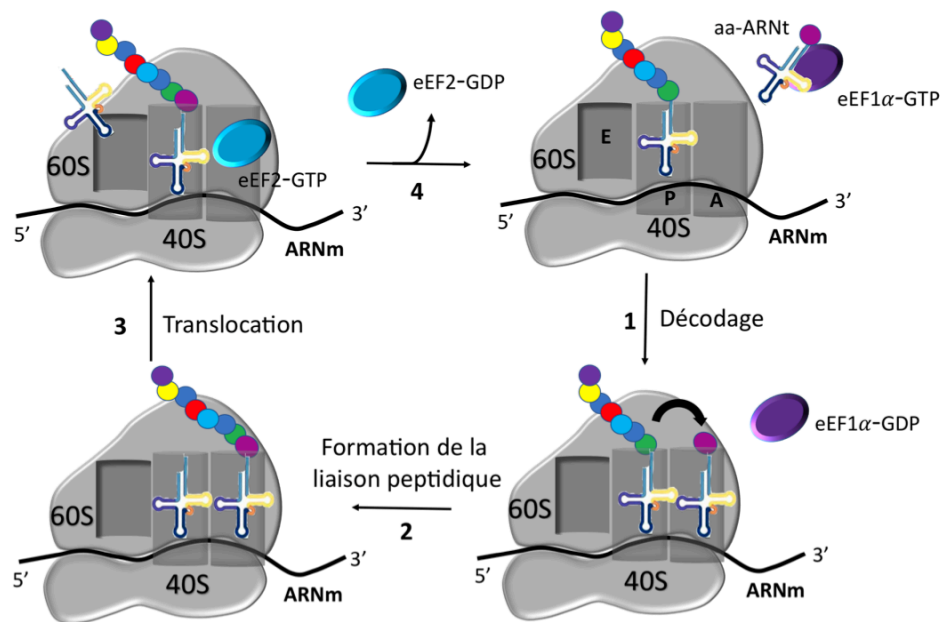


Figure 7. Élongation de la traduction eucaryote

1- Le complexe ternaire eEF1 α -GTP lie l'aa-ARNt au site d'entrée du ribosome et dirige la reconnaissance correcte entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt. Suite au changement de conformation de la 40S, eEF1 α -GTP est activé et l'hydrolyse de GTP en GDP s'effectue, permettant ainsi le placement au site A de l'aa-ARNt. Le facteur eEF1 α -GDP sera recyclé en eEF1 α -GTP par le facteur eEF1B. 2- La chaîne en croissance liée à l'ARNt au site P est transférée sur le résidu aminoacylé de l'aa-ARNt du site A avec la formation de la liaison peptidique. 3- Les ARNt du site A et P sont transloqués vers les sites P et E respectivement. La translocation requiert le facteur eEF2-GTP. 4- Le facteur eEF2-GDP est libéré, le site A du ribosome est à nouveau disponible pour continuer le processus d'élongation.

L'ARNt se lie d'abord au site d'entrée. Il a été montré que l'ARNt dont l'anticodon correspond au codon du messager (ARNt correct ou cognate) induit un changement dans la structure du ribosome. Ceci provoque l'activation de la GTPase d'eEF1-A et la liaison de l'aa-ARNt dans le site A (119). Au contraire, les ARNt pour lesquels l'appariement codon-anticodon est incorrect n'induisent pas de changement et sont rejetés. Notons que si l'aa-ARNt est presque correct, il peut induire le changement de conformation et l'hydrolyse du GTP, mais à une vitesse tellement réduite que cela empêche sa liaison efficace au site A. Il est donc aussi rejeté. Des études sur le mécanisme de traduction chez les bactéries, ont démontré que l'interaction codon-

anticodon entre l'ARNm et l'ARNt, ainsi que la discrimination des aa-ARNt non-corrects sont contrôlées par trois bases conservées de l'ARNr 16S de la petite sous-unité. Ces nucléotides sont la guanine 530 (G530), l'adénine 1492 (A1492) et l'adénine 1493 (A1493). Chez l'humain, ces bases conservées correspondent à G626, A1824 et A1825 (120) (**Figure 8**).

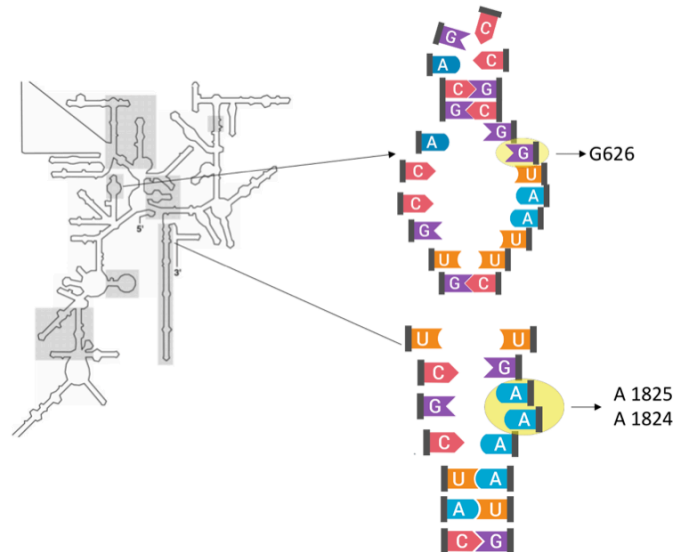


Figure 8. Bases conservées de l'ARNr 18S chez l'humain

La reconnaissance des aa-ARNt est contrôlée par les trois bases universellement conservées (G626, A1824, A1825) dans l'ARNr 18S. Elles sont requises pour la reconnaissance correcte entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt. Des mutations sur ces bases compromettent la viabilité cellulaire.

La formation de la liaison peptidique est catalysée par l'activité peptidyl-transférase du ribosome au cours de la sous-étape de transpeptidation. Elle est suivie, comme nous l'avons dit, par la translocation, qui nécessite la participation d'un facteur d'élongation, eEF2, et l'hydrolyse du GTP (115).

1.3.3. Terminaison de la traduction et recyclage

La traduction se termine lors de l'entrée d'un codon d'arrêt dans le site A du ribosome, qui est reconnu par le domaine N-terminal du facteur 1 de terminaison (eRF1) et par le facteur de

terminaison 3 (eRF3) qui possède une activité GTPase (121). La structure tridimensionnelle d'eRF1 ressemble à celle d'un aa-ARNt, dont le N-terminal simule le bras de l'anticodon de l'ARNt et reconnaît les trois codons d'arrêt (UGA, UAG, UAA) dans le site A du ribosome. ERF1 catalyse l'hydrolyse de la liaison entre la chaîne peptidyle et l'ARNt. Le domaine C-terminal d'eRF1 interagit avec le domaine N-terminal du facteur eRF3 et le facteur de recyclage ABCE1 (122,123). L'interaction d'eRF1 avec les codons d'arrêt induit un changement de conformation qui permet au codon d'arrêt, plus le nucléotide en aval, d'occuper le site A du ribosome (124). Pour cette raison, il est proposé que l'identité du nucléotide suivant le codon d'arrêt serait importante pour l'efficacité de terminaison de la traduction (125). Après la reconnaissance par eRF1 du codon d'arrêt, eRF3a hydrolyse le GTP en GDP et se dissocie du ribosome (126). Ceci permet la stimulation de l'activité d'eRF1 grâce au placement du motif conservé CCQ de son domaine M sur le centre peptidyl PTC du site A (123,127). En conséquence, eRF3 améliore l'efficacité de terminaison. ABCE1, qui est une ATPase, peut ensuite se lier au complexe ribosome-eRF1 pour stimuler la libération du nouveau peptide synthétisé (128). La traduction se termine souvent par la dissociation et le recyclage du ribosome qui est stimulé par l'ATPase ABCE1 (**Figure 9**). ABCE1 favorise également la libération du nouveau peptide synthétisé (128). Cependant, après la dissociation des sous-unités ribosomiques, l'ARNt désacétylé reste encore lié à la sous-unité 40S. Deux mécanismes ont été rapportés lors de l'éjection de l'ARNt désacétylé suite à la dissociation de la sous-unité 40S: l'un est orchestré par des facteurs d'initiation canoniques; l'autre est exercé par le facteur eIF2D (129). Récemment, d'autres facteurs d'initiation impliqués dans la terminaison de la traduction ont été mis en évidence. À titre d'exemple, Schuller et collègues ont découvert un nouveau rôle du facteur eIF5a. Ils suggèrent que le facteur eIF5a est essentiel lors de la stimulation de l'hydrolyse du peptidyl-ARNt par eRF1. Plus précisément, des données de profilage des ribosomes ont montré que lorsque eIF5a est supprimé, la densité ribosomique sur la région 3'UTR de plusieurs messagers augmente, suggérant l'inefficacité de terminaison de la traduction. Ils ont aussi démontré que ces ribosomes occupant la région en 3'UTR traduisaient encore les messagers, potentiellement via un mécanisme de translecture du codon d'arrêt (130).

Un processus de ré-initiation peut avoir lieu après la traduction d'une séquence courte comprise dans la région 5'UTR, contenant un codon d'initiation et de terminaison, connue comme uORF (*upstream Open Reading Frame*) (131). Les uORF précèdent ou chevauchent les séquences codantes ou CDS (*Coding DNA sequence*) de la protéine canonique. Leur traduction résulte souvent en une diminution de l'expression de la protéine canonique (132,133).

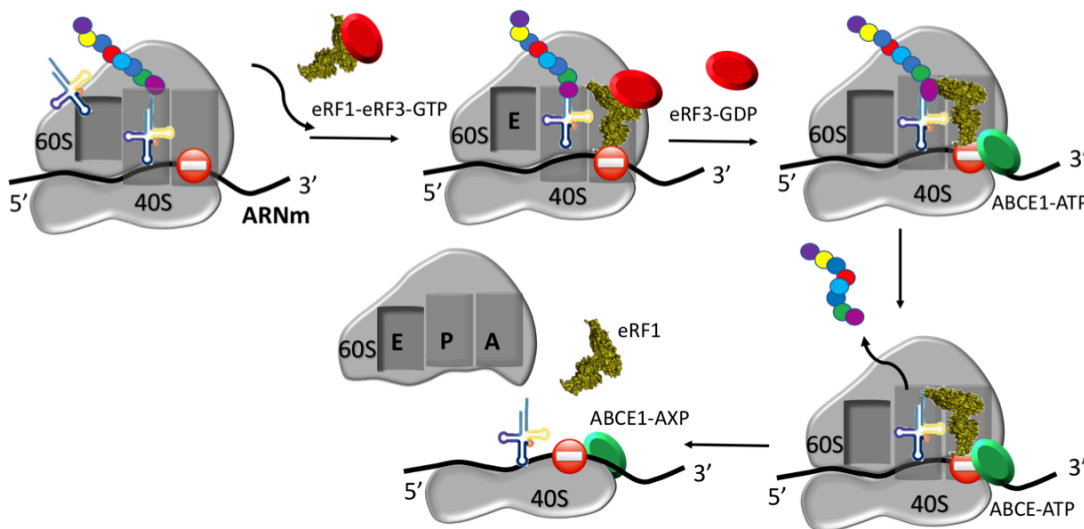


Figure 9. Terminaison de la traduction et recyclage

Les facteurs eRF1 et la GTPase eRF3 entrent au site A du ribosome. eRF1 reconnaît le codon d'arrêt (UGA,UAG,UAA), l'hydrolyse du GTP permet la libération d'eRF3 ainsi que la stimulation de l'activité d'eRF1. La liaison du facteur de recyclage ABCE1-ATP facilite le bon placement d'eRF1 et l'hydrolyse de la liaison entre le peptide synthétisé et l'ARNt auquel il était lié. La traduction se termine par la dissociation et le recyclage du ribosome.

1.4. Erreurs de traduction

La fréquence d'erreurs lors de la réplication est très faible. Les erreurs peuvent être de l'ordre de 0.5×10^{-9} /site par réplication de l'ADN dans les bactéries, et de 1.6×10^{-9} dans les eucaryotes (134). Paradoxalement, en dépit d'une fine régulation, la traduction constitue l'étape de la biosynthèse des protéines la plus sujette aux erreurs. La reconnaissance incorrecte d'un

aa-ARNt par le ribosome constitue une des causes principales des erreurs de traduction. En effet, les codons qui correspondent aux ARNt peu abondants risquent de provoquer plus d'erreurs de reconnaissance que les autres codons (135). Dans les bactéries et les levures, cette fréquence d'erreurs varie entre 10^{-3} et 10^{-4} par codon (136).

Le changement du cadre de lecture (*frameshift*) constitue une autre source d'erreurs (137). Son mécanisme consiste en un glissement du ribosome, au hasard, d'une base vers l'extrémité 5' (*frameshift* -1) ou 3' (*frameshift* +1) de l'ARNm. Ce type d'erreurs ou *frameshift* aléatoire a une fréquence d'erreurs estimée à 3×10^{-5} chez les bactéries, et les peptides résultant de ces changements aléatoires du cadre de lecture sont non-fonctionnels (138). Un deuxième mécanisme de production des peptides hors du cadre de lecture est le *frameshift* programmé. Contrairement au *frameshift* aléatoire, le glissement du ribosome se produit en un site précis et non au hasard dans l'ARNm. Ce *frameshift* régule l'expression des gènes et code pour des protéines fonctionnelles (138). Fréquemment, les *frameshifts* programmés se produisent sur une séquence «glissante» constituée d'environ 4 à 7 nucléotides, suivie d'une structure secondaire de l'ARN en forme de pseudo-nœud ou en tige-boucle. Un exemple de *frameshift* programmé +1 se trouve dans le messenger de l'antizyme de l'ornithine décarboxylase (OAZ) qui contrôle négativement l'enzyme ornithine décarboxylase (ODC) (139). L'ODC catalyse la décarboxylation de l'ornithine, à partir de laquelle se forment des polyamines telles que la putrescine, la spermidine et la spermine. Chez tous les eucaryotes, le messenger de l'OAZ contient un codon d'arrêt au début de sa région codante, résultant en la traduction d'un peptide sans activité. Lors d'une augmentation dans des niveaux de polyamines, il y a une stimulation du *frameshift* +1 juste avant le codon d'arrêt induisant la synthèse de l'antizyme active. L'antizyme active inhibe l'ODC et donc, la production des polyamines.

Un exemple de *frameshift* programmé -1 est la production de la polyprotéine Gag-Pol du VIH-1 (140,141). La séquence codante du gène *POL* se trouve dans un cadre de lecture -1 par rapport à la séquence codante de *GAG*. Cet événement de *frameshift* permet la synthèse de la protéine Gag-Pol dont le début est identique à Gag (précurseur des protéines de structure du virus) mais

qui, après le *frameshift*, est le précurseur des protéines enzymatiques du VIH-1. Le *frameshift* contrôle le rapport Gag-Pol/Gag. Il assure également l'incorporation d'enzymes virales lors de l'assemblage du virus, grâce à la fusion de la séquence de Pol à Gag (142).

1.4.1. La translecture du codon d'arrêt

Dans certaines situations, il peut se produire des erreurs dans la terminaison de la traduction nommées la translecture du codon d'arrêt. Durant la translecture ou *readthrough*, un ARNt qui reconnaît un codon différent d'UGA, UAG ou UAA par une base, peut insérer un acide aminé au codon d'arrêt et continuer la traduction jusqu'au prochain codon d'arrêt (143). La fréquence de cette erreur est de l'ordre de 10^{-3} par codon chez les bactéries et chez les levures (136,144). La fréquence de translecture pourrait être affectée selon le type de codon d'arrêt, par exemple, le codon UGA serait le plus propice à «permettre» la translecture tandis que le codon UAA serait le moins propice (145). D'autres facteurs modulateurs de l'efficacité de translecture sont la concentration des facteurs de terminaison (146), les aa-ARNt-presque corrects en compétition avec les facteurs de terminaison pour le site A du ribosome (147), l'identité du nucléotide en aval du codon d'arrêt, ainsi que la structure secondaire de l'ARNm englobant le site d'arrêt, entre autres (148).

Il existe une translecture du codon d'arrêt programmée ainsi qu'une translecture qui, apparemment, se manifeste spontanément (149). Cette dernière est connue comme translecture basale (150). Dans certains génomes viraux; par exemple, dans les virus de la mosaïque du tabac et le rétrovirus murin Moloney (MMuLV), et dans des gènes cellulaires; par exemple, dans l'*E. coli* entéro-toxigénique (ETEC), il peut se produire une translecture programmée et non aléatoire des messagers tels que le cistron de la sous-unité réplisase pour le virus de la mosaïque du tabac, du messenger de Gag-Pol, pour MMuLV, ou du messenger de l'antigène de surface CS3 (*Coli Surface Antigen*) dans le cas d'ETEC (148). Ce mécanisme programmé, grâce auquel le peptide va continuer à être synthétisé en dépit du codon d'arrêt, joue un rôle important dans la régulation génique de ces entités. Les rétrovirus utilisent le *frameshift* et la translecture

programmés afin de maintenir une proportion Gag/Gag-Pol précise (151,152). La région du codon d'arrêt du messenger de MMuLV, par exemple, adopte une conformation en pseudo-nœud 8 nucléotides en aval du codon d'arrêt UAG du gène *GAG*. Il a été démontré qu'à des pH physiologiques ce pseudo-nœud forme une conformation qui permet la translecture (Gag-Pol est traduit) dans 6% de la population de messagers viraux, tandis que 94% de la population adopte une conformation non permissive pour la translecture. Ceci est corrélé avec la proportion précise des protéines virales Gag/Gag-Pol produites *in vivo* (153).

Dans certains champignons, il a été trouvé que des enzymes glycolytiques, telles que la glyceraldéhyde-3'-phosphate déshydrogénase (GAPDH), la lactate déshydrogénase (LDH) et la 3'-phosphoglycerate kinase (PGK) ne résident pas seulement dans le cytoplasme mais aussi dans les peroxysomes. Ce phénomène est dû à l'ajout d'une région en C-terminal après la translecture du codon d'arrêt contenant des signaux de ciblage peroxisomal du type 1 ou PTS1 (*peroxisomal targeting signal type 1*). Cette nouvelle région ajoutée est la cible des peroxines, telles que Pex5p (154), qui permettent l'import des protéines vers les peroxysomes (150). La translecture est aussi présente chez les métazoaires, révélant que ce mécanisme est plus répandu qu'on ne le pensait auparavant (155,156). Des analyses phylogénétiques réalisées chez *Drosophila melanogaster* ont permis l'identification de 283 gènes contenant des signatures des séquences conservées potentiellement stimulatrices de la translecture (143). De plus, des expériences de profilage des ribosomes ont également contribué à l'identification de 300 évènements dus à la translecture chez *Drosophila*, ainsi qu'à celle de 42 candidats non prédits par des approches phylogénétiques, dans des fibroblastes humains (156). La fréquence de translecture non programmée est généralement estimée à moins de 1% des protéines allongées en C-terminal. Étonnamment, quatre messagers ont été identifiés dont l'efficacité de translecture varie entre 6 et 17 % chez les mammifères. Ces gènes: AQP4, OPRL1, OPRK1 et MAPK10, contiennent la séquence UGACUAG dans la région du codon d'arrêt, qui est très conservée chez les vertébrés (155). Le messenger du gène humain SACM1L se caractérise par une structure secondaire en tige-boucle en 3' très conservée, ainsi que par un fort potentiel de stabilité de conformation de cette tige boucle (157). Cependant, l'efficacité de translecture est faible, signalant l'importance du contexte nucléotidique, et non la structure secondaire, dans la fréquence de translecture basale (155).

La perturbation des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr peut également provoquer l'incorporation incorrecte des acides aminés, la translecture des codons d'arrêt, ainsi qu'un changement du mode d'initiation de la traduction (coiffe-dépendante versus IRES-dépendante) (158-160). Dans la levure, la perte de certaines modifications sur les sites A et P du ribosome peut causer la réduction de la vitesse d'incorporation d'acides aminés ainsi qu'un déficit des petites sous-unités libres (67). D'autre part, des études ont révélé une relation étroite entre l'augmentation des méthylations post-transcriptionnelles sur le ribose à des endroits spécifiques de l'ARNr 28S, et l'agressivité accrue constatée dans des cellules du cancer de sein (61).

Des ARNm contenant des mutations non-sens qui ajoutent un codon d'arrêt prématuré, sont des cibles des ribonucléoprotéines qui transportent ces messagers dans des corps P (*Processing bodies*) du noyau au cytoplasme. Dans le cytoplasme, les messagers sont dégradés par un mécanisme connu comme décroissance induite par l'ARNm non-sens (NMD: *non-sense mediated mRNA decay*) (161,162). Divers facteurs tels que les protéines UPF (*Up-frameshift proteins*) participent dans le mécanisme de NMD (163). Récemment, il a été démontré que les facteurs UPF sont requis pour la translecture des codons d'arrêt prématurés chez l'humain dans des compartiments cytoplasmiques nommés *readthrough bodies* (164).

1.4.2. La translecture du codon d'arrêt et le cancer

Un ensemble d'observations mettent en évidence l'effet nuisible de hauts niveaux d'erreurs de traduction. À titre d'exemple, un taux élevé d'erreurs provoque une dysfonction mitochondriale chez la levure, réduit la durée de vie chez les mouches et cause des maladies neurodégénératives et cardiovasculaires chez les mammifères (165-168). Paradoxalement, il a été trouvé que certaines bactéries profitent des erreurs de translecture pour survivre sous des conditions de stress et s'adapter à un nouvel habitat (169). Tel pourrait être le cas pour les cellules cancéreuses, lesquelles s'adaptent à un coût évolutif très bas à un environnement hostile par manque d'oxygène et de nutriments.

Des quantités anormalement augmentées de la lactate déshydrogénase B (LDHB) et la malate déshydrogénase 1 (MDH1) allongées en C-terminal ont été trouvées dans les peroxysomes des cellules de glioblastome U118 (149). Cette augmentation favorisant le métabolisme dans les peroxysomes pourrait être avantageuse pour les cellules cancéreuses, ou pourrait simplement être une conséquence d'une perturbation associée à la capacité des cellules cancéreuses de prioriser la glycolyse et la fermentation lactique plutôt que la phosphorylation oxydative, un effet connu comme l'effet Warburg (170).

D'autre part, un modèle sur la progression vers la leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (T-ALL) propose qu'une mutation dans la protéine ribosomique RPL10/uL16 entraîne l'incapacité de la sous-unité 60S à passer le point de contrôle de qualité ribosomique. Ceci entraînerait une diminution de l'assemblage des ribosomes. Un suppresseur de la biogenèse des ribosomes peut survenir en raison d'une pression sélective permettant de contourner «la barrière de contrôle», stimulant ainsi la production de ribosomes défectueux. En conséquence, la diminution de la fidélité de traduction conduirait à une modification du profil d'expression génique, à la stimulation de la translecture du codon d'arrêt et du *frameshift* programmé, ainsi qu'à l'apparition de la leucémie T-ALL (171).

Eswarappa et collègues ont récemment identifié une isoforme allongée en C-terminal du facteur de croissance vasculaire endothélial A (VEGF-Ax: *Vascular endothelial growth factor Ax*), générée par un mécanisme de translecture du codon d'arrêt (172). VEGF-A canonique induit la migration et la prolifération dans les cellules endothéliales vasculaires, et est essentielle pour l'angiogenèse à la fois physiologique (par exemple, l'embryogenèse) et pathologique (par exemple, la tumorigenèse) (173,174). Cependant, le rôle physiologique de la nouvelle isoforme VEGF-Ax reste controversé, car des évidences montrent des implications anti-angiogéniques (172) et pro-angiogéniques de VEGF-Ax dans un même contexte cellulaire. Xin et collègues ont observé que VEGF-Ax n'inhibe pas l'angiogenèse ni la croissance des cellules endothéliales humaines et bovines. Ils ont également remarqué que cette isoforme présente des fonctions

mitogéniques. Néanmoins, cet effet mitogénique est moins puissant que celui de l'isoforme canonique VEGF-165 (175).

1.5. Problématique et objectifs de la thèse

1.5.1. Un rôle extra-ribosomique de RPL22/eL22 en tant que suppresseur tumoral

Une des caractéristiques des cellules cancéreuses est la production accrue de ribosomes. Cette production comble la demande de synthèse de protéines et la rapide prolifération cellulaire. Néanmoins, la qualité de ces ribosomes n'est pas nécessairement optimale. Les arguments décrits ci-dessus mettent en évidence le lien entre les ribosomes modifiés et le cancer, non seulement à cause des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr, mais aussi à cause des mutations des protéines ribosomiques. Les défauts de ribogénèse que nous avons observés lors de la sénescence suggère une altération de la fonction des protéines ribosomiques et des ribosomes.

Des études protéomiques avec des seuils moins strictes, réalisées récemment dans notre laboratoire, nous ont permis d'identifier plusieurs protéines du ribosome, dont RPS14/uS11 mais aussi RPL22/eL22, comme partenaires de CDK4 (80). La finalité dans cette partie de ma thèse consiste à étudier si RPL22/eL22 (tout comme RPS14/uS11), pourrait, à travers son interaction avec CDK4 et/ou la cycline D1, réguler le cycle cellulaire en induisant la sénescence. Ceci mettrait en évidence un autre rôle de suppresseur de tumeur de cette protéine ribosomique.

1.5.2. Diminution de la translecture du codon d'arrêt dans la sénescence

Considérant que la biogénèse des ribosomes dans les cellules sénescents est perturbée, que des facteurs nucléolaires sont dégradés, et que paradoxalement les ribosomes fonctionnels sénescents auraient une demi-vie plus longue, nous nous sommes questionnés sur les

conséquences que cela aurait sur la fidélité de traduction dans les cellules sénescents. Parmi les erreurs de traduction ciblées dans nos études préliminaires se trouvaient la reconnaissance incorrecte des acides aminés pendant l'élongation de la traduction, le changement du cadre de lecture spontané et programmé, ainsi que la translecture du codon d'arrêt. En utilisant un système de rapporteurs à deux luciférases, nous avons évalué les erreurs de reconnaissance d'une dizaine de codons. Étonnamment, nous avons trouvé que les reconnaissances erronées étaient à peine détectables. De plus, il n'y avait pas de différences significatives entre les cellules sénescents et non-sénescents par rapport à ces erreurs. Les changements du cadre de lecture spontanés étaient également difficiles à détecter, tandis que les changements du cadre de lecture programmés étaient facilement perceptibles. Les cellules sénescents avaient tendance à diminuer les changements du cadre de lecture programmés mais cette diminution n'était guère significative.

D'autre part, les erreurs de translecture du codon d'arrêt diminuaient significativement dans les cellules sénescents. Ceci nous a conduit à approfondir l'étude de l'efficacité de terminaison de la traduction. Nous étions également intéressés par le rôle des suppresseurs des tumeurs, tels que RB, PML et p53, en tant qu'inhibiteurs d'erreurs de terminaison de la traduction.

À cette partie s'ajoute l'implication extra-ribosomique de suppression tumorale de RPS14/uS11 et RPL22/eL22 sur la variation d'erreurs de terminaison de la traduction.

2. RPL22/eL22 en tant que suppresseur tumoral

2.1. Mise en contexte de l'article 1

Le présent article découle de notre récente publication sur l'interactome du mutant inactif de CDK4 (CDK4(K35M)) dans des cellules sénescences induites par la délétion de RSL1D1, où nous avons identifié RPS14/uS11 en tant que partenaire de CDK4 (80). RPS14/uS11 a été trouvée associée aux complexes CDK4-Cycline D1 dans les cellules sénescences et son expression était capable d'inhiber la phosphorylation de CDK4 et de RB. Six protéines ribosomiques ont été également identifiées (RPS3A/eS1, RPS4X, RPL22/eL22, RPL7/uL30, RPL15/eL15, RPL24/eL24) mais nous avons concentré notre attention sur RPL22/eL22. La raison principale était que RPL22/eL22 est mutée dans plusieurs types de cancers (95,105,176), et il a également été observé que son haploinsuffisance favorise la transformation et le développement du lymphome thymique dans des modèles de souris (177,178).

Tout cela suggère que RPL22/eL22 pourrait agir en tant que facteur suppresseur de tumeur. Cette hypothèse est soutenue par des études antérieures montrant le lien entre la stabilisation et l'activation de p53 via RPL22/eL22 (85). En manipulant génétiquement l'expression de RPL22/eL22 et en évaluant son interaction avec CDK4 et la Cycline D1, nous avons identifié RPL22/eL22 comme deuxième protéine ribosomique ayant un rôle régulateur du cycle cellulaire, via l'inhibition de la phosphorylation de CDK4 et de RB.

Notre article a été publié dans la revue *Cell Cycle* en 2019 (vol. 18, pp. 759-770).

2.2. Contribution à l'article 1

Frédéric Lessard a effectué la plupart des expériences de culture cellulaire, d'immunoprécipitation, des dosages de kinases, du pull-down, des western blots, SA- β -gal, des courbes de croissance et l'analyse de données. J'ai effectué toutes les opérations de purification des ribosomes, les essais qPCR et ai reproduit la sénescence RPL22/eL22 et la **Figure 12D**. Ana Fernandez-Ruiz a confirmé la sénescence RPL22/eL22 et son contournement avec E6 et E7, ainsi qu'une expérience de culture cellulaire conduisant à la **Figure Supplémentaire S1A**. Ana Fernandez-Ruiz, Marie-Camille Rowell, Frédéric Lessard et moi avons effectué des expériences de culture de cellules parallèles pour les **Figures 10E-F, 12D** et la **Figure Supplémentaire S1A**. Lian Mignacca a construit pBabe-RPL22-Myc, a confirmé l'expérience PC3 et a effectué la **Figure Supplémentaire S2**. Paloma Kaligari a effectué les immunofluorescences dans les **Figures Supplémentaires S1B-C**. Emmanuelle Saint-Germain a confirmé l'immunoprécipitation. Mehdi Benfdil a contribué à la quantification de SA- β -gal. Stéphane Lopes-Paciencia a contribué par des apports techniques avec des immunofluorescences. Sebastian Igelmann a réalisé l'immunofluorescence de la **Figure 10E** et une analyse bioinformatique. Frédéric Lessard, Léa Brakier-Gingras, Véronique Bourdeau et Gerardo Ferbeyre ont participé à des corrections de manuscrits et à la conception expérimentale.

2.3. Article 1

Ribosomal protein RPL22/eL22 regulates the cell cycle by acting as an inhibitor of the CDK4-cyclin D complex

Neylen Del Toro^{1§}, Ana Fernandez-Ruiz^{1,2§}, Lian Mignacca¹, Paloma Kalegari^{1,2}, Marie-Camille Rowell^{1,2}, Sebastian Igelmann¹, Emmanuelle Saint-Germain¹, Mehdi Benfdil¹, Stéphane Lopes-Paciencia^{1,2}, Léa Brakier-Gingras¹, Véronique Bourdeau¹, Gerardo Ferbeyre^{1,2*} and Frédéric Lessard^{1*}.

Affiliations:

¹Department of Biochemistry and Molecular Medicine; Université de Montréal; C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7; Canada.

²CRCHUM, 900 Saint-Denis – bureau R10.432, Montréal, QC H2X 0A9 - Canada

Author Contributions:

[§]These authors contributed equally to this work.

KEYWORDS: Ribosome biogenesis; senescence; RPL22/eL22; CDK4; cyclin D1; RPS14/uS11

Contact:

*Correspondence to: g.ferbeyre@umontreal.ca and/or frederic.lessard@umontreal.ca

2.3.1. Summary

Senescence is a tumor suppressor program characterized by a stable growth arrest while maintaining viability of the cells. Senescence-associated ribogenesis defects (SARD) have been shown to regulate senescence through the ability of the ribosomal protein S14 (RPS14 or uS11) to bind and inhibit the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4). Here we report another ribosomal protein that bind and inhibit CDK4 in senescent cells: L22 (RPL22 or eL22). Enforcing the expression of RPL22/eL22 is sufficient to induce an RB and p53-dependent cellular senescent phenotype in human fibroblasts. Mechanistically, RPL22/eL22 can interact with and inhibit CDK4-Cyclin D1 to decrease RB phosphorylation both *in vitro* and in cells. Briefly, we show that ribosome-free RPL22/eL22 causes a cell cycle arrest which could be relevant during situations of nucleolar stress such as cellular senescence or the response to cancer chemotherapy.

2.3.2. Introduction

Ribosome biogenesis is a complex multistep process implicating numerous cofactors and requiring proper coordination of the three major RNA polymerases (76). The process is regulated by several oncogenes and/or tumor suppressors according to the cellular state whether proliferative, apoptotic, arrested or senescent (179,180). In the nucleolus, polymerase I is responsible for 47S rRNA synthesis which is matured into 18S, 5.8S and 28S rRNA while polymerase III synthesizes the 5S rRNA in the nucleoplasm (181,182). Moreover, polymerase II transcribes the mRNAs of other protein components or cofactors implicated in processing and assembly of functional ribosomes. Several ribosomal proteins, which include RPL5/uL18, RPL11/uL5, RPS14/uS11 and RPL22/eL22, link nucleolar stress to p53 activation (83-85,183). One physiological process leading to nucleolar stress is cellular senescence, a process that plays a role in embryonic development (184,185), wound healing (186) and tumor suppression (187).

During senescence, aberrant signaling triggers the degradation of multiple proteins by a process dubbed senescence-associated proteins degradation (SAPD). Targets of SAPD include several ribosome biogenesis factors and their down-regulation explains in part the senescence-associated ribogenesis defects (SARD) (53,54,80). While SARD characterizes senescence in response to a variety of stresses, triggering the process by depleting individual ribogenesis factors is sufficient to induce senescence (80). Analysis of the interactome of CDK4 in senescence induced by depleting one particular ribosome biogenesis factor, namely ribosomal L1 domain-containing protein 1 (RSL1D1) identified RPS14/uS11 and other ribosomal proteins as potential partners (80). Ribosomal proteins are frequently mutated or their expression pattern is altered in various types of cancers (188,189). RPL22/eL22 is often mutated in T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) and in endometrial, colorectal and gastric cancers (94,95,176,177,190). A large-scale analysis demonstrated that RPL22/eL22 hemizygous gene deletions are also frequent in numerous types of cancers and cell lines (191). Moreover, RPL22/eL22 down-regulation is observed in non-small cell lung carcinoma and its haploinsufficiency promotes transformation and thymic lymphoma development in a mouse

model (94,178). All these facts suggest a tumor suppressor role for RPL22/eL22 which has previously been linked to p53 stabilization and activation (85). In this report, we demonstrate that following ribosome biogenesis defects in senescence, RPL22/eL22 can control cell cycle progression through the inhibition of CDK4-cyclin D1 complex in a manner similar to RPS14/uS11 (80). This demonstration provides an additional explanation for the tumor suppressor activity of RPL22/eL22.

2.3.3. Materials and Methods

Plasmids

Retroviral vector pBABE was previously described (30). pLXSN, pLXSN-E6, pLXSN-E7 were provided by Dr. Denise A. Galloway (Fred Hutchinson Cancer Center). pBABE-CDK4(WT) was a gift from Dr. Scott W. Lowe (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New-York, NY). pcDNA3.1-3xFLAG, pcDNA3-Myc-Cyclin D1(WT), pMSCV-shNTC and pMSCV-shRB were previously described in (80). Shp53 was generated with H1 context from pRS-shp53 described in (192) and subcloned in EcoRI / XhoI restriction sites to create retroviral vector MSCV-shp53. pCMV6-RPS14(WT)-Myc-FLAG (RC223055) and pCMV6-RPL22(WT)-Myc-FLAG (RC208910) were purchased from Origene, Atlanta, GA. RPL22(WT)-Myc was PCR amplified from the vector pCMV6-RPL22(WT)-Myc-FLAG and subcloned in BamHI/Sall restriction sites to create retroviral vector pBABE-RPL22(WT)-Myc. For PCR primers used for cloning see **Supplementary Table S1**.

Lentiviruses pLKO expressing shRPL22 (shRPL22-A, shRPL22-B) and shCTR were purchased from Sigma-Aldrich (#75015, #75017 and SHC002). Finally, pCMV-VSV-G (Addgene #8454) and pCMV-dR.91 (Delta8.9) were obtained from Dr. R. Weinberg's laboratory (Whitehead Institute, Cambridge, MA). ShRNA target sequences are presented in **Supplementary Table S1**.

Cells, reagents and viral gene transfer

Palbociclib (PD0332991) was purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Phoenix Ampho packaging cells were a gift from Dr. Scott W, Lowe. Human embryonic kidney HEK-293T cells were obtained from Invitrogen and prostate cancer PC3 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) and human diploid fibroblasts IMR-90 were obtained from Coriell Institute for Medical Research (Camden, NJ). PC3 cells were cultured in RPMI medium (Wisent, Montreal, QC) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent), 1% penicillin/streptomycin sulfate (Wisent) and 2 mM L-glutamine (Wisent). All other cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Wisent) supplemented with 10% FBS (Wisent) and 1% penicillin/streptomycin sulfate (Wisent) and 2 mM L-glutamine (Wisent). Retroviral and lentiviral-mediated gene transfer was done as described before (30,80).

Immunoblotting

Immunoblotting was performed as previously described in (53). The following primary antibodies were used: anti-phospho-H3^{S10} rabbit polyclonal (1:1000, #06-570, lot: 2517793, Millipore, Billerica, MA), anti-MCM6 rabbit polyclonal (1:1000, A300-194A, lot: A300-194A-2, Bethyl Laboratories), anti-p53 mouse monoclonal (1:1000, clone DO-1, Sc-126, lot: C1413, Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-p53^{S15} rabbit polyclonal (1:500, #9284, lot: 9, Cell Signaling), anti-FLAG mouse monoclonal (1:1000, F1804, M2, lot: SLBK1346V, Sigma-Aldrich), anti-c-Myc rabbit polyclonal (1:1000, clone A-14, sc-789, lot: K0215, Santa Cruz Biotechnology), anti-Myc tag mouse monoclonal (1:2000, 9E10, lot: 114K4821, Sigma, Saint Louis, Missouri), anti-phospho-RB^{S795} rabbit polyclonal (1:500, #9301, lot: 13, Cell Signaling), anti-RB mouse monoclonal (1:1000, clone 4H1, #9309, lot: 9, Cell Signaling), anti-CDK4 rabbit polyclonal (1:2000, A304-225A, lot: A304-225A-1, Bethyl Laboratories), anti- α -Tubulin mouse monoclonal (1:20000, clone B-5-1-2, T6074, lot: 023M4813, Sigma-Aldrich), anti-GST mouse monoclonal (1:2000, clone GST-2, G1160, lot: 012M4814, Sigma-Aldrich), anti-RPL22 mouse monoclonal (1:500, clone D-7, sc-373993, lot: D2216, Santa Cruz Biotechnology), anti-

RPL22 rabbit polyclonal (1:1000 , cat#: 25002-1-AP, Immunogen cat#: Ag21851, Proteintech) and anti-RPS3 mouse monoclonal (1:1000, clone C-7, sc-376008, lot: D2116, Santa Cruz Biotechnology). The following secondary antibodies were used: goat anti-rabbit IgG conjugated to HRP (1:3000, #170-6515, lot: 64126042, Bio-Rad, Mississauga, ON), goat anti-mouse IgG conjugated to HRP (1:3000, #170-6516, lot: 64132955, Bio-Rad, Mississauga, ON).

Cell proliferation and senescence analysis

Proliferation was assessed from estimations of cell number according to a crystal violet retention assay (30). Senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal) activity was assayed as described before (30). Separation of ribosomal RPL22-Myc from non-ribosomal RPL22-Myc was done as previously described (80). Source data for growth curves and SA- β -gal staining are presented in **Supplementary Table S2**.

Immunofluorescence

Immunofluorescence images were performed as described in (30,80). Primary antibodies used were: anti-PML rabbit polyclonal (1:200, A301-167A, lot: A301-167A-2, Bethyl Laboratories), anti-53BP1 rabbit polyclonal (1:200, Ab-1, Cat# PC712, lot: D00137736, Calbiochem, EMD Biosciences, San Diego, CA), anti-phospho- γ -H2A.X^{S139} mouse monoclonal (1:100, JBW-301, lot: 2552645, Millipore, Billerica, MA) and anti-Myc tag mouse monoclonal (1:100, 9E10, lot: 114K4821, Sigma, Saint Louis, Missouri).

The following secondary antibodies were used: goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 488 (1:1000, #A11008, lot: 1166843, Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR), goat anti-mouse IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 488 (1:1000, #A11029, lot: 1423008, Life Technologies, Eugene, OR), goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugated to Alexa Fluor 568 (1:1000, #A11036, lot: 1504529, Life Technologies, Eugene, OR), goat anti-mouse IgG (H+L)

conjugated to Alexa Fluor 568 (1:1000, #A11031, lot: 1398018, Life Technologies, Eugene, OR).

Images were acquired with a FV300 Olympus confocal microscope with a PMT 1st generation and Fluoview V4.2 or a Zeiss Axio Imager Z2 upright microscope with a CoolSNAP FX camera (Photometrics) and/or AxioCam camera and ZEN 2 Imager (2.0.14283.302). Images were processed with ImageJ (2.0.0-rc-49/1.51g). Source data for immunofluorescence are presented in **Supplementary Table S2**.

Immunoprecipitation (IP)

Co-immunoprecipitation between CDK4(WT) or Myc-cyclin D1(WT) and RPL22-Myc-FLAG(WT) or RPS14-Myc-FLAG(WT) was confirmed in HEK-293T cells. HEK-293T cells (5×10^6) were seeded in 10 cm-cell culture dishes and grown for 24 hours. Cells were transiently transfected using the calcium phosphate method with 15 μ g of pcDNA3.1(C1)-3xFLAG, pCMV6-RPL22(WT)-Myc-FLAG or pCMV6-RPS14(WT)-Myc-FLAG in combination with either pBABE-CDK4(WT) or pcDNA3-Myc-cyclin D1(WT). Cells were harvested 24 hours post-transfection in IP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 12.5 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 20% glycerol, 1% Triton X-100 [BioShop], 0.1% SDS and 1X Complete-EDTA free-protease inhibitor cocktail [Roche Applied Science]). Cell lysates were kept on ice for 15 min and then sonicated for 40 seconds at the lowest intensity. Cell lysates were cleared by centrifugation at 13,000 rpm for 1 min and immunoprecipitations were performed with anti-FLAG M2 Affinity Gel (#A2220-5ML, lot: SLBT8835, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for 30 min at 4°C. Of note, anti-FLAG M2 Affinity Gel were previously blocked for 1 hour at 4°C in IP buffer containing 2.5% BSA, 0.16 μ g/ μ l salmon sperm DNA (Sigma-Aldrich) and 0.16 μ g/ μ l *E. coli* tRNA (Sigma-Aldrich) and then washed twice with IP buffer before being used for immunoprecipitation. Immunoprecipitates were recovered after 30 min of incubation at 4°C and washed three times for 30 min in IP buffer. Proteins of immunoprecipitates and total cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by Western Blotting with the antibodies described in the section Immunoblotting.

***In vitro* protein phosphorylation**

Human active CDK4-cyclin D1 (Cat#: C0620, lot: SLBK7657V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was incubated alone or with human recombinant GST-RB (773-928) (Cat#: R05-55G, lot: M166-3, SignalChem) in the presence or absence of palbociclib (1 μ M) or with a gradient of human recombinant His-RPL22 (Cat#: NBP2-23419, lot: 12221401, Novus Biologicals, Oakville, ON) in kinase assay buffer I (Cat#: K01-09, SignalChem): 25 mM MOPS, pH 7.2, 12.5 mM β -glycerol-phosphate, 25 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 2 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol (DTT), 40 μ M ATP; at 30°C for 30 min and according to SignalChem protocol. Then, Laemmli buffer was added to stop the reaction. Samples were boiled at 98°C for 5 min and the reaction products were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by Western Blotting.

***In vitro* protein interaction (GST pull-down assay)**

GST (50 ng) (Cat#: SRP5348, lot: F664-2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or GST tagged human active CDK4-cyclin D1 (50 ng) (Cat#: C0620, lot: SLBK7657V, Sigma-Aldrich) or GST tagged human CDK4 (50 ng) (Cat#: C31-14G, lot: K127-1, Signal Chem, Richmond, BC) or GST tagged human cyclin D1 (50 ng) (Cat#: 009-001-153S, lot: 37136, Rockland antibodies & assays, Limerick, PA) were incubated with human recombinant His-RPL22 (375 ng) (Cat#: NBP2-23419, lot: 12221401, Novus Biologicals, Oakville, ON) in 500 μ l of PB buffer (20 mM Hepes, pH 7.5, 130 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 0.05% NP40) and mixed using a rotating machine at 30°C for 2 hours. Proper amounts of glutathione-Sepharose beads (Cat#: 17-0756-01, GE Healthcare, Sweden) were washed three times with PB buffer. Then, 10 μ l of glutathione beads and 5 μ l of BSA (25% stock solution) were added to the mix of proteins and incubation continued at room temperature for 30 min with rotation. The beads were then washed three times for 30 min with PB buffer at room temperature with rotation. Then, the appropriate quantity of 6X loading buffer (0.5 M Tris-HCl pH6.8, 30%

glycerol, 10% SDS, 1% bromophenol blue and 15% β -mercaptoethanol) was added. The samples were boiled for 5 min and separated by SDS-PAGE for Western Blotting.

Real-time PCR

Total RNA extracts were prepared in TransZol (Civic Bioscience) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed and gene expression level was determined with a LightCycler 96 (software version 1.1) Real-Time PCR System (Roche Applied Science) was performed using SYBR Green technologies as described before (30). QPCR primers are presented in **Supplementary Table S1**. Source data for qPCR are presented in **Supplementary Table S2**.

Statistics and reproducibility

Statistical analysis (two-tailed Student's *t*-test) was performed using Excel. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Experiments were repeated at least three times.

Data availability

Source data for **Figures. 10E, 11A-B, 11D-E, 12A-B, S1B-D and S2A, C** can be found in **Supplementary Table S2**. All data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

2.3.4. Results

RPL22/eL22 as a possible regulator of CDK4-Cyclin D1 complex

We recently published the interactome of the CDK4(K35M) mutant in RSL1D1 knockdown-induced senescent cells (80). By using a less stringent cut-off, we found other known partners

of CDK4 such as the cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (CDKN2D or INK4D), the cell division cycle 37 (CDC37), the heat shock protein 90A (HSP90A) and the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (**Figure 10A** and **Supplementary Table S3**). In addition to the discovery of RPS14/uS11 as a CDK4 partner, which we confirmed (80), we also found other ribosomal proteins namely S3A (RPS3A or eS1), S4X (RPS4X), L7 (RPL7 or uL30), L15 (RPL15 or eL15), L24 (RPL24 or eL24) and L22 (RPL22 or eL22) (**Figure 10B** and **Supplementary Table S3**).

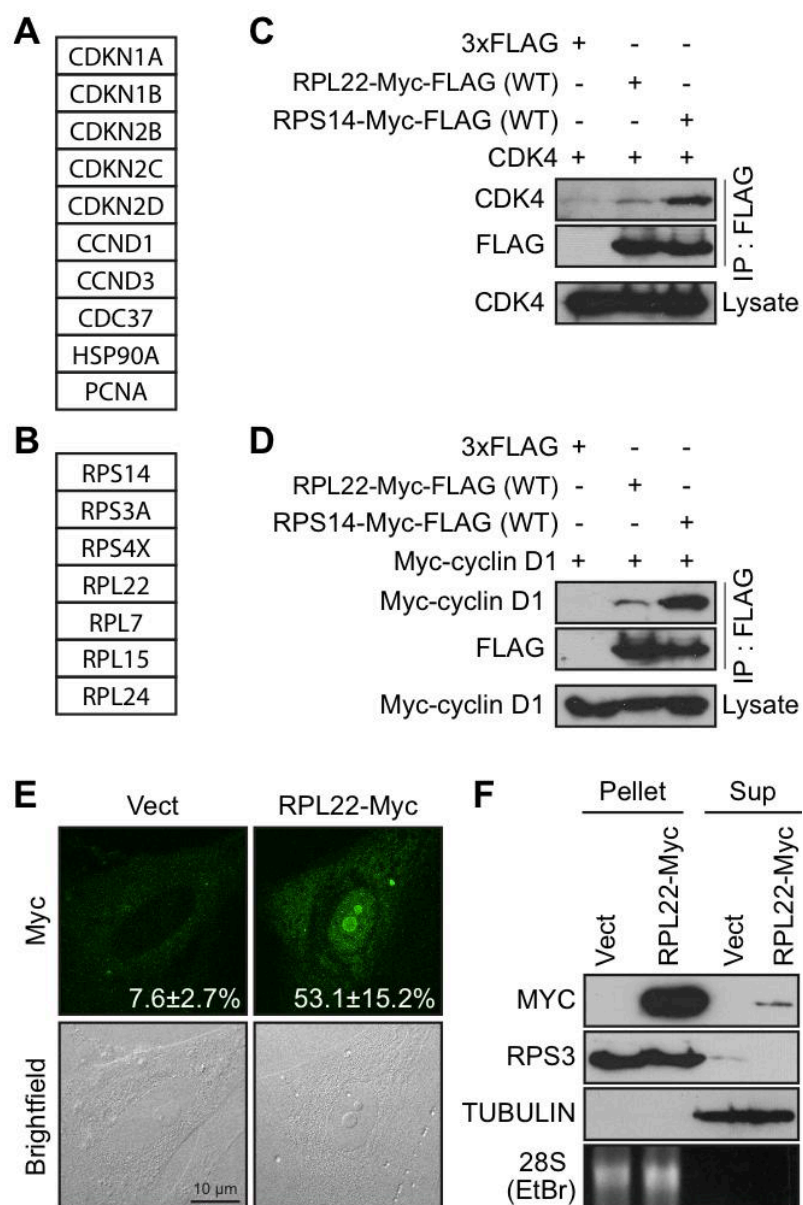


Figure 10. RPL22/eL22 can interact with CDK4 and/or cyclin D1

(A, B) List of selected proteins found to immunoprecipitate with a FLAG-tagged version of CDK4(K35M) from RSL1D1 knockdown-induced senescent cells classified as known interactors of CDK4 **(A)** and ribosomal proteins interactors **(B)**. **(C)** HEK-293T cells were transfected with vectors expressing CDK4 and 3xFLAG control, Myc-FLAG tagged RPL22 wild type (RPL22-Myc-FLAG(WT)) or Myc-FLAG tagged RPS14 wild type (RPS14-Myc-FLAG(WT)) and immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. Lysates and immunoprecipitates were immunoblotted for the indicated proteins. **(D)** HEK-293T cells were transfected with vectors expressing Myc-cyclin D1 and 3xFLAG control, RPL22-Myc-FLAG(WT) or RPS14-Myc-FLAG (WT) and immunoprecipitated with an anti-FLAG antibody. Lysates and immunoprecipitates were immunoblotted for the indicated proteins. **(E)** Indirect immunofluorescence (IF) with a specific anti-Myc tag antibody showing RPL22-Myc in IMR-90 cells expressing an empty control vector (Vect) or RPL22-Myc at day 12 post-infection (representative images). Data were quantified from 3-independent cell counts up to a total of at least 100 cells in triplicate and are presented as the mean percentage of positive cells for nucleolar localization of RPL22-Myc \pm SD. Brightfield images are shown alongside. Scale bar, 10 μ m. **(F)** Immunoblots for the indicated proteins and ethidium bromide detection of 28S rRNA in ribosome purification by sedimentation (Pellet) or its supernatant (Sup) obtained from extracts of IMR-90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) at day 7 post-infection. Blots in **C**, **D** and **F** are representative of 3 independent experiments with similar results.

Considering that RPL22/eL22 is an haploinsufficient tumor suppressor gene (94), we decided to study its ability to regulate the cell cycle by interacting and regulating the CDK4-cyclin D1 complex. In order to confirm and determine the strength of the interaction of RPL22/eL22 with CDK4 and/or cyclin D1, we overexpressed and immunoprecipitated flag-tagged versions of RPL22/eL22 or RPS14/uS11, for comparison, in presence of overexpressed CDK4 or cyclin D1 (**Figure 10C-D** respectively). Much as with RPS14/uS11, RPL22/eL22 can interact with CDK4 (**Figure 10C**) and with cyclin D1 (**Figure 10D**) in HEK-293T cells. However, in both cases, RPL22/eL22 interacted less strongly than RPS14/uS11 (**Figure 10C-D**). Immunofluorescence in normal human fibroblasts (IMR-90 cells) after retroviral gene transfer of a myc-tagged version of RPL22/eL22 showed its strong nucleolar accumulation and limited nucleoplasmic accumulation (**Figure 10E**) while RPS14/uS11 accumulated in the nucleoplasm in the same experimental setting (80). Following ribosome purification of IMR-90 cells expressing RPL22-Myc, we detected the myc-tagged version of RPL22/eL22 in the ribosomal fraction showing its

incorporation into ribosomes but we also detected it in the supernatant (**Figure 10F**) pointing to ribosome-free RPL22/eL22 and the possibility of it having an activity outside of the ribosome. Taken together, these results suggest that RPL22/eL22 could regulate CDK4-cyclin D1 complex.

RPL22/eL22 induces senescence mainly through activation of the RB pathway

The ability of RPL22/eL22 to interact with CDK4 and/or cyclin D1 suggested that RPL22/eL22 could induce senescence in an RB-dependent manner similarly to RPS14/uS11 (80). To investigate this possibility, we used retroviral gene transfer to express RPL22/eL22 in IMR-90 cells. We found that RPL22/eL22 induced proliferation defects (**Figure 11A**) and many senescence biomarkers, including: an accumulation of cells positive for senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -gal) (**Figure 11B**), a reduction in RB phosphorylation, a decrease in the levels of the E2F target genes MCM6, FANCD2 and CENPA, a reduction in the levels of the mitotic marker H3-pS10 and a downregulation of KI67 expression (**Figure 11C-D** and **Figure S1A**). Despite the detection of many markers of senescence, RPL22/eL22 expression did not lead to p53 accumulation or to its phosphorylation on serine 15 (**Figure 11C** and **Figure S1A**) and we did not detect transcriptional induction of its target genes p21 (also known as CDKN1A) or GADD45A (**Figure 11D**). Moreover, we did not observe strong evidence of PML bodies or DNA damage foci accumulation (**Figure S1B-C**) nor did we detect any strong increase in the expression of SASP components (**Figure S1D**). In addition, low and stable expression of RPL22/eL22 reduced proliferation in p53-null PC3 cells (**Figure 11E-F**). The tumor suppressor role of RPL22/eL22 suggests that its depletion could lead to better proliferation capability but in fact its depletion decreased proliferation of IMR-90 or PC3 cells (**Figure S2**) reflecting its essential role in protein biosynthesis and cell growth.

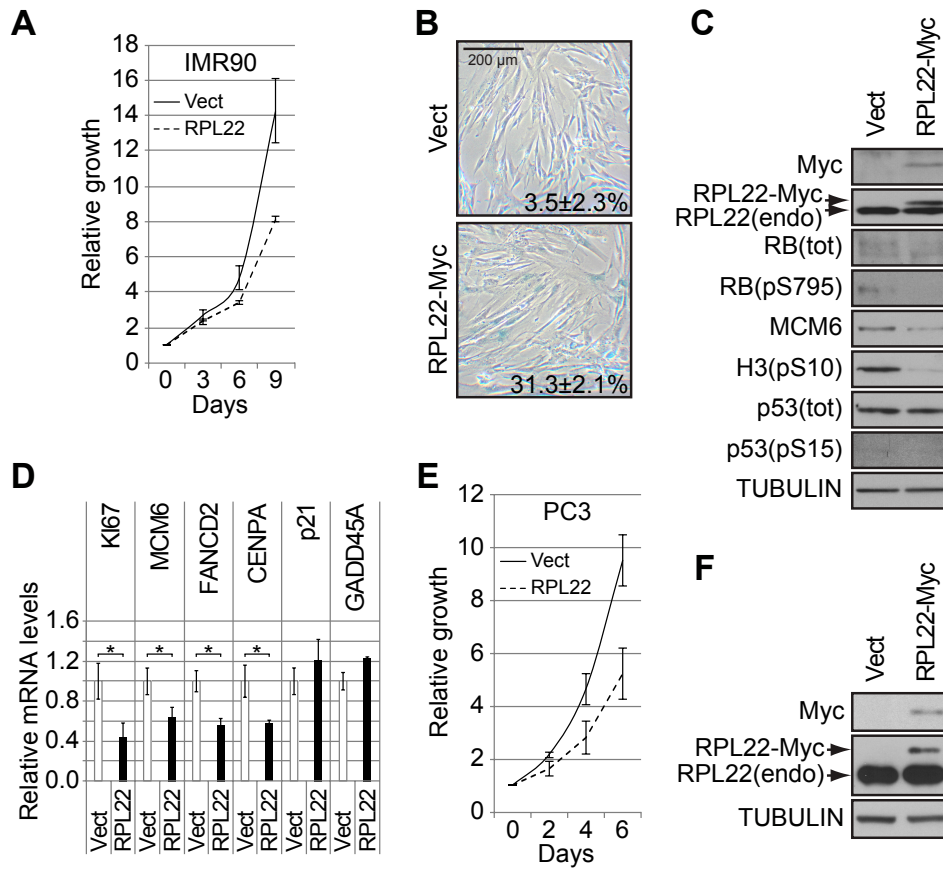


Figure 11. RPL22/eL22 regulates senescence in normal human diploid fibroblasts and decreases proliferation of p53-null PC3 cells

(A) Growth curves of normal human diploid fibroblasts IMR-90, expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect). Data are presented as means normalized to day 0 of each condition and error bars indicate SEM, $n = 3$ independent experiments. (B) SA-β-gal for cells as in (A) at day 12 post-infection. Data were quantified from 5-independent cell counts up to a total of at least 150 cells in triplicate and are presented as the mean percentage of positive cells \pm SD. Scale bar, 200 μ m. (C) Immunoblots of the indicated proteins performed on cells as in (A) at day 12 post-infection. RB(pS795): RB phosphorylated on serine 795; RB(tot): total RB; H3(pS10): histone H3 phosphorylated on serine 10; p53(pS15): p53 phosphorylated on serine 15; p53(tot): total p53; RPL22(endo): endogenous RPL22. (D) QPCR for the indicated genes performed on reverse transcribed total RNA extracted from cells as in (A) at day 12 post-infection. Data are normalized over TBP and HMBS, and presented as means relative to vector infected cells. Error bars indicate SD of triplicates. * = $p < 0.05$, using two-tailed Student's t-test. (E) Growth curves of PC3 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect). Data are presented as means normalized to day 0 of each condition and error bars indicate SEM, $n = 3$ independent experiments. (F) Immunoblots of the indicated proteins performed on cells as in (E) at day 7 post-

infection. RPL22 (endo): endogenous RPL22. Blots in **C** and **F** are representative of 3 independent experiments with similar results.

Together, these results suggest that RPL22/eL22 as RPS14/uS11 (80) can induce cellular senescence through CDK4 inhibition and RB hypophosphorylation.

RPL22/eL22-induced senescence engage both RB and p53 tumor suppressor pathways

RPL22/eL22 has been shown to form a complex with the E3 ligase MDM2, the ribosomal proteins RPL5/uL18 and RPL11/uL5 and to synergize with RPL11/uL5 in the activation of p53 (85). Considering that p53 can be activated without significant stabilization (193), it is impossible to completely exclude a role for p53 in RPL22/eL22-induced senescence from our initial results (**Figure 11**). In order to investigate this possibility and the preponderance of the RB or the p53 tumor suppressor pathways in the establishment of RPL22/eL22 senescence, we generated IMR-90 cells stably expressing RPL22/eL22 in combination with papillomavirus oncoproteins E6 or E7. The E6 oncoprotein is known to disable p53 functions, whereas E7 inactivates the RB pathway (194). In this model, we found that both E6 or E7 efficiently prevented reduced proliferation (**Figure 12A**) and accumulation of flat cells positive for SA- β -gal (**Figure 12B**) caused by expression of RPL22/eL22. These oncoproteins also both rescued the levels of the E2F target gene MCM6 and of the mitotic marker H3-pS10 (**Figure 12C**). Then, we generated IMR-90 cells stably expressing RPL22/eL22 in combination with shRNAs targeting p53 or RB. Once again, we found that depletion of p53 or RB rescued the levels of MCM6 and H3-pS10 (**Figure 12D**) consolidating the result obtained with E6 and E7 (**Figure 12A-C**). Taken together, these results suggest that RPL22/eL22-induced senescence relies in part on activation of both p53 and RB pathways.

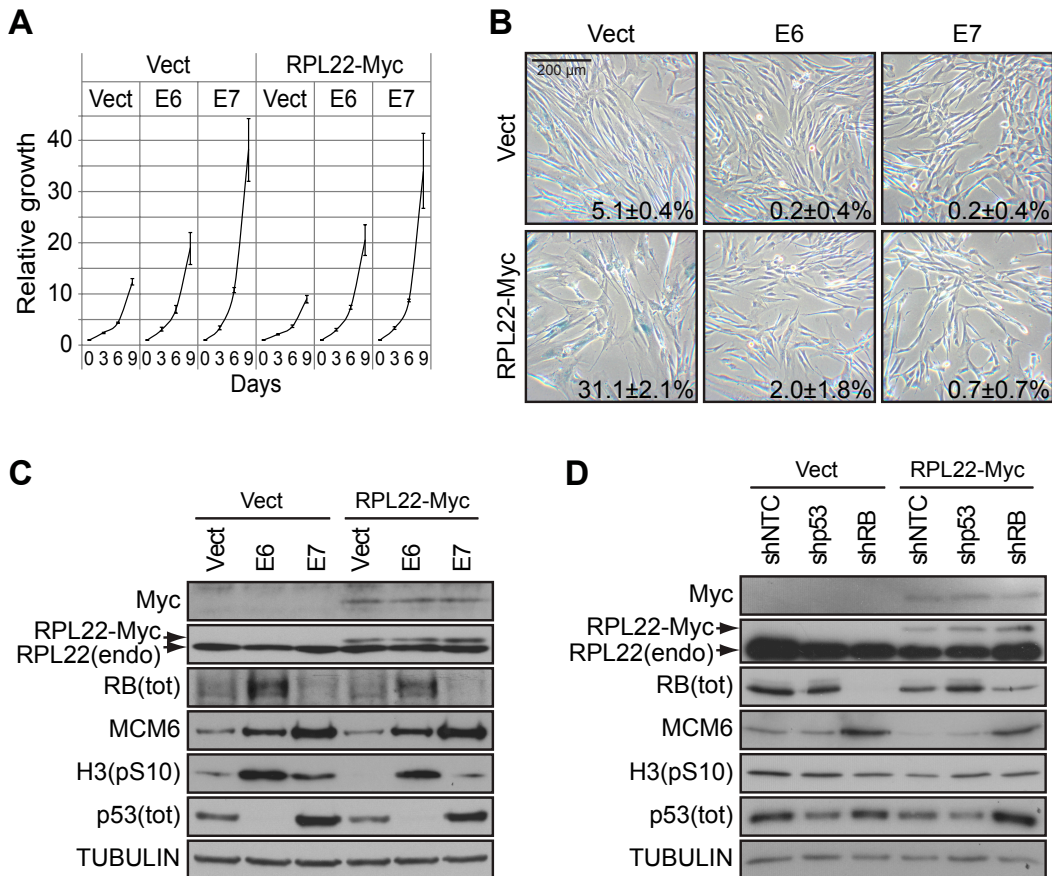


Figure 12. E6 or E7 can bypass RPL22/eL22-induced senescence

(A) Growth curves of IMR-90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) in combination with the expression of the viral oncoproteins E6, E7 or an empty control vector (Vect). Data are presented as means normalized to day 0 of each condition and error bars indicate SEM, $n = 3$ independent experiments. **(B)** SA- β -gal for cells as in **(A)** at day 12 post-infection. Data were quantified from 5-independent cell counts up to a total of at least 150 cells in triplicate and are presented as the mean percentage of positive cells \pm SD. Scale bar, 200 μ m. **(C)** Immunoblots of indicated proteins performed on cells as in **(A)** at day 12 post-infection. RB(tot): total RB; H3(pS10): histone H3 phosphorylated on serine 10; p53(tot): total p53; RPL22(endo): endogenous RPL22. **(D)** Immunoblots of indicated proteins performed on IMR-90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) in combination with the expression of a control shRNA (shNTC), a shRNA against p53 (shp53) or a shRNA against RB (shRB) at day 12 post-infection. RB(tot): total RB; H3(pS10): histone H3 phosphorylated on serine 10; p53(tot): total p53; RPL22(endo): endogenous RPL22. Blots in **C** and **D** are representative of 3 independent experiments with similar results.

RPL22/eL22 is a CDK4 inhibitor

Because RPL22/eL22 and RPS14/uS11 were both recovered from the same CDK4 immunoprecipitate in RSL1D1 knockdown-induced senescence, were both found to interact with CDK4 and/or cyclin D1 (**Figure 10**) and were each able to induce senescence phenotype in normal cells (**Figure 11** and (80)), we hypothesized that RPL22/eL22 could be a direct CDK inhibitor much like RPS14/uS11 (80). To demonstrate this, we established an *in vitro* kinase assay using purified recombinant proteins. We observed that RPL22/eL22 can effectively inhibit the CDK4-cyclin D1 phosphorylation of an RB fragment in a dose-dependent manner although less effectively than palbociclib (**Figure 13A**). Finally, in order to complete our interaction study of RPL22/eL22 direct interaction with CDK4, cyclin D1 or the complex CDK4-cyclin D1, we performed GST-pull down assays with purified recombinant proteins. As reported for RPS14/uS11 (80), RPL22/eL22 can bind to both CDK4 or cyclin D1 alone but also with the complex CDK4-cyclin D1 (**Figure 13B**). These results suggest that RPL22/eL22 can act like a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) of the INK family that binds CDK4 and also of the CIP/KIP family which binds to CDK-cyclin complexes (**Figure 13C**). The fact that RPL22/eL22 and RPS14/uS11 bind the cyclin D1 alone suggest another family we named PRICC (**Protein Ribosomal Inhibitor of CDK-Cyclin**) (**Figure 13B-C**) (80). Taken together, these results show that RPL22/eL22 can directly bind and inhibit the CDK4-cyclin D1 kinase activity.

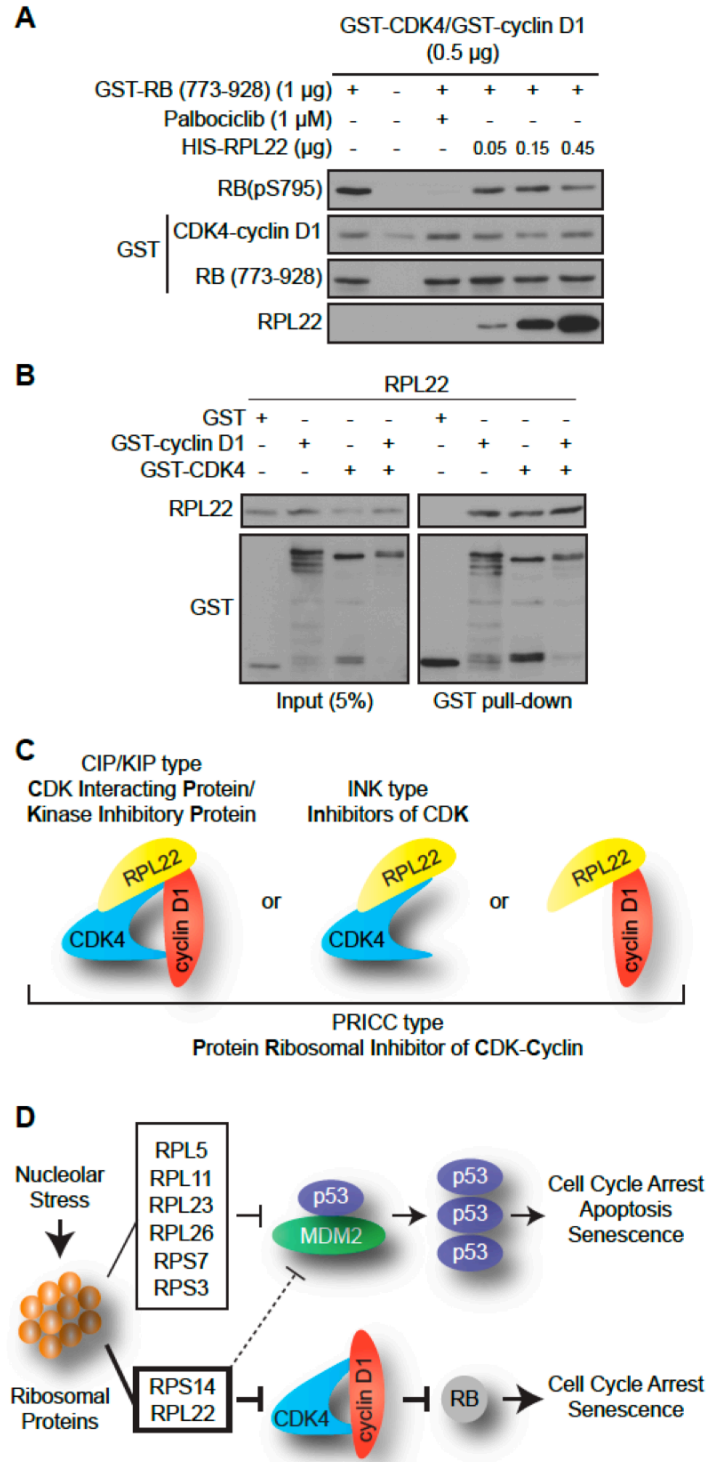


Figure 13. RPL22/eL22 directly binds and inhibits CDK4-cyclin D1 complex

(A) Immunoblots of the indicated proteins after in vitro kinase assay containing ATP and GST-CDK4 and GST-cyclin D1, with or without GST-RB (773–928), palbociclib and HIS-RPL22. RB(pS795): RB phosphorylated on serine 795. (B) In vitro GST pull-down of recombinant GST, GST-cyclin D1 and/or

GST-CDK4 and recombinant HIS-RPL22 using glutathione beads. Lysate and pull-down were immunoblotted for the indicated proteins. **(C)** Model showing interactions between RPL22 and cyclin D1, CDK4 or CDK4-cyclin D1. **(D)** Model showing how nucleolar stress can lead to activation of p53 and RB tumor suppressor pathways. Blots in **A** and **B** are representative of 3 independent experiments with similar results.

2.3.5. Discussion

Senescent cells are characterized as non-proliferative with a high rate of proteins synthesis and defects in ribosome biogenesis (80,195,196). The SARD phenotype led to the discovery that seven ribosomal proteins can interact with CDK4 in senescent cells. Among them, we previously characterized RPS14/uS11, which can accumulate in the nucleoplasm of senescent cells and contribute to the cell cycle arrest through inhibition of CDK4-cyclin D1 complex and RB phosphorylation (**Figure 13D**) (80). In parallel, RPL22/eL22 was identified as a partner of CDK4, suggesting an additional mechanism that explains the tumor suppressor role of this protein (**Figure. 10B-D**) (85). Effectively, RPL22/eL22 can directly inhibit CDK4-cyclin D1 kinase activity and its expression induces senescence in IMR-90 cells through hypophosphorylation of RB without significant activation or stabilization of p53 (**Figure 11A-D** and **Figure 13**). Moreover, RPL22/eL22 can decrease proliferation of p53-null PC3 prostate cancer cells, suggesting a p53-independent control of cell cycle progression (**Figure 11E-F**).

It is reported that RPL22/eL22, like RPS14/uS11 and many other ribosomal proteins, can bind MDM2 to inhibit its E3 ligase activity, leading to p53 stabilization after nucleolar stress (**Figure 13D**) (85,183,197-200). We show that RPL22/eL22-induced senescence can be overcome by the papillomavirus oncoproteins E6 or E7 which, respectively, inactivate the p53 or RB tumor suppressor pathways (**Figure 12A-C**). These results imply that both pathways are implicated in the establishment of RPL22/eL22 senescence and that RPL22/eL22 expression could have subtle effects on p53 activation or p53/MDM2 interaction, which were not detected in our experimental setting (**Figure 13D**). Short treatment with Nutlin-3 can cause p53 activation without significant stabilization (193) and we propose that RPL22/eL22 could act in a similar manner. An alternative explanation is based on the report that RPL22/eL22 binds p53 mRNA

and inhibits its translation (201). In this scenario, any stabilization of p53 via MDM2 inhibition by RPL22/eL22 is cancelled by inhibition of p53 mRNA translation.

The discovery of a second ribosomal protein linking the SARD to cell cycle regulation is significant and could lead to the development of small molecules or peptides mimicking their CDK inhibitory effects. Unlike RPS14/uS11 which accumulates in the nucleoplasm, RPL22/eL22 accumulates in the nucleolus when overexpressed. It is plausible that RPL22/eL22 control a nucleolar pool of CDK4-cyclin D, which is known to phosphorylate the nucleolar transcription factor UBF (202). We anticipate that other ribosomal proteins might target different CDKs to strengthen the anti-proliferative effects induced by nucleolar stresses or ribosome biogenesis defects. Our work provides a rationale for identification of cell cycle regulators and development of anticancer therapy.

2.3.6. Acknowledgments

We thank Scott Lowe (MSK), Denise A. Galloway (Fred Hutchinson Cancer Center), Andrew Koff (MSK), Bob Weinberg (MIT) and Tom Moss (U. Laval) for comments and/or reagents. We thank Éric Bonneil, Francis McManus and the IRIC Proteomics Core Facility for proteomic analysis. This work was funded by grants from the CIHR (Canadian Institute of Health and Research: CIHR MOP11151) to G.F. and the CCSRI (Canadian Cancer Society Research Institute: 704223) to G.F. F.L. is supported by FRQS (Fonds de Recherche du Québec-Santé) and CRS (Cancer Research Society). G.F. is supported by the CIBC chair for breast cancer research at the CR-CHUM.

Declaration of interest statement

We have no conflict of interest to declare

2.3.7. Supplementary material

2.3.7.1. Supplementary data

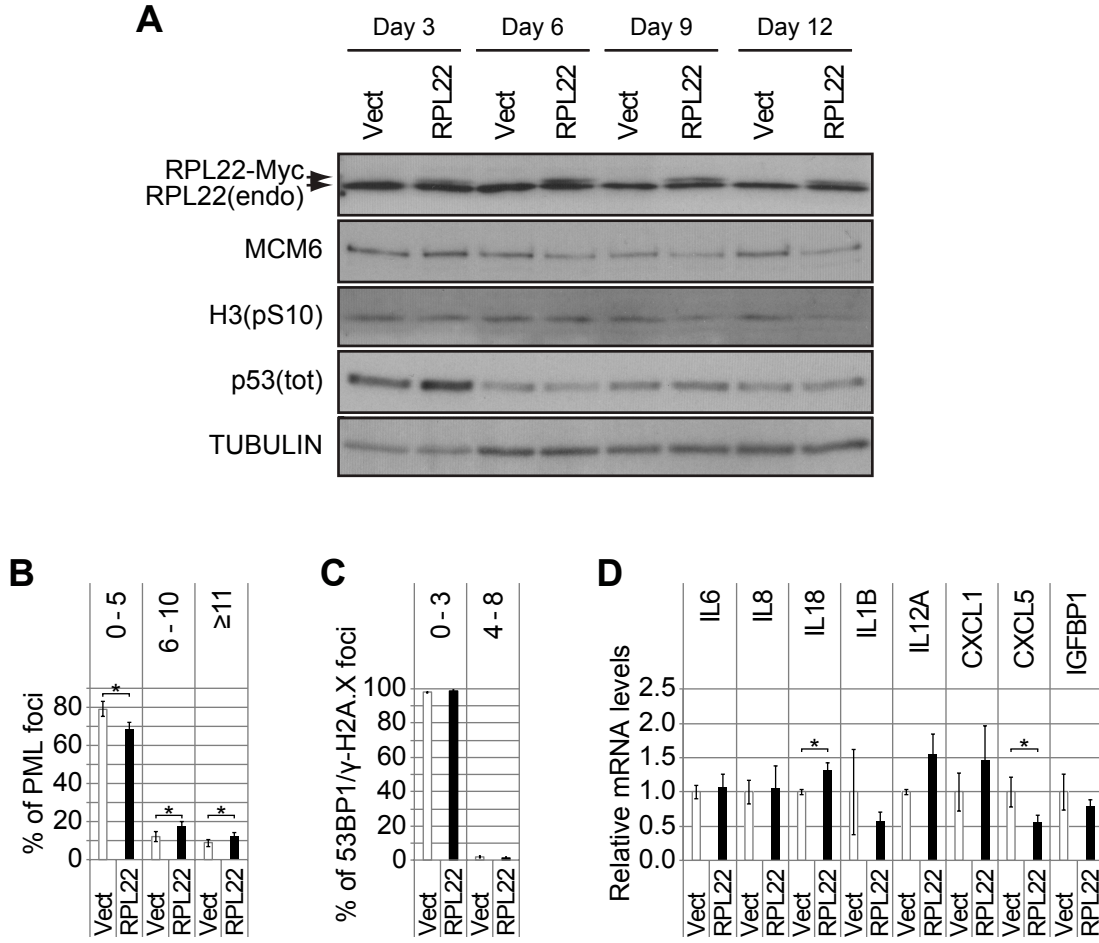


Figure S1. RPL22/eL22 induces senescence but without strong induction of PML foci, DNA damage foci or SASP

(A) Immunoblots of indicated proteins performed on IMR-90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) at day 3, 6, 9 and 12 post-infection. H3(pS10): histone H3 phosphorylated on serine 10; p53(tot): total p53; RPL22(endo): endogenous RPL22. Blots are representative of 3 independent experiments with similar results. (B-C) Quantification of indirect immunofluorescence (IF) with specific anti-PML or with anti-53BP1 and anti- γ H2A.X antibodies, performed on IMR-90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) at day 12 post-infection. Data were quantified from 3-independent cell counts up to a total of at least 100 cells in triplicate and are presented as the mean percentage. Error bars indicate SD of triplicates. * = $p < 0.05$, using two-tailed Student's t-test. (B)

Quantification of the percentage of cells with 0-5, 6-10 or more than 10 PML foci per cell. **(C)** Quantification of the percentage of cells with 0-3 or 4-8 53BP1/gH2A.X foci per cell. **(D)** QPCR for the indicated genes performed on reverse transcribed total RNA extracted from IMR-90 cells expressing RPL22-Myc or an empty control vector (Vect) at day 12 post-infection. Data are normalized over TBP and HMBS and presented as means relative to vector infected cells. Error bars indicate SD of triplicates. * = $p < 0.05$, using two-tailed Student's t-test.

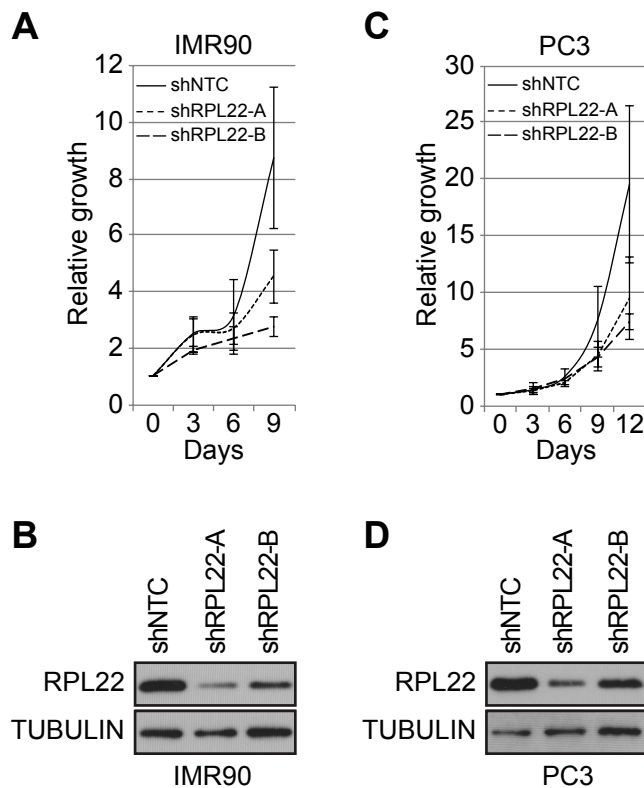


Figure S2. RPL22/eL22 depletion decreases proliferation of p53-WT IMR-90 and p53-null PC3 cells

(A, C) Growth curves of IMR-90 cells **(A)** or PC3 cells **(C)** expressing a control shRNA (shNTC) or two different shRNA against RPL22 (shRPL22-A and -B). Data are presented as means normalized to day 0 of each condition and error bars indicate SEM, $n = 3$ independent experiments. **(B, D)** Immunoblots of indicated proteins at day 7 post-infection with a control shRNA (shNTC) or two different shRNA against RPL22 (shRPL22-A and -B) in IMR-90 cells **(B)** or PC3 cells **(D)**. Blots in **B** and **D** are representative of 3 independent experiments with similar results.

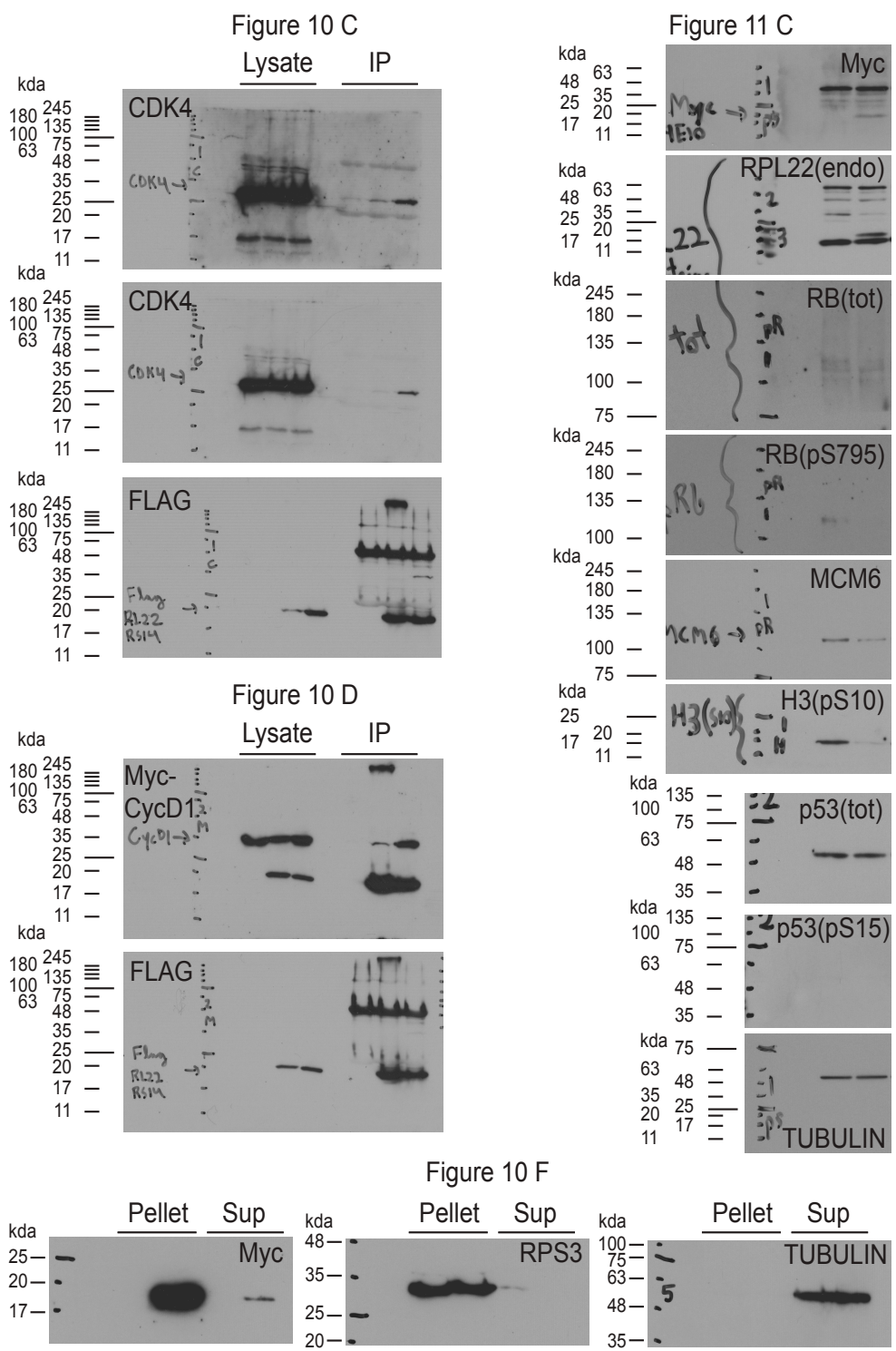


Figure S3. Unprocessed blots of Figure 10C-D, F and 11C

Of note, some membranes were cut into pieces to incubate with different antibodies.

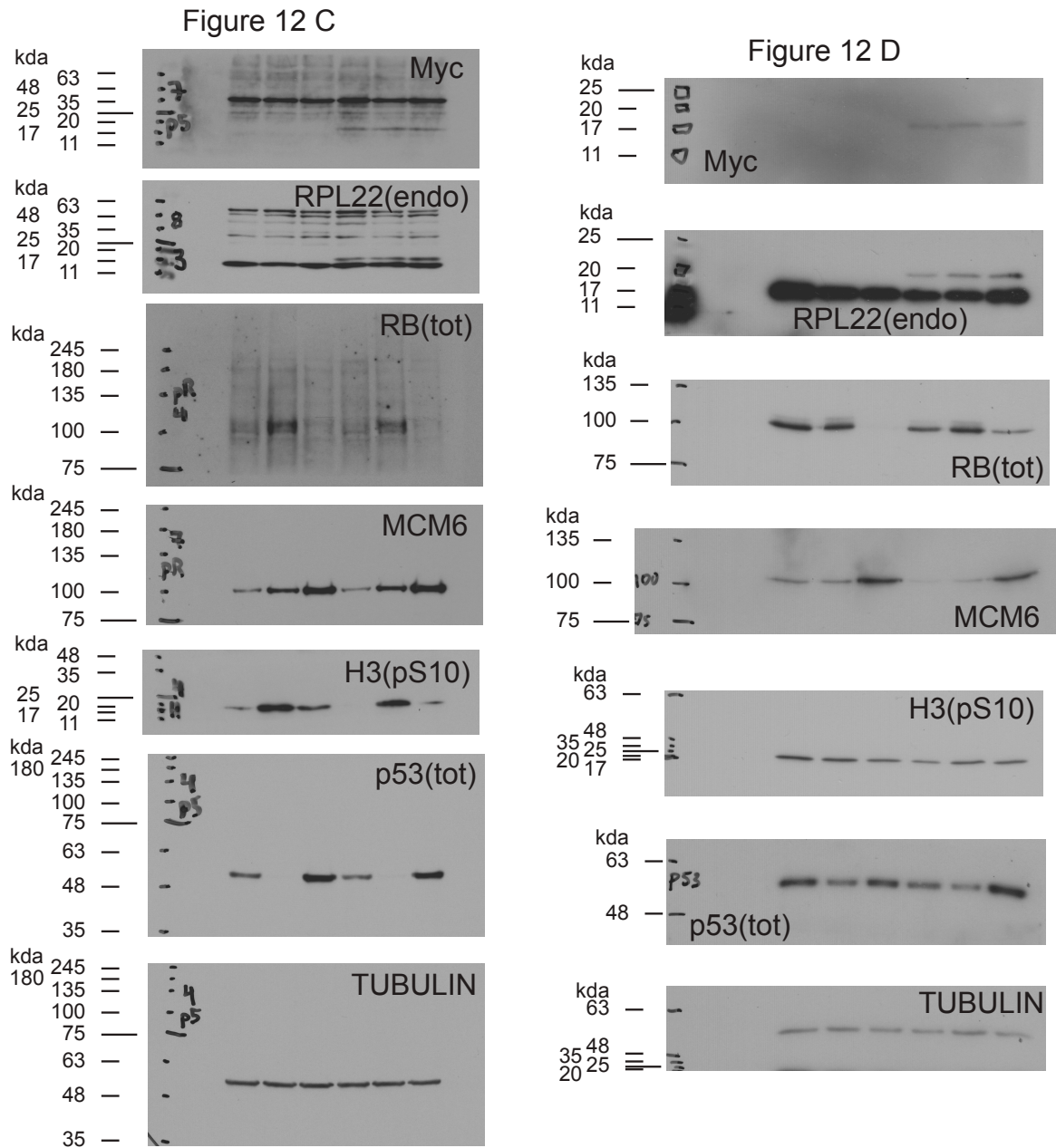
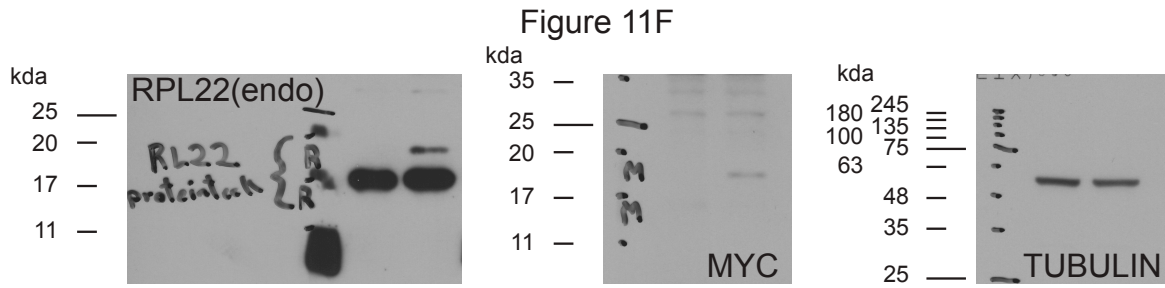


Figure S4. Unprocessed blots of Figure 11F and 12C-D

Of note, some membranes were cut into pieces to incubate with different antibodies.

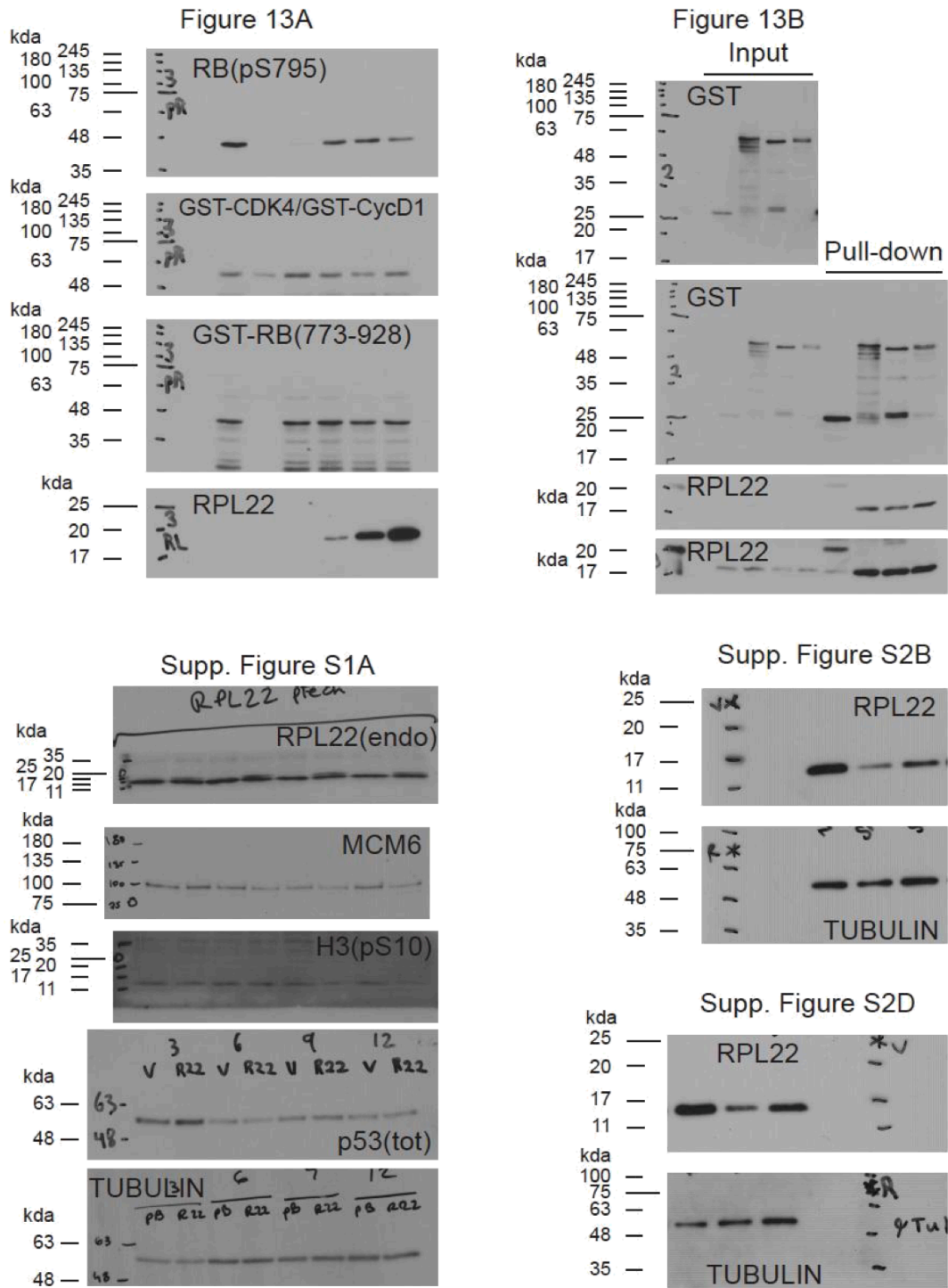


Figure S5. Unprocessed blots of Figure 13A-B and Supplementary Figure S1A, S2B, D

Of note, some membranes were cut into pieces to incubate with different antibodies.

Table S1. Sequence of shRNAs, QPCR primers and PCR cloning primers

Real-time PCR primers		
Name	5' forward primer (5'-3')	3' reverse primer (5'-3')
CDKN1A/p21	ACCCTTGTGCCTCGCTCAGG	GCGTTTGGAGTGGTAGAAATCTGT
CENPA	AATGGATTCTGCGATGCTGTCTGG	TTTTCAGGCCTTTGGAACGGGTGT
FANCD2	CCTTAGTAGCCGACTGAAACAGG	TGCAAGTAATGGACGCTCTG
GADD45A	TTGCAATAGACTTTGGAGGAA	CATCCCCACCTTATCCAT
HMBS	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC
IL6	CCAGGAGCCAGCTATGAACTC	AAGGCAGCAGGCAACACCAG
IL8	GGCACAACCTTTCAGAGACAGCA	GGCAAACCTGCACCTTCACACA
Kl67	AGAAGACAGTACCGCAGATGA	CGGCTCACTAATTTAACGCTGG
MCM6	ATCCCTCTTGCCAAGGATTT	GAAAAGTTCGGCTCACAAAGC
TBP	GCTGGCCCATAGTGATCTTTGC	CTTCACACGCCAAGAAACAGTGA
IL18	GCTGCCAACTCTGGCTGCTAAA	TCAGCAGCCATCTTTAATTCCTG
IL1B	CTCCGGGACTCACAGCAAAAA	AAGGACATGGAGAACAACAATTG
IL12A	ACCACTCCAAAACCTGCTGAG	CAATCTTTCAGAAGTGCAAGGGTA
CXCL1	TCCTGCATCCCCATAGTTA	CTTCAGGAACAGCCACCAGT
CXCL5	TCTGCTATGCTATTGAAGTTTTGG	TCACCTACAATTCAAGACACTTTGA
IGFBP1	GAGTTTAGCCAAGGCACAGGAGA	AGTCCCGCCTCTCCATCCAT
PCR cloning primers		
RPL22(WT)-Myc	CGCGGATCCACCATGGCTCTGTGAAAAAGCTTG	ACGCGTCGACTTATGCCAGATCCTCTTCTGAGATG
shRNAs		
Name	Vector	Sequence (sense strand 5'-3')
shNTC	pLKO	CAACAAGATGAAGAGCACCAA
shRPL22-A	pLKO	GTTCTGAAGTTCACCTCTTGAT
shRPL22-B	pLKO	CGAATTACGTTACTTCCAGAT
shNTC	MSCV	AATTGATGTGTTTAGTCGCTAG
shRB	MSCV	GCAGTTCGATATCTACTGAAATA
shp53	MSCV	GACTCCAGTGGTAATCTAC

Table S2. Statistics source data for QPCR, growth curves, SA-β-gal and IF

List of statistics source data of all QPCR biological replicates, growth curve biological replicates, SA-β-gal staining biological replicates and immunofluorescence biological replicates.

Fig S2A	Relative growth							
	Cells	Days	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
			Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
shNTC	0	1,00	0,01	1,00	0,05	1,00	0,005	
	3	1,76	0,14	3,75	0,20	1,98	0,07	
	6	2,38	0,16	6,96	0,62	4,52	0,04	
	9	5,07	1,24	13,47	1,41	7,59	0,59	
shRPL22-A	0	1,00	0,06	1,00	0,08	1,00	0,01	
	3	1,93	0,17	3,62	0,08	1,79	0,09	
	6	1,95	0,15	3,77	0,21	2,31	0,19	
	9	3,30	0,23	6,44	0,16	3,89	0,13	
shRPL22-B	0	1,00	0,06	1,00	0,05	1,00	0,06	
	3	1,76	0,20	2,19	0,03	1,83	0,03	
	6	1,59	0,05	3,12	0,005	2,34	0,05	
	9	2,05	0,02	3,11	0,16	3,12	0,17	

Fig S2C		Relative growth					
Cells	Days	n1 (biological)		n2 (biological)		n3 (biological)	
		Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors	Mean	Tech. errors
shNTC	0	1,00	0,11	1,00	0,03	1,00	0,08
	3	0,81	0,07	2,01	0,02	1,46	0,01
	6	1,55	0,02	3,92	0,15	2,3	0,21
	9	2,42	0,05	13,07	0,49	6,87	0,41
	12	9,67	0,65	33,01	1,42	15,95	0,78
shRPL22-A	0	1,00	0,03	1,00	0,02	1,00	0,11
	3	0,97	0,07	1,77	0,15	1,23	0,01
	6	1,53	0,14	2,59	0,04	1,78	0,05
	9	2,64	0,27	7,03	0,32	3,5	0,14
	12	5,87	0,84	16,71	1,81	5,68	0,98
shRPL22-B	0	1,00	0,02	1,00	0,03	1,00	0,02
	3	0,83	0,04	1,86	0,17	2,11	0,05
	6	ND	ND	2,2	0,07	2,57	0,11
	9	2,8	0,12	4,57	0,24	5,66	0,62
	12	6,66	0,47	6,94	0,31	8,82	0,24

Table S3. Less stringent analysis of CDK4(K35M) interactome in RSL1D1 knockdown-induced senescence

List of proteins that were identified to immunoprecipitate with 3xFLAG-CDK4(K35M) in IMR-90 cells induced into senescence by depletion of RSL1D1 as reported in (80) using a protein threshold consisting of P-value < 0.05 and minimum peptides # = 1. Source data can be found in (80)

Swiss Prot ID	Symbol	Protein names	Size in DA	Identified unique peptides
P38936	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDK-interacting protein 1) (Melanoma differentiation-associated protein 6) (MDA-6) (p21)	18 119	22 GLGLPKLYLPTGPR, VRGLGLPKLYLPTGPR, SGEQAEAGSPGGPGDSQGRKRR, SGEQAEAGSPGGPGDSQGRKR, SGEQAEAGSPGGPGDSQGRK, SGEQAEAGSPGGPGDSQGR, RRQTSMTDFYHSK, RQTSMTDFYHSKRR, RLIFSKRKP, RQTSMTDFYHSK, RQTSMTDFYHSKR, RLFGPVDSEQLSR, RLFGPVDSEQLSRD, RGRDELGGGR, QTSMTDFYHSKRR, LGLPKLYLPTGPRR, KRRQTSMTDFYHSK, LFGPVDSEQLSR, LYLPTGPR, LYLPTGPRR, QTSMTDFYHSK, QTSMTDFYHSKR
Q16543	CDC37	Hsp90 co-chaperone Cdc37 (Hsp90 chaperone)	44 468	29 AMKEYEEEEER, MEQFQKEKEELDR, MDPTDAKYHMQR, LQAEAQQLRKEER, LQAEAQQLRK, LGPGGLDPVEVYESLPEELQK,

		protein kinase-targeting subunit) (p50Cdc37) [Cleaved into: Hsp90 co-chaperone Cdc37, N-terminally processed]				KLKELEVAEGGKAELER, MEQFQKEKEELDRGCR, QIKHFGMLR, QYMEGFNDELEAFKER, RLGPGGLDPVEVYESLPEELQK, SMPWNVDTLK, SMVNTKPEKTEEDSEEV, SMVNTKPEKTEEDSEEVREQK, SMVNTKPEKTEEDSEEVREQKHK, SWEQKLEEMR, TADRQYMEGFNDELEAFKER, TFVEKYEK, TGDEKDVSV, VERMEQFQK, WRHQARVER, KLKELEVAEGGK, IKTADRQYMEGFNDELEAFKER, HKTFVEKYEK, HFGMLRR, CFDVKDVQMLQDAISKMDPTDAKY HMQR, ASEAKEGEEAGPGDPLLEAVPKTGD EKDVS, AMKEYEEEEERKK, ASEAKEGEEAGPGDPLLEAVPK
P24385	CCND1	G1/S-specific cyclin-D1 (B-cell lymphoma 1 protein) (BCL-1) (BCL-1 oncogene) (PRAD1 oncogene)		33 729	26	AAEEEEEEEEVDLACTPTDVRDVI, ACQEIQEALLESSLR, AMLKAEETCAPSVSYFK, AYPDANLLNDR, AYPDANLLNDRVLR, CVQKEVLPSMR, CVQKEVLPSMRK, FLSLEPVKK, LQLLGATCMFVASK, MKETIPLTAEK, MPEAEENKQIIR, MPEAEENKQIIRK, QAQQNMDPKAAEEEEEEEEVDLACTPTDVRDVI, RAYPDANLLNDR, SPNNFLSYRR
P07900	HSP90 A	Heat shock protein HSP 90-alpha (Heat shock 86 kDa) (HSP 86) (HSP86) (Lipopolysaccharide-associated protein 2) (LAP-2) (LPS-associated protein 2) (Renal carcinoma antigen NY-REN-38)		84 660	31	HIYYITGETKDQVANSFAVER, VILHLKEDQTEYLEER, VILHLKEDQTEYLEERR, GVVDSIDLPLNISR, HLEINPDHSIIETLR, YIDQEELNK, ADLNNLGTIAK, ALLFVPR, AQALRDNSTMGYMAAK, EKYYIDQEELNK, GTKVILHLKEDQTEYLEER, HLEINPDHSIIETLR, IKEKYIDQEELNK, KHLEINPDHSIIETLR, KVEKVVVSNR, LGIHEDSQNR, NNIKLYVR, NPDDITNEEYGEFYK, RAPFDLFENR, SLTNDWEDHLAVK, TDTGPEMGR, TKFENLCK, TKPIWTR, TKPIWTRNPDDITNEEYGEFYK, TLTIVDTGIGMTK, TLTIVDTGIGMTKADLNNLGTIAK, TLVSVTK, VILHLKEDQTEYLEER, VILHLKEDQTEYLEERR, YIDQEELNK, YIDQEELNKTKPIWTRNPDDITNEEYGEFYK
P42772	CDKN2 B	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B		14 722	15	AIQVMMMG SAR, EGFLDTLVVLHR, GHRDVAGYLR, GMPGGGSDEGLASAAAR, LDVRDAWGR,

		(Multiple tumor suppressor 2) (MTS-2) (p14-INK4b) (p15-INK4b) (p15INK4B)				MREENKGMPSGGGSDEGLASAAAR , PATLTRPVHDAAR, PSGGGSDEGLASAAAR, QLLEAGADPNGVNR, RAIQVMMMSAR, VAELLLLHGAEPN, VAELLLLHGAEPNCAD, VAELLLLHGAEPNCADPATLTRPVH DAAR, VRQLEAGADPNGVNR, VRQLEAGADPNGVNRFR
P12004	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin)		28 769	9	DLSHIGDAVVISCAK, FSASGELGNNGNIK, IADMGHLK, LMDLDVEQLGIPEQEYSCVVK, LSQTSNVDKKEEAVTIEMNEPVQLT FALR, MPSGEFAR, YLNFFTK, YYLAPKIEDEEGS
P30281	CCND3	G1/S-specific cyclin-D3		32 520	6	ASYFQCVQR, GSSSQGPSQTSTPTDVTAIHL, LEERYVPR, LLGDQRVLQSLLR, VLQSLLR, VLQSLRLLEER
P15924-2	DESP	Desmoplakin (DP) (250/210 kDa paraneoplastic pemphigus antigen)		331 77 4	6	AESGPDRLRYEVTSGGGGTSR, LASLEELKR, LQRLEDELNRAK, RGVITDQNSDGYCQTGTMSR, SVEEVASEIQPFLR, TMIQSPSGVILQEAADVHAR
Q06830	PRDX1	Peroxiredoxin-1 (EC 1.11.1.15) (Natural killer cell-enhancing factor A) (NKEF-A) (Proliferation-associated gene protein) (PAG) (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2)		22 110	4	IGHPAPNFK, KQGGLGPMNIPLVSDPKR, QITVNDLPVGR, SKEYFSKQK
P68431	H31	Histone H3.1 (Histone H3/a) (Histone H3/b) (Histone H3/c) (Histone H3/d) (Histone H3/f) (Histone H3/h) (Histone H3/i) (Histone H3/j) (Histone H3/k) (Histone H3/l)		15 404	4	KQLATKAAR, RVTIMPKDIQLAR, VTIMPKDIQLAR, YRPGTVALR
Q02413	DSG1	Desmoglein-1 (Cadherin family member 4) (Desmosomal glycoprotein 1) (DG1) (DGI) (Pemphigus foliaceus antigen)	DS G1 CD HF4	113 74 8	6	ALNSMGQDLERPLELRVR, ESSNVVTER, IHSDCAANQQVTYR, IIRQEPSDSPMFIINR, SSSDHHFNQTIGSASPSTAR, VIAPSSSLPTSLTIHHPR

P04908	H2A isoforms	Histone H2A type 1-B/E (Histone H2A.2) (Histone H2A/a) (Histone H2A/m)	HIS T1H 2AB H2 AF M; HIS T1H 2AE H2 AF A	14 135	3	AGLQFPVGR, AGLQFPVGRVHR, SSRAGLQFPVGR
O60814	H2B1K	Histone H2B type 1-K (H2B K) (HIRA-interacting protein 1)	HIS T1H 2BK H2B FT HIR IP1	13 890	9	AVTKYTSAK, HAVSEGTKAVTK, HAVSEGTKAVTKYTSAK,LAHYNKR , LLLPGELAK,PEPAKSAPAPK,QVHP DTGISSK,STITSREIQTAVR, VLKQVHPDTGISSK
P42773	CDKN2 C	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor C (Cyclin-dependent kinase 6 inhibitor) (p18-INK4c) (p18-INK6)	CD KN 2C CD KN 6	18 127	4	GANPDLKDRTGFAVIHDAAR, LGNPEIARR, TALQVMK, TALQVMKLGNPEIAR
Q04837	SSBP	Single-stranded DNA-binding protein, mitochondrial (Mt-SSB) (MtSSB) (PWP1-interacting protein 17)	SSB P1 SSB P	17 260	3	ESETTTSLVLER, SGDSEVYQLGDVVSQKTTWHR, SLNRVHLLGR
P14543-2	NID	Nidogen-1 (NID-1) (Entactin)	NID 1 NID	136 37 7	2	VLFDLVLNPR, YALSNSIGPVR
P09382	LEG1	Galectin-1 (Gal-1) (14 kDa laminin-binding protein) (HLBP14) (14 kDa lectin) (Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (Galaptin) (HBL) (HPL) (Lactose-binding lectin 1) (Lectin galactoside-binding soluble 1) (Putative MAPK-	LG ALS 1	14 716	1	VRGEVAPDAK

		activating protein PM12) (S-Lac lectin 1)				
P07942	LAMB1	Laminin subunit beta-1 (Laminin B1 chain) (Laminin-1 subunit beta) (Laminin-10 subunit beta) (Laminin-12 subunit beta) (Laminin-2 subunit beta) (Laminin-6 subunit beta) (Laminin-8 subunit beta)	LA MB 1	198 03 8	3	ALDPAFKIEDPYSPR, AAQNSGEAEYIEKVVYTVK, ISGVIGPYRETVDSVER
P62805	H4	Histone H4	HIS T1H 4A H4/A H4F A; HIS T1H 4B H4/I H4F I; HIS T1H 4C H4/G H4F G; HIS T1H 4D H4/B H4F B; HIS T1H 4E H4/J H4F J; HIS T1H 4F H4/C H4F C; HIS T1H 4H H4/	11 367	3	DNIQGITKPAIR, DNIQGITKPAIRR, TVTAMDVVYALKR

			H H4F H; HIS T1H 4I H4/ M H4F M; HIS T1H 4J H4/ E H4F E; HIS T1H 4K H4/ D H4F D; HIS T1H 4L H4/ K H4F K; HIS T2H 4A H4/ N H4F 2 H4F N HIS T2H 4; HIS T2H 4B H4/ O H4F O; HIS T4H 4			
Q9Y2D 5	AKAP2	A-kinase anchor protein 2 (AKAP-2) (AKAP-KL) (Protein kinase A-anchoring protein 2) (PRKA2)	AK AP2 KIA A09 20 PR KA 2	94 661	3	LWAEDGEFTSAR, QVLQSTQSPR, YSEAAELR

P62807	H2B1C	Histone H2B type 1-C/E/F/G/I (Histone H2B.1 A) (Histone H2B.a) (H2B/a) (Histone H2B.g) (H2B/g) (Histone H2B.h) (H2B/h) (Histone H2B.k) (H2B/k) (Histone H2B.l) (H2B/l)	HIS T1H 2BC H2B FL; HIS T1H 2BE H2B FH; HIS T1H 2BF H2B FG; HIS T1H 2BG H2B FA; HIS T1H 2BI H2B FK	13 906	9	AVTKYTSSK, HAVSEGTKAVTK, HAVSEGTKAVTKYTSSK, LAHYNKR, LLLPGELAK, PEPAKSAPAPK, QVHPDTGISSK, STITSREIQTAVR, VLKQVHPDTGISSK
P08107	HSP71	Heat shock 70 kDa protein 1B/Heat shock 70 kDa protein 1A		70 052	8	ALRDAKLDK, IINEPTAAAIAAYGLDR, ITITNDKGR, NQVALNPQNTVFDKAKR, TTPSYVAFTDTER, TTPSYVAFTDTERLIGDAAK, VEIANDQGNR, VQVSYKGETK
HSP71	CDKN1 B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (Cyclin-dependent kinase inhibitor p27) (p27Kip1)	CD KN 1B KIP 1	22 073	3	ANRTEENVSDGSPNAGSVEQTPKKP GLR, QAEHPKPSACR, VSNGSPSLER
Q8WU M4	PDC6I	Programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6-interacting protein) (ALG-2-interacting protein 1) (ALG-2-interacting protein X) (Hp95)	PD CD6 IP AIP 1 ALI X KIA A13 75	96 023	3	STPVNVPISQK,STPVNVPISQKFTDL FEK, TMQGSEVVNVLK
P05089	ARG1I	Arginase-1 (EC 3.5.3.1) (Liver-type arginase) (Type I arginase)	AR G1	34 735	2	GGVEEGPTVLR, TIGIIGAPFSKGQPR
P31943	HNRH isoform	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNP H)	HN RN PH1 HN	49 229	2	STGEAFVQFASQEIAEK, THYDPPRK

		[Cleaved into: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H, N-terminally processed]	RP H HN RP HI			
P05556	ITB1	Integrin beta-1 (Fibronectin receptor subunit beta) (Glycoprotein IIa) (GPIIA) (VLA-4 subunit beta) (CD antigen CD29)	ITG B1 FN RB MD F2 MS K12	88 415	1	LKPEDITQIQPQQLVLR
P04792	HSPB1	Heat shock protein beta-1 (HspB1) (28 kDa heat shock protein) (Estrogen-regulated 24 kDa protein) (Heat shock 27 kDa protein) (HSP 27) (Stress-responsive protein 27) (SRP27)	HSP B1 HSP 27 HSP 28	22 783	2	LATQSNEITIPVTFESR, LFDQAFGLPR
Q08554	DSC1	Desmocollin-1 (Cadherin family member 1) (Desmosomal glycoprotein 2/3) (DG2/DG3)	DS C1 CD HF1	99 987	2	MKVQDQDLNTPHSK, VQDQDLNTPHSK
Q14247-2	SRC8	Src substrate cortactin (Amplaxin) (Oncogene EMS1)	CTT N EM S1	61 586	2	HASQKDYSSGFGGK, TVPVEAVTSK
Q8NC51-2	PAIRB	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein (PAI1 RNA-binding protein 1) (PAI-RBP1) (SERPINE1 mRNA-binding protein 1)	SER BP1 PAI RBP 1 CGI -55	44 965	2	SAAQAAAQTNSNAAGK, VGRRPDQQLQGEGK
Q05682-2	CALD1	Caldesmon (CDM)	CA LD1 CA D CD M	93 231	2	ASVDTKEAEGAPQVEAGKR, LKHTENTFSRPGGR

P62263	RS14	40S ribosomal protein S14	RPS14 PRO2640	16273	2	IGRIEDVTPIPSDSTRR, TPGPGAQSALR
P12273	PIP	Prolactin-inducible protein (Gross cystic disease fluid protein 15) (GCDFP-15) (Prolactin-induced protein) (Secretory actin-binding protein) (SABP) (gp17)	PIPGC DFP15 GPIP4	16572	1	KIIIKNFDIPK
P23528	COF1	Cofilin-1 (18 kDa phosphoprotein) (p18) (Cofilin, non-muscle isoform)	CFL1 CFL	18502	1	SSTPEEVKKR
O43707		Alpha-actinin-4 (Non-muscle alpha-actinin 4)	ACTN4	104854	ambiguous	
O43707	MIF1	Macrophage migration inhibitory factor (MIF) (EC 5.3.2.1) (Glycosylation-inhibiting factor) (GIF) (L-dopachrome isomerase) (L-dopachrome tautomerase) (EC 5.3.3.12) (Phenylpyruvate tautomerase)	MIF GLIF MIF	12476	1	PMFIVNTNVPR
P31944	CASPE	Caspase-14 (CASP-14) (EC 3.4.22.-) [Cleaved into: Caspase-14 subunit p17, mature form; Caspase-14 subunit p10, mature form; Caspase-14 subunit p20, intermediate form; Caspase-14 subunit p8, intermediate form]	CASP14	27680	1	KTNPEIQSTLR

P33778	H2B1 Isoform	Histone H2B type 1-B (Histone H2B.1) (Histone H2B.f) (H2B/f)	HIS T1H 2BB H2B FF	13 950	9	AVTKYTSSK, HAVSEGTKAVTK, HAVSEGTKAVTKYTSSK, LAHYNKR, LLLPGELAK, PEPSKSAPAPK, QVHPDTGISSK, STITSREIQTAVR, VLKQVHPDTGISSK
P47929	LEG7	Galectin-7 (Gal- 7) (HKL-14) (PI7) (p53- induced gene 1 protein)	LG ALS 7 PIG 1; LG ALS 7B	15 075	1	SSLPEGIRPGTVLR
P02765	FETUA	Alpha-2-HS- glycoprotein (Alpha-2-Z- globulin) (Ba- alpha-2- glycoprotein) (Fetuin-A) [Cleaved into: Alpha-2-HS- glycoprotein chain A; Alpha- 2-HS- glycoprotein chain B]	AH SG FET UA PR O27 43	39 325	1	CDSSPDSAEDVRK
P10809	CH60	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (HuCHA60) (Mitochondrial matrix protein P1) (P60 lymphocyte protein)	HSP D1 HSP 60	61 055	1	ALMLQGVDLLADAVAVTMGPK
P14649	MYL6B	Myosin light chain 6B (Myosin light chain 1 slow- twitch muscle A isoform) (MLC1sa) (Smooth muscle and nonmuscle myosin light chain alkali 6B)	MY L6B ML C1S A	22 764	1	ALGQNPTNAEVLK
P18124	RL7	60S ribosomal protein L7	RPL 7	29 226	1	IALTDNALIAR

P24941	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2 (EC 2.7.11.22) (Cell division protein kinase 2) (p33 protein kinase)	CDK2 CDKN2	33930	2	LADFGLAR, VVPPLDEEDGRSLLSQMLHYDPNKR
P25705	ATPA	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATP5A1 ATP5A ATP5AL 2 ATPM	59751	1	VGLKAPGIIPR
P26599-2	PTBP1	Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTB) (57 kDa RNA-binding protein PPTB-1) (Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I) (hnRNP I)	PTBP1 PTB	57221	1	KLPIDVTEGEVISLGLPFGK
P27816-5	MAP4	Microtubule-associated protein 4 (MAP4)	MAP4	121005	1	LATNTSAPDLKNVR
P30101	PDIA3	Protein disulfide-isomerase A3 (EC 5.3.4.1) (58 kDa glucose-regulated protein) (58 kDa microsomal protein) (p58) (Disulfide isomerase ER-60) (Endoplasmic reticulum resident protein 57) (ER protein 57) (ERp57) (Endoplasmic reticulum resident protein 60) (ER protein 60) (ERp60)	PDI A3 ERP57 ERP60 GR P58	56782	1	LAPEYEAAAATR
P35268	RL22	60S ribosomal protein L22 (EBER-associated protein) (EAP) (Epstein-Barr virus small RNA-associated	RPL22	14787	1	AGNLGGGVVTIER

		protein) (Heparin-binding protein HBp15)				
P55273	CDKN2D	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor D (p19-INK4d)	CDKN2D	17700	1	DARGLTPLELALQR
P61247	RS3A	40S ribosomal protein S3a (v-fos transformation effector protein) (Fte-1)	RPS3A FTE1 MFTL	29945	1	ATGDETGAKVER
P61313	RL15	60S ribosomal protein L15	RPL15 EC45 TCBA P0781	24146	1	SLQSVAEER
P61978-2	HNRPK	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) (Transformation up-regulated nuclear protein) (TUNP)	HN RN PK HN RP K	50976	1	ILSISADIETIGEILKK
P62701		40S ribosomal protein S4, X isoform (SCR10) (Single copy abundant mRNA protein)	RPS4X CCG2 RPS4 SCAR	29598	1	GIPHLVTHDAR
P83731	RL24	60S ribosomal protein L24 (60S ribosomal protein L30)	RPL24	17779	1	QKIVKPVKVSAPR
Q15942	Y	Zyxin (Zyxin-2)	ZYX	61277	1	GPPASSPAPAPK
Q6KB66-2	ZYX	Keratin, type II cytoskeletal 80 (Cytokeratin-80) (CK-80) (K80) (Type-II keratin Kb20)	KR80 KB20	50525	1	SLEEAEAYSRSQLEEQAAR
Q8WX93	PALLD	Palladin (SIH002) (Sarcoma antigen NY-SAR-77)	PALLD KIAA0992	150564	1	IASDEEIQGTKDAVIQDLER

			CGI -151			
Q92626	PXDN	Peroxidasin homolog (EC 1.11.1.7) (Melanoma-associated antigen MG50) (Vascular peroxidase 1) (p53-responsive gene 2 protein)	PX DN KIA A02 30 MG 50 PR G2 VP O VP O1	165 27 5	1	SPNDLLALFR
Q9BUF5	TBB6	Tubulin beta-6 chain (Tubulin beta class V)	TU BB6	49 857	1	INVYYNESSSQKYVPR
P23588	IF4B	Eukaryotic translation initiation factor 4B (eIF-4B)	EIF 4B	69 151	1	STPKEDDSSASTSQSTR

3. La sénescence diminue les erreurs de translecture du ribosome

3.1. Mise en contexte de l'article 2

L'objectif de cet article et deuxième but de cette thèse est l'étude de la fidélité de la terminaison de la traduction. Des résultats préliminaires sur la diminution des erreurs de translecture dans les cellules sénescents, nous ont conduits à approfondir les causes potentielles de ce phénomène. La biogenèse des ribosomes est affectée dans les cellules sénescents (80). Cependant, nous avons émis l'hypothèse que les ribosomes produits dans ces cellules termineraient la synthèse des protéines avec une grande fidélité, en atténuant le stress subi lors de la sénescence. En utilisant un système de rapporteurs à deux luciférases, nous avons mesuré les erreurs de translecture du codon d'arrêt dans des fibroblastes primaires sénescents, ainsi que dans des fibroblastes normaux en prolifération, de même que dans des fibroblastes ayant contourné la sénescence et enfin dans des fibroblastes ayant un comportement malin. Parmi les phénotypes évalués dans cet article, la sénescence limitait significativement les erreurs de translecture du codon d'arrêt par comparaison aux cellules malignes et aux cellules qui avaient contourné la sénescence. Ces dernières montraient les taux d'erreurs les plus élevés. En utilisant des outils génétiques et différentes approches biochimiques pour inhiber la voie de RB, nous avons observé que cette voie était impliquée dans la diminution d'erreurs de translecture. Même si la voie de p53 ne semblait pas être aussi impliquée, nous ne pouvons cependant pas écarter la possibilité de son rôle dans la translecture du codon d'arrêt. RPL22/eL22 et RPS14/uS11 semblent avoir également un effet sur la diminution de la translecture du codon d'arrêt puisque leur expression augmentée chez les fibroblastes cause la diminution d'environ 35% du taux d'erreur. Ceci suggère la participation de RPL22/eL22 et RPS14/uS11 à travers la voie de RB dans l'efficacité de terminaison de la traduction.

3.2. Contribution à l'article 2

Pour cet article j'ai réalisé la majorité des expériences. Plus précisément, j'ai réalisé l'ensemble des travaux conduisant aux **Figures 14-18** et **19B-D**, aux **Figures Supplémentaires S6-S9**, et aux **Tableaux supplémentaires S3-S7**. Conjointement avec Frédéric Lessard nous avons effectué des expériences de culture de cellules parallèles pour les **Figures 14D-F**. Frédéric Lessard a réalisé les western blots de la **Figure 14G** et conjointement avec Jacob Bouchard ils ont effectué des expériences de culture de cellules parallèles pour les **Figures 19A-C**. Sarah Tardif a confirmé les expériences des **Figures 15B; S3A, S5A-D**. Véronique Bourdeau a préparé des lignées IMR-90-HTERT exprimant constitutivement E6/E7, H-RAS et les rapporteurs à deux luciférases. Conjointement avec Gerardo Ferbeyre et Léa Brakier-Gingras, nous avons rédigé l'ensemble de l'article. Conjointement avec Frédéric Lessard, Véronique Bourdeau, Gerardo Ferbeyre, Léa Brakier-Gingras nous avons contribué à la révision du manuscrit.

3.3. Article 2

The retinoblastoma tumor suppressor limits ribosomal readthrough during oncogene induced senescence

Neylen del Toro^{1*}, Frédéric Lessard^{1*}, Sarah Tardif¹, Jacob Bouchard¹, Véronique Bourdeau¹, Gerardo Ferbeyre^{1,2**} and Léa Brakier-Gingras^{1**}

¹ Département de Biochimie et Médecine Moléculaire, Université de Montréal C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.

²CRCHUM, 900 Saint-Denis, bureau R10.432, Montréal, Québec, H2X 0A9, Canada

- * Co-first authors
- **To whom correspondence should be addressed. E-mail: g.ferbeyre@umontreal.ca or lea.brakier.gingras@umontreal.ca

3.2.1. Summary

The origin and evolution of cancer cells is considered to be mainly fueled by mutations affecting the DNA sequence. Although errors in translation could also expand the cellular proteome, their role in cancer biology remains poorly understood. Tumor suppressors called caretakers block cancer initiation and progression by preventing DNA mutations and/or stimulating DNA repair. If translational errors contribute to tumorigenesis, then caretakers genes will prevent such errors in normal cells in response to oncogenic stimuli. Here, we show that the retinoblastoma protein (RB) acts as caretaker tumor suppressor by preventing the readthrough of termination codons, a process that allows proteins to be synthesized with additional domains. In particular, we show that expression of oncogenic *ras* in normal human cells triggers a cellular senescence response characterized by a significant reduction of basal ribosomal readthrough. However, inactivation of the RB tumor suppressor pathway in these cells, using the viral oncoprotein E7 or the oncogenic kinase CDK4 increased readthrough. Conversely, activation of the RB pathway by the tumor suppressor PML, the ribosomal proteins RPS14/uS11 and RPL22/eL22 or the CDK4/6 inhibitor palbociclib reduced readthrough. We thus reveal a novel function for the RB pathway as a caretaker of translational errors with implications for tumor suppression and cancer treatment.

Keywords: Senescence, readthrough, translation termination, retinoblastoma (RB) tumor suppressor, dual-luciferase reporter

3.2.2. Introduction

Cellular senescence is a tumor suppressor mechanism that prevents proliferation in cells bearing oncogenic stimuli (202). Senescent cells can efficiently halt tumor progression by remaining out of the cell cycle permanently as benign lesions (202,203). Ideally, they also activate their elimination through immune mediated clearance (204,205). However, if not cleared, some senescent cells can occasionally escape from their dormancy and progress into malignant tumors (206,207). There is a great heterogeneity in the senescence response depending on the inducer, tissue type and genetic background (208). Nevertheless, most senescent cells activate the p53 and retinoblastoma (RB) tumor suppressor pathways that block cell cycle progression (30,202,203). In epithelial cells, reactive oxygen species and DNA damage were linked to senescence bypass and malignant progression (209,210). These results also suggest that mutations that inactivate the major tumor suppressor pathways mediating senescence contribute to circumvent this process. Yet, in many human cell types, inactivation of either p53 or RB is not sufficient to bypass senescence (211,212), indicating that senescence is a robust process and that disabling multiple genes is required to bypass it. Consistent with this idea, it has been recently demonstrated that epigenetic changes controlling the expression of several tumor suppressors contribute to senescence bypass and tumor progression (213-216). In addition to epigenetics, the cellular protein repertoire and thus their activities can be extended at the translational level (217). However, little is known about the contribution of translational errors in tumorigenesis.

In normal cells, translational errors in the form of amino acid misincorporation are estimated to occur at a reduced frequency and unlikely to significantly affect the proteome (218). However, translational recoding by frameshifting or readthrough can generate novel protein variants with the potential to notably alter a cellular phenotype. In yeast, a prion protein called PSI⁺ impairs translation termination and confers advantage under stress conditions (219). Moreover, translational recoding is often used by viruses to increase the coding potential of their small genomes (217). For example, retroviruses use frameshifting to control the synthesis of viral replication proteins (220). Overall, translational readthrough, originally discovered in viruses and now extended to metazoans, can add a new C-terminal signal to proteins, changing their function and localization (142,149,221). The extensions usually contain potential signals to

target proteins to the nucleus, peroxisomes, or the membrane (149,221). Taken together, the available evidence suggests that tumor cells could use such recoding mechanisms to generate new protein variants and evolve. Therefore, tumor suppressor pathways could counteract readthrough as part of their mechanism of action.

Here we describe that translational readthrough is significantly reduced during oncogene-induced senescence, an anticancer response controlled by the tumor suppressors RB, p53 and PML. Using defined genetic tools, we also show that senescence-associated readthrough suppression is mediated by the RB tumor suppressor pathway.

3.3.3. Materials and Methods

Cell culture and materials

IMR-90 human diploid fibroblasts were obtained from Coriell Institute for Medical Research (New Jersey, NY) and ATCC. IMR-90 containing human telomerase reverse transcriptase (hTERT) were generated in our laboratory by transducing cells with the FG12-hTERT lentiviral vector (222). Phoenix amphi packaging cells used for retroviral infections were given by S.W. Lowe (Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Wisent) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Wisent), 1% penicillin G/streptomycin sulfate (Wisent) and 2 mmol/L L-glutamine (Wisent). The translation elongation inhibitor cycloheximide and the aminoglycoside gentamicin sulfate were purchased from Sigma-Aldrich. The CDK4/6 inhibitor palbociclib (PD-0332991) was purchased from Chemietek. A phthalamide derivative named CDX5-1 was donated by M. Roberge (University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada).

Plasmids and cloning

Retroviral vectors pMSCV, pBabe/pBabe-ER, pBabe-H-RasV12, pWZL/pWZL-H-RasV12 were described in (28), pBabe-PML-IV-ER in (30), pLXSN, pLXSN-E6, pLXSN-E7, pLXSN-

E6/E7 and pLXSN-E7 Δ 21-24 in (193), pBABE-RPL22(WT)-Myc in (223), pBABE-RPS14(WT)-Myc in (80). pBABE-CDK4(WT) was a gift from Scott W. Lowe (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New-York, NY). The genes coding for Renilla luciferase (Rluc) and Firefly luciferase (Fluc) were linked by an intercistronic region in order to obtain a 96 kDa bifunctional protein (224). These reporters were PCR-amplified and subcloned in NotI/NsiI restriction sites to obtain pMSCV-Rluc-Fluc variants. A UGA stop codon, created by site-directed mutagenesis using PfuUltra II fusion HS DNA polymerase (Agilent, Canada), was inserted in the intercistronic sequence. Primers for PCR are provided in Supplementary Table 4. The readthrough region from Moloney Murine Leukemia Virus (MMuLV) as well as sequences flanking the stop codon from the readthrough sequence of Aquaporin 4 (AQP4, NM_001650.4) (154), were chemically synthesized (Biocorp, Canada) and subcloned in XhoI/ApaI restriction sites between Rluc and Fluc genes. The readthrough region sequences are provided in **Supplementary Table 5**. The non-readthrough control was performed by mutating the stop codon TGA to CGA.

Identification of novel readthrough events in mammalian cells using bioinformatic analysis

In order to look for endogenous readthrough candidates we first predicted in silico candidate readthrough events that could be detected by proteomics experiments. We built a database of peptide sequences located between the first arginine/lysine after the canonical stop codon and the next stop codon, always in the same reading frame using sequences deposited in RefSeq hg38.2. We discarded sequences shorter than 5 amino acids. Candidate readthrough peptides were then matched to the data set of peptides identified by trypsin digestion of human proteins and mass spectrometry at (225). We found 278 readthrough specific peptides above the false discovery rate (FDR) threshold (**Supplementary Table 6**). Following a readthrough propensity predictor algorithm (149), four candidates showing the highest readthrough propensity values were chosen. This algorithm assigns regression coefficients to the stop codon and all possible nucleotides in the stop codon context based on experimental data. The stop codon context comprises the nucleotide sequences from -6 to +9 positions surrounding the stop codon. The new readthrough candidates are: Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP,

NM_003370.3), Aspartate beta hydroxylase (ASPH, NM_004318.3), Hepsin (HPN, NM_182983.2) and Fibrillarin (FBL, NM_001436.3). Oligonucleotides containing 30 up-stream and 30 down-stream nucleotides flanking the stop codon, as well as the stop codon of those readthrough candidates were chemically synthesized (Biocorp, Canada) and subcloned in XhoI/ApaI restriction sites between Rluc and Fluc genes of our pMSCV-Rluc-Fluc reporter construct. The readthrough region sequences are provided in **Supplementary Table 5**.

Polysome fractionation

The protocol was performed as previously described (226). Briefly, 60% (w/v) sucrose stock solution was used to make sucrose gradients (5 to 50%) in a buffer containing 200 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 M KCl, 50 mM MgCl₂, 100 µg/ml cycloheximide, 1X protease inhibitor cocktail (EDTA-free) (Roche) and 200 units/ml of RNase inhibitor (abm-Applied Biological Materials, BC). After 12 days post-infection, proliferating and senescent fibroblasts at 80-90% confluence were treated with cycloheximide at a final concentration of 100 µg/ml for 5 min at 37°C. Cells were washed with ice-cold 1X PBS - 100 µg/ml cycloheximide, scratched and lysed in a hypotonic buffer (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 2.5 mM MgCl₂, 1.5 mM KCl, 1X protease inhibitor cocktail (EDTA-free), 100 µg/mL cycloheximide, 1 mM DTT, 100 units of RNase inhibitor, followed by addition of 25 µl of 10% Triton X-100 (final concentration of 0.5%) and 25 µl of 10% sodium deoxycholate (final concentration of 0.5%). Cells were vortexed and then centrifuged at low speed (140 x g) for 15 min at 4°C. Sample supernatants were adjusted so that they contain the same OD (10-20 OD at 260 nm). The lysate was loaded onto the ultracentrifuge tubes containing sucrose gradients, then centrifuged at 22,223 x g (36,000 rpm) for two hours at 4°C using SW41Ti rotor Beckman Coulter (Optima L80 XP ultracentrifuge). After ultracentrifugation, the samples were placed in the UV detector (Brandel #IV-22-117140) and fraction collector (Retriever 500, Teledyne Isco). Each fraction was collected and monitored from the top to the bottom of the ultracentrifuge tube.

Dual-luciferase Assays

IMR-90 transduced cells were washed with 1X PBS, scratched and lysed in 1X Passive lysis buffer supplied in the Dual Luciferase Stop & Glo® Reporter Assay System (Promega). A 20 µl cell lysate sample was used for luminescence measurements with Lumin Triathler-Hidex. After adding 50 µl of the Fluc reagent (Substrate + Buffer) to the samples, luminescence was measured for 10 seconds. Addition of 50 µl of the Rluc reagent-Fluc quenching (Stop & Glo®) preceded another 10 seconds measurement. In order to compare the readthrough fold-changes, relative Fluc activities (Fluc/Rluc) of each condition were normalized to the relative Fluc activities from non-senescent cells:

$$\text{Normalized Fluc/Rluc} = \left(\frac{\text{Fluc/Rluc (x condition)}}{\text{Fluc/Rluc (non-senescent cells)}} \right)$$

All assays were performed in technical triplicates. Normalized relative Fluc fold changes and Fluc/Rluc ratios are provided in Supplementary Table 7 as well as all biological replicates.

Immunoblotting

To prepare total cell extracts, cells were washed with 1X PBS containing 1X protease and phosphatase Inhibitor cocktails (Roche), scratched and collected by a centrifugation at low speed (140 x g) for 5 min, lysed in 200 µl of SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS and 5% 2-mercaptoethanol), and boiled for 5 min. Fifteen µg of total cell proteins were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Millipore). The primary antibodies used were anti-Renilla Luciferase rabbit polyclonal (1:3000, Code No. PM047, MBL), anti-H-Ras mouse monoclonal (1:250, clone F235, Sc-29, Santa Cruz Biotechnology), anti-phospho-H3^{S10} rabbit polyclonal (1:1000, #06-570, Millipore, Billerica, MA), anti-RB mouse monoclonal (1:1000, clone 4H1, #9309, Cell Signaling), anti-MCM6 rabbit polyclonal (1:1000, A300-194A, Bethyl Laboratories), anti-p53 mouse monoclonal (1:1000, clone DO-1, sc-126, Santa Cruz Biotechnology), anti-c-Myc rabbit polyclonal (1:1000, clone A-14, sc-789, Santa Cruz Biotechnology) and anti-α-tubulin mouse monoclonal (B-5-1-2, 1:20000, Sigma). Signals were revealed after incubation with goat anti-

mouse IgG (1:3000, #170-6516, Bio-Rad, Mississauga, ON) or goat anti-rabbit IgG (1:3000, #170-6515, Bio-Rad, Mississauga, ON) secondary antibodies, and by using enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham) or Lumi-LightPLUS (Roche).

Cell proliferation assay and Senescence-associated β -galactosidase assay

Relative density of cells was assessed from estimations of cell number according to crystal violet retention assay (30). The senescence associated β -galactosidase (SA- β -Gal) activity was measured at day 12 or 35 post-infection as previously described (30). All assays were performed in technical triplicates.

Real Time PCR

Senescent and non-senescent IMR-90s were collected at 12- or 35-days post-infection, with either pBabe-H-RasV12 or pBabe control vector in TRIzol reagent (Invitrogen) and total RNA was extracted following manufacturer's instructions. RNAs were reverse-transcribed into first-strand cDNA using All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (abm-Applied Biological Materials, BC), diluted and then amplified by qPCR using LightCycler® 96 (Roche Diagnostics) and SYBR Green PCR mix previously described in (30). Analysis for indicated genes were done, using HMBS and TBP as reference genes. Primers for qPCR are provided in **Supplementary Table 8**. All assays were performed in technical triplicates.

Statistics and reproducibility

Statistical analysis (One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference)) was done using the One-way ANOVA test calculator at: http://astatsa.com/OneWay_Anova_with_TukeyHSD/. Two-tailed Student's *t*-tests were performed using GraphPad Prism version 6.0c software. A $p < 0.05$ was considered statistically significant. Each experiment was repeated at least three times, except for those in **Figures: 15C-D; 16B** (UGA), and **Supplementary Figure S6C-E and S7D**, which were done twice. SA- β -

Gal assays were quantified from many fields within one experiment to represent the entire petri dish and confirmed as described in **Figures 18C** and **S6A**.

3.3.4. Results

Translation termination is improved in oncogene-induced senescence

To investigate the effect of cellular senescence on readthrough efficiency, we first used a model of oncogene-induced senescence (OIS) in human primary cells. Primary fibroblasts were retrovirally transduced with pBabe-H-RasV12 (senescence inducer) or the control empty vector pBabe. They were also transduced with luciferase reporter plasmids containing either: 1) a TGA within an artificial intercistronic region (UGA readthrough); 2) the stop codon context from AQP4, a well-known mammalian readthrough candidate (154); or 3) the non-readthrough controls (TGA mutated to CGA) between Rluc and Fluc fusion protein gene (**Figure 14A**). Immunoblotting shows a band at 35 kDa corresponding to Renilla luciferase, as well as a weak band at 100 kDa indicating the fusion protein Renilla-Firefly luciferase produced after a ribosomal readthrough in cells transduced with the AQP4 readthrough reporter. For UGA reporter, the fusion protein is not detectable by the western blot technique. On the other hand, in cells transduced with the non-readthrough control only the fusion protein can be detected (**Figure 14B**). At early stages of OIS, cells present a cancer-like behavior characterized by a hyperproliferation phase. However, around 6 days after introduction of oncogenic *ras*, cells stop proliferation and enter a well-characterized and stable cell cycle arrest (80). We confirmed this senescent cell cycle arrest at day 12 post-infection, using an assay for the senescence-associated β -galactosidase activity that allowed visualizing characteristic large and flat cells that stained positive for this biomarker (**Figure S6A**). RT-qPCRs were carried out to evaluate the decrease of Ki-67 expression, indicating the proliferation arrest, and the activation of p53 and RB pathways in senescent cells (**Figure S6B**). Global translation was not affected in senescent cells since their polysome profiles (**Figure 14C**) were similar to control growing cells. This is consistent with previous reports and with the fact that senescent cells are actively secreting

multiple pro-inflammatory mediators (81). In addition, the non-readthrough (CGA) controls presented similar relative Fluc activities both in senescent and proliferating cells (**Figure S6C**). Cap-dependent Rluc luciferase expression increased with time (**Figure 14D**). Readthrough-dependent translation of the firefly luciferase reporter increased early after introduction of oncogenic *ras* in normal human fibroblasts when cells proliferate rapidly but it decreased when the cells underwent OIS as measured at days 12 or 20 after H-Ras-introduction (**Figure 14E**). The relative efficiency of readthrough was calculated by dividing Fluc by Rluc values, then normalized to the relative Fluc activities from non-senescent cells (Vector). The results clearly show that the senescent program reduced the readthrough efficiency at later stages (**Figure 14F**). In contrast, control cells did not change readthrough efficiency during the same time in culture (**Figure S6D**). These results suggest that oncogenic stimulation decreases the efficiency of translation termination but cellular senescence counteracts this potentially oncogenic mechanism. To discard the possibility that readthrough efficiency might be decreased due to a cell-cycle arrest independent from the senescent phenotype, proliferating cells were starved for a week to induce quiescence. Starved normal cells compared to cells supplied with fetal bovine serum (FBS) showed no differences in the efficiency of readthrough. Besides, starved and FBS-supplied senescent cells showed similar readthrough values (**Figure S6E**). This observation leads us to conclude that the decrease of readthrough efficiency is senescence-specific. Immunoblotting shows the gradual reduction of phosphorylated RB as well as the absence of MCM6, and the reduction of the mitotic marker H3-pS10 in H-Ras cells, confirming the establishment of senescence. P53 accumulates in senescent cells but decreases after 20 days post-infection in H-Ras cells (**Figure 14G**).

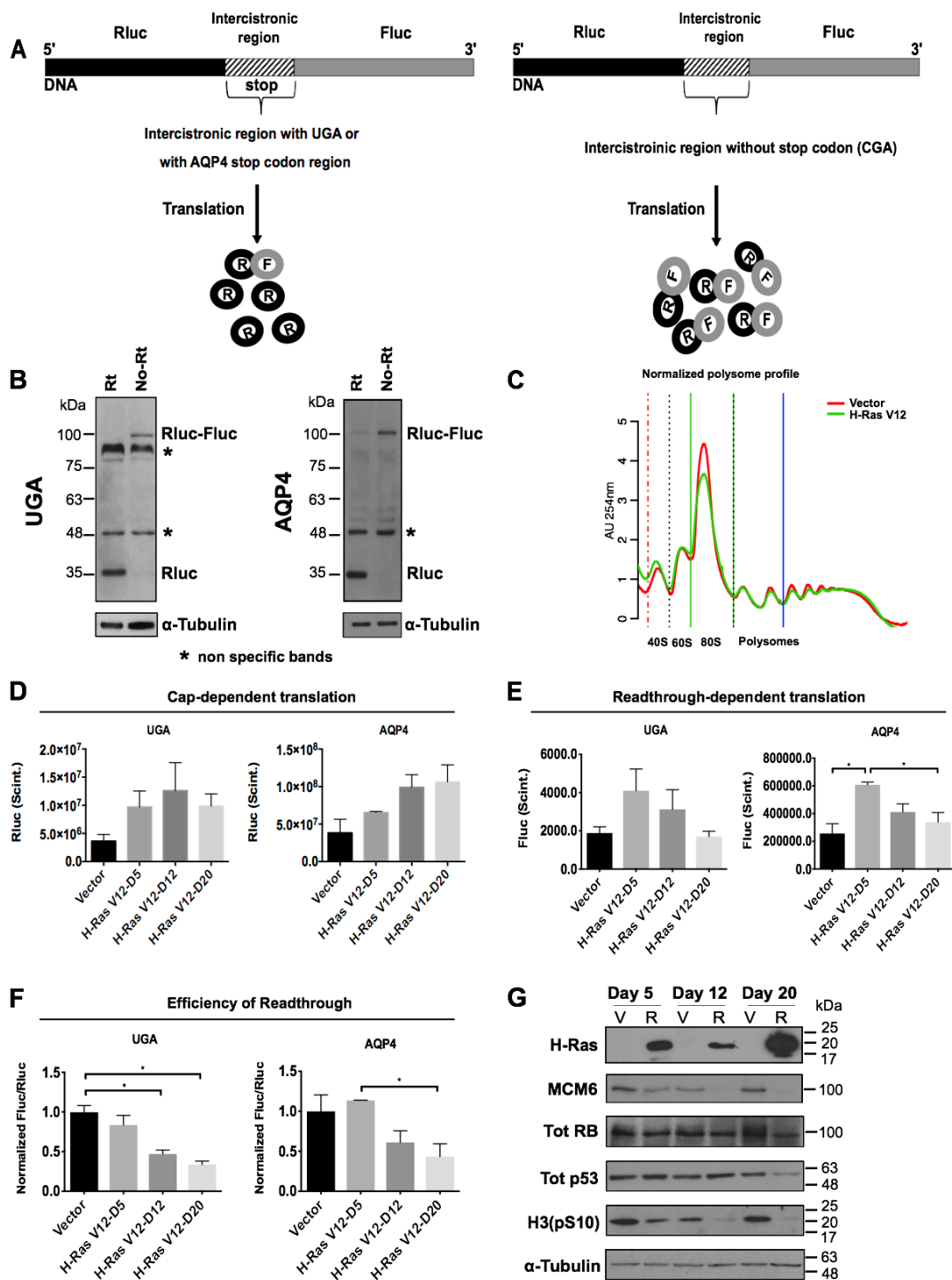


Figure 14. Readthrough is reduced in OIS

(A) Rluc (Renilla luciferase) in black is linked to Fluc (Firefly luciferase) in gray, by an intercistronic streaked region. Rluc is the internal control of the gene, while Fluc is the readthrough sensor. A UGA

codon within an artificial context or the AQP4 stop codon region is inserted in the intercistronic region (left). The expression of Fluc indicates the efficiency of readthrough. The intercistronic region from the non-readthrough control lacks the stop codon (TGA mutated by CGA) (right). **(B)** Immunoblots for Rluc in IMR-90 cells transduced with UGA and AQP4 reporters (Rt) or with the non-readthrough controls (No Rt), 12 days post-infection. Tubulin was used as a loading control. Bands at 48 and 90 kDa are non-specific. **(C)** Polysome profiles were performed 12 days post-infection with an empty vector (Vector) or H-Ras V12 oncogene (H-RasV12) showing that global translation is similar in senescent and non-senescent IMR-90 cells. **(D)** Rluc plots indicate cap-dependent translation in IMR-90 cells with an empty vector (Vector) or in senescent cells induced with the oncogene H-Ras V12 (H-RasV12) at day 5 (D5), 12 (D12) or 20 (D20). Error bars indicate SD of three independent experiments. **(E)** Fluc plots indicate the decrease of readthrough dependent-translation following induction of senescence with the oncogene H-Ras V12 (H-RasV12) at day 5 (D5), 12 (D12) or 20 (D20). Error bars indicate SD of three independent experiments. **(F)** Normalized Fluc/Rluc ratios indicate that readthrough efficiency decreases progressively in senescence. IMR-90 cells were transduced with an empty vector (Vector) or H-RasV12 oncogene (H-RasV12) to establish senescence and with UGA/AQP4 dual luciferase reporter plasmids. Luciferase activities were measured at days 5, 12 and 20 post-infection. Normalizations are presented as means relative to empty vector-infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment. One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD (Honestly Significant Difference) tests were performed. Error bars indicate SD of three independent experiments. Tukey HSD p-values indicate that * = $p < 0.05$, is significantly different. **(G)** Immunoblots of H-Ras, total RB (Tot RB), Total p53 (Tot p53), MCM6, H3(pS10) [phosphorylated H3 on serine 10] and tubulin at day 5, 12 and 20 post-infection with an empty vector (V) or H-RasV12 oncogene. Blots are representative of 3 independent experiments with similar results.

The aminoglycoside gentamicin disrupts prokaryotic protein synthesis by binding to 16S ribosomal RNA, but also affects eukaryotic ribosome proofreading, inducing a conformational change in the ribosome-mRNA complex stimulating the efficiency of readthrough (227). We sought to investigate whether OIS can decrease readthrough stimulated by gentamicin. We added 900 $\mu\text{g/ml}$ of gentamicin sulfate to OIS cells 24 hours before luciferase assays and found that the readthrough efficiency was still reduced in senescent cells both at UGA stop codons and the natural readthrough sequence of AQP4 (**Figure 15A**). Strikingly, readthrough levels were the same in senescent and proliferating cells with the reporter containing the programmed readthrough region from Moloney Murine Leukemia Virus (MMuLV) (**Figure 15A**). This

region contains a UAG stop codon followed by a pseudo-knot structure (152) and it allows up to 10% of ribosomes to suppress translation termination in order to synthesize the Gag-Pol polyprotein in cells infected with the virus (228). Also, the aminoglycoside gentamicin did not affect MMuLV readthrough efficiency. The non-readthrough controls were unaffected by gentamicin stimulation (**Figure S7A**). Of note the actual readthrough efficiency was calculated by the ratio of Fluc expressed from the readthrough reporters over the Fluc expressed by the non-stop control. For the UGA reporter the readthrough efficiency was very small (0.1%) but increased more than 50 fold for the AQP4 reporter (6.9%). In both cases, the levels of readthrough was reduced by about a factor of 2 in senescent cells and we obtained similar results after gentamicin treatment (**Figure S7B and C**). We then treated cells 72-hours before cells lysis with 600 $\mu\text{g/ml}$ of gentamicin and 25 μM of CDX5-1, a novel small molecule that potentiates readthrough efficiency when combined with aminoglycosides although by itself has no effect (229). We observed that while single gentamicin treatment increased UGA readthrough efficiency up to 6.6-fold in control cells, the combination increased it up to 16.5-fold. Surprisingly, the readthrough efficiency was still limited in senescent cells after the combination, which improved the efficiency only 1.7-fold over gentamicin treatment alone (**Figure S7D**).

To investigate more broadly whether senescence affects endogenous readthrough signals, we made luciferase reporters using the stop codon context of several mRNAs, which we predicted *in silico* as candidates for readthrough (see Material and Methods). We tested both their basal and gentamicin-stimulated readthrough efficiency. We found that the readthrough of VASP and HPN were significantly reduced during OIS while those of FBL showed a tendency to be reduced (**Figure S7E**). ASPH readthrough was undetectable neither in proliferating nor in senescent fibroblasts. Nevertheless, after gentamicin stimulation, we could observe the readthrough decrease in senescent cells (**Figure S7F**).

Translation termination is improved in PML-induced senescence

The tumor suppressor PML controls p53 and RB which are central for the establishment of OIS response (30). Also, PML plays a role in antiviral responses (230,231) and, since many

viruses use readthrough, we wanted to investigate whether PML modulates this process. Normal human fibroblasts IMR-90 cells were retrovirally transduced with a vector that allows a conditionally inactive PML (pBabe-PML-IV-Estrogen Receptor) to be expressed as well as with UGA, MMuLV and AQP4 luciferase reporters, in order to analyze the readthrough efficiency in this model. Transduced cells were stimulated with 100 nM of the estrogen antagonist 4-OH-Tamoxifen, to induce PML-IV nuclear translocation and senescence (213). We found that induction of PML dramatically reduced basal or gentamicin-induced readthrough at UGA stop codons (**Figure 15B**). Intriguingly, the effect of PML on gentamicin-induced readthrough was much more important than the effect of OIS, suggesting that PML could be one important regulator of readthrough efficiency. Readthrough levels were also reduced after PML induction with 4-OH-Tamoxifen, with or without gentamicin, in AQP4 and MMuLV transduced cells (**Figure 15 C-D**). The decrease of readthrough efficiency in MMuLV reporter further suggest an antiviral role of PML-IV.

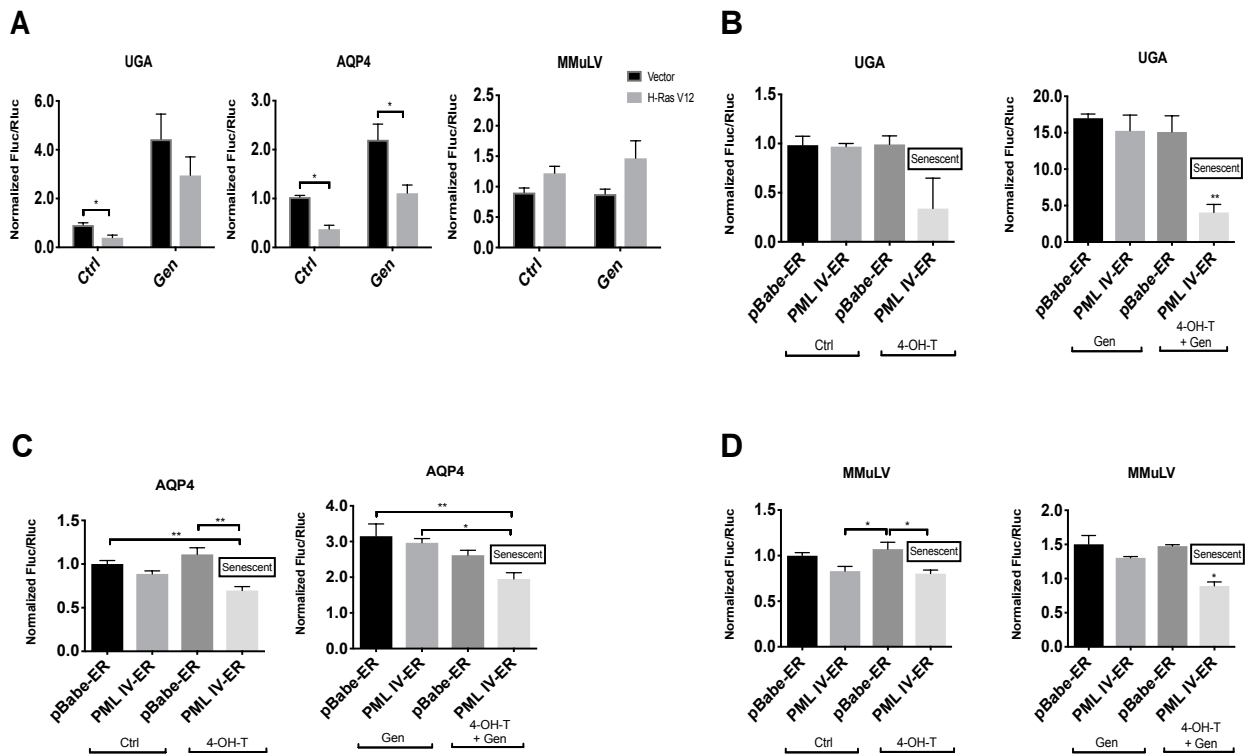


Figure 15. Gentamicin-dependent translation errors are reduced in OIS and PML-induced senescence

(A) IMR-90 cells were transduced with an empty vector (Vector) or H-RasV12 oncogene (H-RasV12) to induce OIS and with luciferase reporters. A UGA within an artificial context, a stop codon within the natural context from AQP4 or from MMuLV gag-pol protein were inserted in the intercistronic region

of the reporter. Cells were treated with vehicle (Ctrl) or 900 µg/ml of gentamicin sulfate (Gen) for 24 hours before measuring luciferase activities at day 12 post-infection. Unpaired Student's *t*-test with equal SD were performed. Error bars indicate SD of biological triplicates. * = $p < 0.05$ is significantly different, using two-tailed Student's *t*-test. **(B-D)** IMR-90 cells were transduced with pBabe-ER empty vector (pBabe-ER) or pBabe-PML-IV-ER (PML IV-ER), and with luciferase reporters UGA, AQP4 or MMuLV. Cells were treated with vehicle (Ctrl) or 100 nM 4-OH-Tamoxifen (4-OHT), inducing or not PML-IV translocation to the nucleus to induce senescence. Moreover, cells were treated with vehicle or 900 µg/ml of gentamicin sulfate (Gen) for 24 hours before measuring luciferase activities at day 12 post PML-IV induction. Normalized Fluc/Rluc ratios indicate the efficiency of readthrough. Normalizations are presented as means relative to empty vector-infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment, except for **(C, D)**, which are representative of 2 independent experiments with similar results. **B-D**: One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD were performed. Error bars indicate SD of biological triplicates **(B)** or technical triplicates **(C, D)**. Tukey HSD *p*-values indicate that * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ are significantly different.

Circumventing senescence decreases the fidelity of translation termination

Although senescence in response to oncogenes includes a very stable cell cycle arrest, some cells escape from the process and progress towards malignant transformation. Cells that circumvent OIS display a gene expression profile typical of malignant cells and chromosomal aberrations (232). We sought to determine whether these cells lost the tight control over readthrough. We obtained cell populations that bypassed OIS from long-term (35 days) cultures of IMR-90 cells expressing oncogenic *ras*. Cells that escaped senescence revert their morphology to that of normal growing cells (not shown) and express lower levels of oncogenic *ras* (**Figure 16A**), indicating a mechanism that allow them to prevent pro-senescence *ras*/ERK signaling. In fact, we showed previously that decreasing ERK signaling accelerates senescence bypass in H-Ras-expressing cells (53,232). Cells that bypassed senescence also had lower levels of the CDK inhibitor p16INK4a and higher levels of the proliferation marker Ki-67 (**Figure 16A**). We next measured readthrough efficiency in these cells using the UGA stop codon or the natural signals for AQP4 (154), VASP and HPN. The last two signals were found using bioinformatic analysis as described in Materials and Methods. In all cases, the cells that

bypassed senescence displayed an increased readthrough level even higher than control non-senescent cells (**Figure 16B**). Actually, the cells that bypassed senescence had readthrough ratios similar to gentamicin-treated cells (excluding UGA reporter).

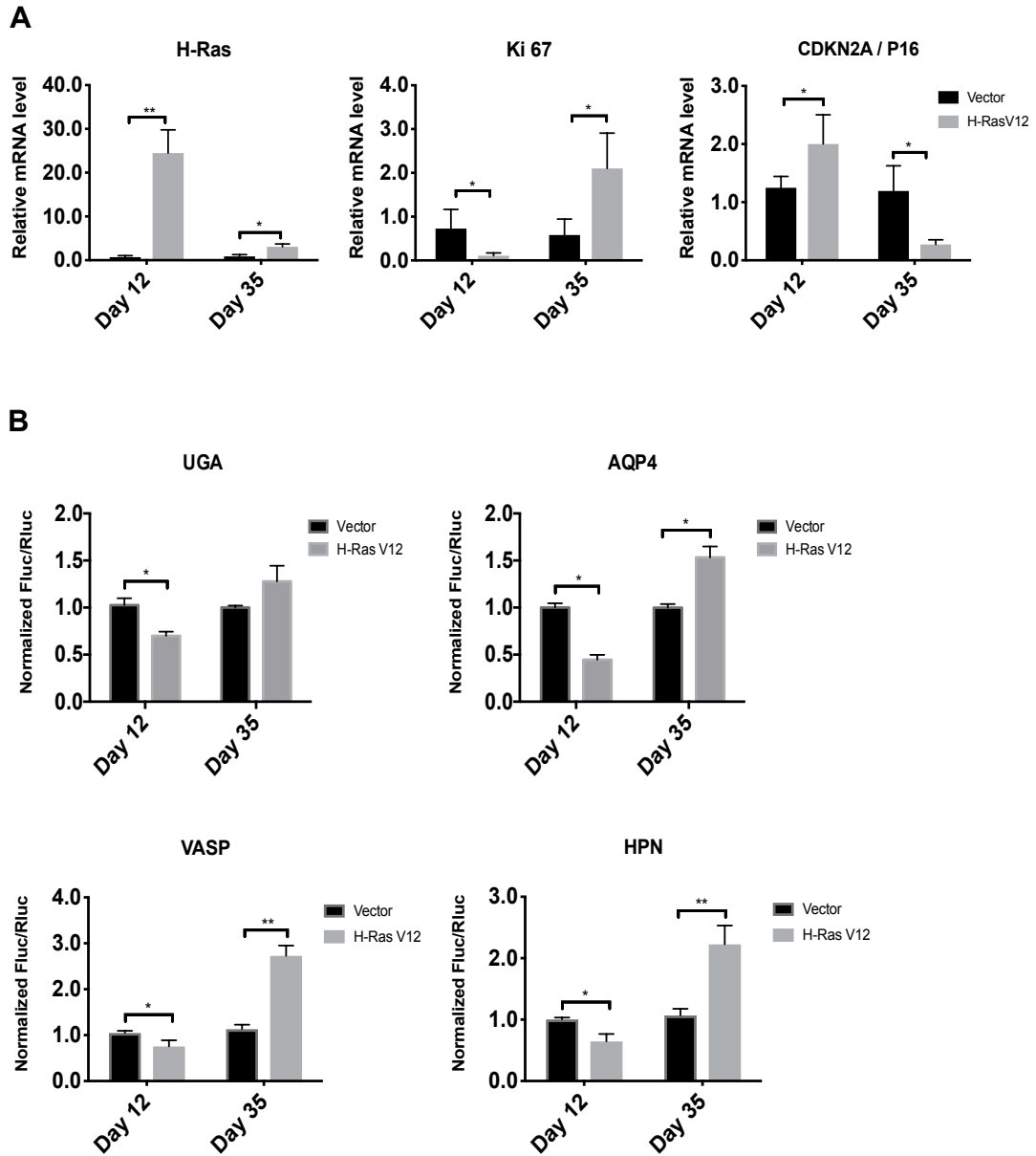


Figure 16. Bypassed-OIS shows increased readthrough

(A) RT-qPCR for senescent marker mRNAs were performed in IMR-90 cells at day 12 and 35 post-infection with an empty vector (Vector) or H-RasV12 oncogene (H-RasV12). Data are normalized over TBP and HMBS, and presented as means relative to vector infected cells. Error bars indicate SD of biological triplicates. * = $p < 0.05$, using two-tailed Student's *t*-test. (B) Luciferase activities in non-

senescent and senescent cells measured at day 12 and 35 post-infection in cells having the indicated reporters. Normalizations are presented as means relative to vector-infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment, except for UGA reporter, which are representative of 2 independent experiments with similar results. Error bars indicate SD of biological triplicates (AQP4, HPN, VASP) or technical triplicates (UGA). * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ are significantly different, using two-tailed Student's *t*-test.

E7 Oncoprotein increases readthrough

Since low translation fidelity and increased readthrough are associated to malignant transformation (233) and the escape from senescence, we next investigated which tumor suppressor pathways activated in senescent cells modulate readthrough. To investigate whether p53 and/or RB pathways are implicated in translation termination efficiency, we used E6 (inhibits p53) and E7 (inhibits RB) oncoproteins from HPV-16. Transduction of E6 did not affect the readthrough levels in senescent cells. However, senescent cells infected with E7 oncoprotein, as well as with both E6 and E7, showed a significant increase in readthrough efficiency at UGA stop codons and the natural readthrough signals from AQP4 and VASP (**Figure 17A-C**). These results indicate that E7 targets (likely the pocket proteins family including RB, p107 and p130) mediate the readthrough decrease in senescent cells. We also knocked-down RB mRNAs' expression with shRNAs in H-Ras cells and we failed to see the increase of readthrough levels we observed in E7 expressing cells, suggesting that RB in coordination with p107 and p130 must influence the reduction in readthrough efficiency (data not shown).

To further implicate the RB pathway in the control of readthrough in senescent cells, we used an in-frame deletion mutant of E7 whose interactions with RB, P107 and p130 are disrupted (E7 Δ 21-24) (234). As expected, H-Ras cells transduced with wild type E7 showed a two-fold increase in readthrough levels compared to senescent cells but the mutant E7 Δ 21-24 failed to do so (**Figure 17D**). Besides, the proliferating cells transduced with E7 presented a tendency to increase readthrough, while the readthrough levels were not affected in proliferating cells transduced with the mutant E7 Δ 21-24 (**Figure S8A**). RT-qPCRs were carried out to evaluate the expression increase of E2Fs targets in E7 transduced cells, as well as their decrease in E7 Δ 21-24 mutant (**Figure S8B**). Next, we used a retroviral vector for CDK4 overexpression to

block pocket proteins activity in senescent cells (21) and, as expected, we observed an increase in readthrough efficiency (**Figure 17E**). Relative cell growth and RT-qPCRs show that CDK4 overexpression does not affect proliferation arrest markers at day 12 post-infection in senescent IMR-90s (**Figure S8C-D**). Taken together, these results indicate that the observed reduction in readthrough is not a simple consequence of the growth arrest of senescent cells and strongly suggest that the activation of the RB tumor suppressor pathway increases the fidelity of translation termination during OIS.

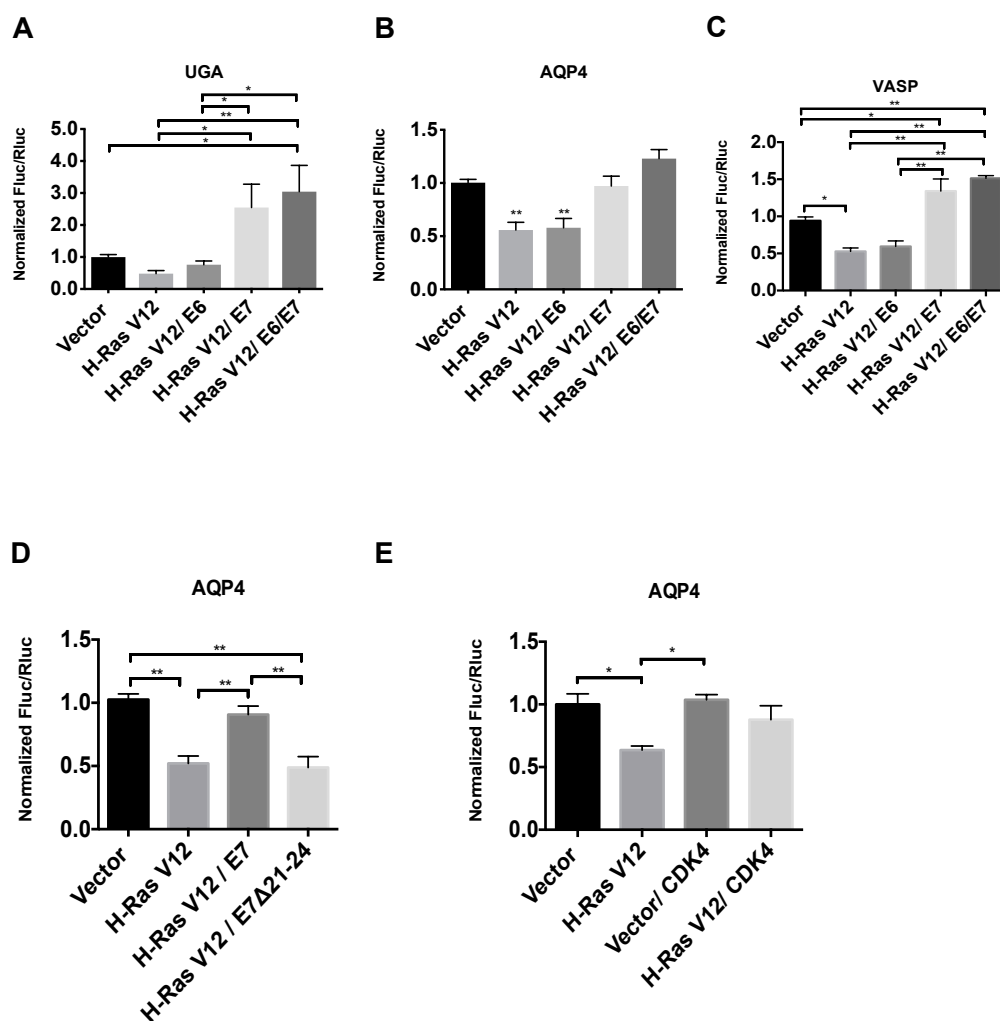


Figure 17. RB pathway disruption affects the efficiency of readthrough

Normalized Fluc/Rluc ratios to indicate the efficiency of readthrough. A UGA within an artificial context, a stop codon within natural contexts from AQP4 or VASP were inserted in the intercistronic region of Rluc-Fluc luciferase reporter. (**A-C**) IMR-90 cells containing HTERT were transduced with an empty vector (Vector) or H-RasV12, an empty control vector (pLXSN), E6, E7 or E6/E7 oncogenes and

luciferase reporters to study the readthrough efficiency in proliferating vs senescent vs transformed-like cells. **(D)** IMR-90 cells were transduced with an empty vector (Vector) or H-RasV12, an empty control vector (pLXSN), wild-type E7 or E7 Δ 21-24 mutant oncogene. **(E)** IMR-90 cells were transduced with an empty vector or H-RasV12 or CDK4 and luciferase reporters to study the readthrough efficiency variations in proliferating vs senescent vs. cells overexpressing CDK4. **(A-E)** Luciferase activities were measured in non-senescent and senescent cells at day 12 post-infection. Normalizations are presented as means relative to vector-infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment. One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD were performed. Error bars indicate SD of biological triplicates. Tukey HSD p-values indicate that * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ are significantly different.

The CDK4/6 inhibitor palbociclib contributes to readthrough reduction

Palbociclib blocks the cyclin-dependent kinase (CDK) 4/6 activity by competing with ATP binding and, as a result, RB remains in its hypo-phosphorylated active form (235). Treatment of proliferating fibroblasts with palbociclib reduced readthrough of the AQP4 reporter and gentamicin-stimulated readthrough at the UGA stop codon (**Figure 18A-B**). Interestingly, palbociclib reduces readthrough in cells that spontaneously escaped from senescence (**Figure 18C**). As expected, palbociclib also inhibits cell proliferation and strongly activates RB pathway in proliferating and H-Ras-escaped IMR-90s (**Figure 18D, S9**) restoring their senescent phenotype (**Figure 18E**).

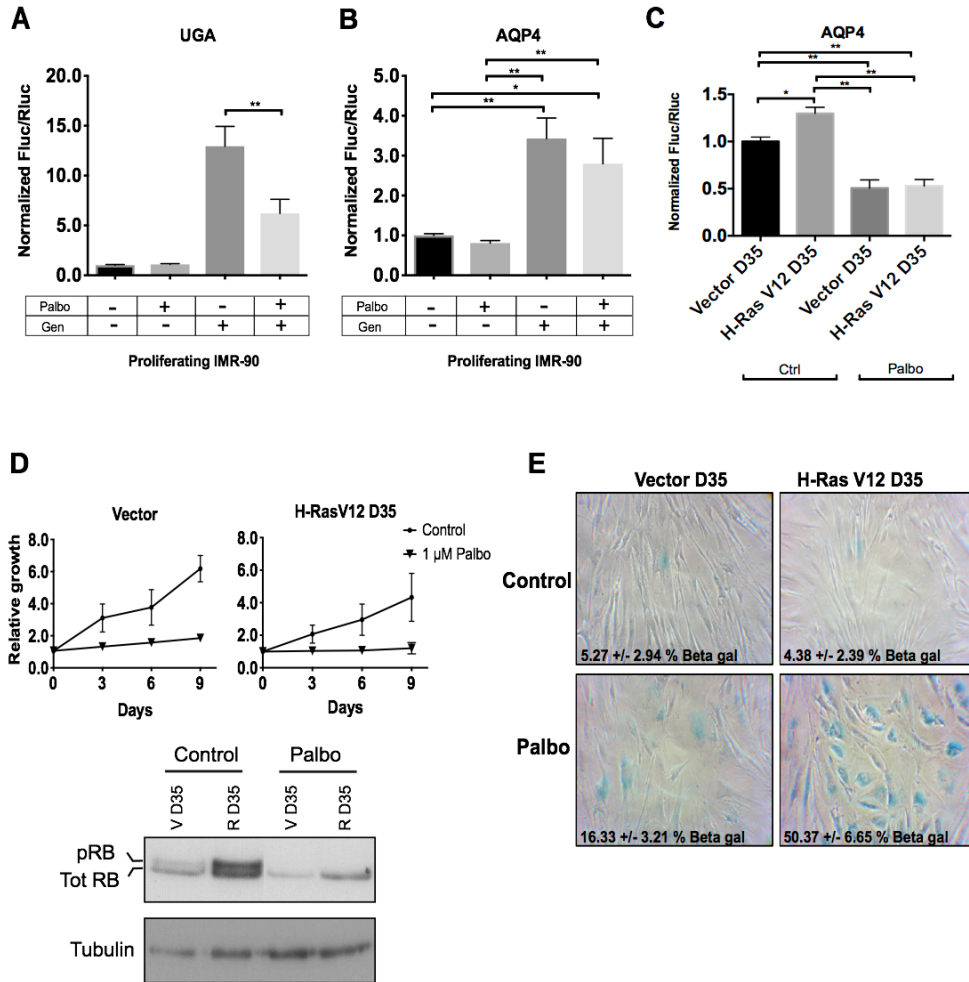


Figure 18. Palbociclib, a CDK4/6 inhibitor, contributes to readthrough reduction

(A-B) Normalized Fluc/Rluc ratios of IMR-90 cells transduced with luciferase reporters (UGA, AQP4) and treated with vehicle and/or 1 μ M of palbociclib (Palbo) and/or 900 μ g/ml of gentamicin sulfate (Gen) for 5 days before measuring. Error bars indicate SD of three independent experiments. (C) Normalized Fluc/Rluc ratios of IMR-90 fibroblasts transduced with an empty vector (Vector) or H-RasV12 oncogene (H-RasV12) to induce OIS and with AQP4 luciferase reporter. Cells were treated with vehicle (Ctrl) or 1 μ M of palbociclib (Palbo) for 5 days before measuring luciferase activities at day 35 post-infection. Normalizations are presented as means relative to vector-infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment. One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD. Error bars indicate SD of biological triplicates. Tukey HSD p-values indicate that * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ are significantly different. (D) (Top) Growth curves of proliferating and *ras* bypassed IMR-90 cells treated with vehicle (Control) or 1 μ M of palbociclib (Palbo) for 5 days are shown. Data are presented as means normalized to day 0 of each condition and error bars indicate SD of three independent

experiments, n = 3. (Bottom) Immunoblots for indicated proteins: total RB (Tot RB) and tubulin from non-senescent (V D35) and *ras* by-passed cells (R D35) following treatments with vehicle (Ctrl) or 1 μ M of palbociclib (Palbo) for 5 days. Blots are representative of 3 independent experiments with similar results. (E) SA- β -gal of proliferating (Vector D35) IMR-90 cells and IMR-90s that have by-passed the senescent stage (H-RasV12 D35) treated for 5 days with vehicle (Ctrl) or 1 μ M of palbociclib (Palbo) and fixed at day 35 (D35) post-infection. Data were quantified from many fields within one experiment to represent the entire petri dish. Three independent cell counts up to a total of at least 100 cells are presented as the mean and SD of positive cells.

Ribosomal proteins RPS14/uS11 and RPL22/eL22 limit readthrough

We recently demonstrated that extra-ribosomal functions of RPS14/uS11 and RPL22/eL22 were linked to the regulation of the cell cycle and senescence. We found that these two proteins interact with the CDK4-Cyclin D1 complex inhibiting its activity and consequently activating the RB pathway (80,189,223). These results suggest that RPS14/uS11 and RPL22/eL22 could, as palbociclib, affect readthrough via the RB pathway. We transduced IMR-90 cells with Myc tagged RPL22/eL22 or RPS14/uS11 as well as with the AQP4 readthrough reporter and measured readthrough efficiency at day 7, 12 and 14 after transduction. The expression of RPL22/eL22 or RPS14/uS11 was confirmed by immunoblots for the Myc tag. We also measured biomarkers of senescence such as RB, the E2F target MCM6 and the mitosis marker phospho H3 (**Figure 19A**). Cells bearing RPS14/uS11 showed a 15% decrease of readthrough at days 7 and 12 after transduction, and 30% decrease of readthrough 14 days after transduction compared to control cells (**Figure 19B**). In contrast, RPL22/eL22-transduced cells showed a peak of readthrough reduction at day 7 post-infection, and a progressive recovery 12- and 14-days post-infection (**Figure 19C**). We already reported that RPS14/uS11 is more efficient than RPL22/eL22 for inhibition of CDK4 and induction of senescence (223), explaining this difference. These results suggest that RPS14/uS11 haploinsufficiency in the 5q-syndrome (236) and frequent RPL22/eL22 hemizygous gene deletions found in cancer (237) could play a role in proteome diversity and tumorigenesis.

In conclusion, our results suggest that the RB pathway is implicated in translation termination accuracy, since RB inactivation mediated by E7, or CDK4 overexpression, increases

readthrough efficiency. On the other hand, RB activation after palbociclib treatment, PML-IV inducible expression as well as RPS14/uS11 and RPL22/eL22 overexpression improves translation termination (**Figure 19D**).

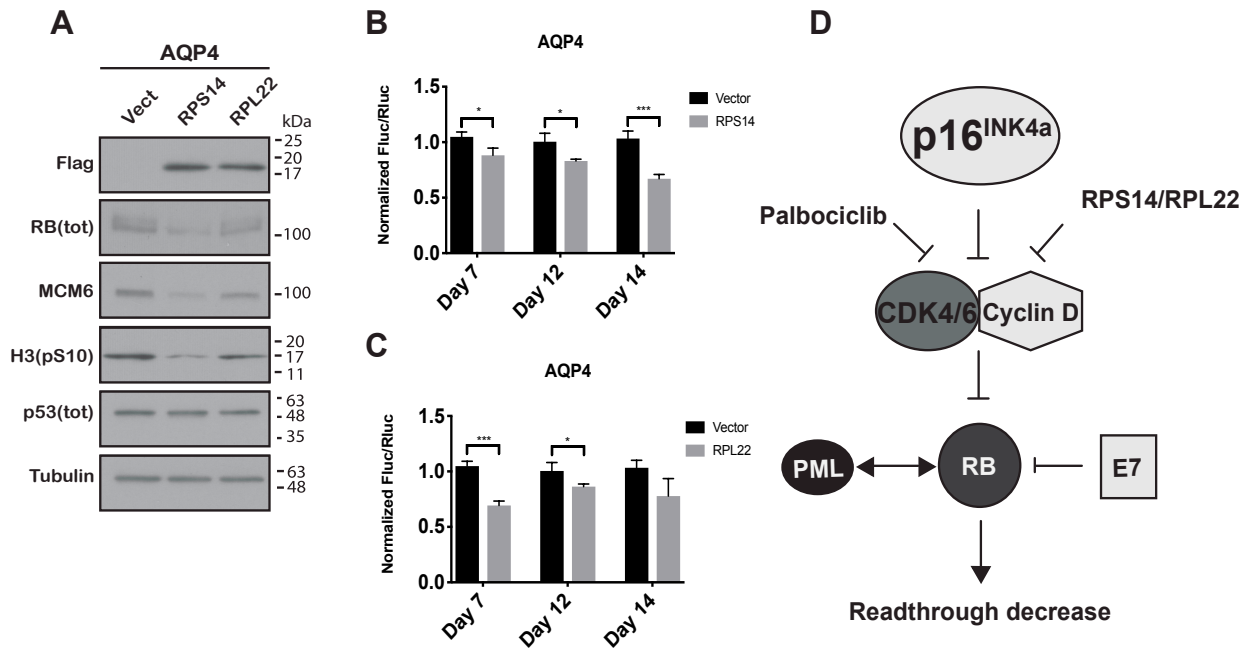


Figure 19. Ribosomal proteins RPS14/uS11 and RPL22/eL22 limit readthrough

(A) Immunoblots for indicated proteins at day 7 post-infection with an empty vector (Vect), or pBABE-RPS14(WT)-Myc, or pBABE-RPL22(WT)-Myc: Myc (Myc-tag), total RB (RB tot), MCM6, H3(pS10) [phosphorylated H3 on serine 10], total p53(p53 tot) and tubulin. Blots are representative of 3 independent experiments with similar results. (B-C) Normalized Fluc/Rluc ratios of IMR-90 cells transduced with an empty vector (Vector), or (B) pBABE-RPS14(WT)-Myc, or (C) pBABE-RPL22(WT)-Myc, and with luciferase reporter AQP4. Luciferase activities were measured in Vector and RPs-transduced cells at day 7, 12 and 14 post-infection. Normalizations are presented as means relative to vector-infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment. Unpaired t tests with equal SD were performed. Error bars indicate SD of biological triplicates. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ are significantly different, using two-tailed Student's *t*-test. (D) Schema showing the RB activation/inhibition factors that modulate readthrough.

3.3.5. Discussion

We show here that the RB tumor suppressor pathway reduces translational readthrough at UGA stop codons from dual luciferase reporters in the context of cellular senescence, a tumor suppressor response. In addition, the RB pathway also reduces readthrough in reporters containing the readthrough context of mRNAs coding for AQP4, VASP, FBL, ASPH and HPN. We propose a novel caretaker tumor suppressor activity for the RB pathway preventing the generation of C-terminally extended proteins by readthrough, a process that can potentially confer new localization signals, post-translational modifications or interaction partners to many proteins (149,238). The potential for readthrough to confer advantages to cells in stress was previously reported in yeast cells expressing the prion PSI⁺ that enhances both readthrough and resistance to several stresses (219). Our results suggest that cellular senescence and, in particular, the RB pathway prevents the oncogenic potential of proteome reprogramming via translational readthrough.

Senescence reduces translational readthrough in dual luciferase reporters by a factor of two, or four (for AQP4 reporter). This is around the same level of regulation reported by miRNAs. miRNAs regulate multiple genes to affect a particular phenotype (239) and by analogy, we propose that the effects of readthrough depend also on multiple genes. Studies with ribosome profiling in *Drosophila* and human fibroblasts reveal that more than 300 mRNAs undergo translational readthrough (155), suggesting that many new functions could be generated by this mechanism.

Senescence also reduced the stimulatory effect of aminoglycosides and the enhancer effect of CDX5-1 on translational readthrough (227). It has been reported that CDX5-1 potentiates G418-induced readthrough up to 180-fold compared to the aminoglycoside G418 alone (229). Here we showed a clear resistance of senescent cells to induce C-terminal extended proteins. Green and Goff reported that aminoglycosides can increase readthrough efficiency of the MMuLV gag-pol junction in HEK-293 cells (240). However, using normal fibroblasts, we found that the same drugs did not have such effect. HEK-293 cells have an inactivation of the RB and PML tumor suppressor pathways due to expression of adenovirus E1A oncoprotein. In our normal cells, disruption of these pathways increases readthrough. It is thus plausible that in the context of an altered control in HEK293 cells, the MMuLV gag-pol junction readthrough is stimulated by aminoglycosides. In addition, Green and Goff used several aminoglycosides in their studies, gentamicin being the less active and its effects were reported as dose-independent and not

consistent. Since gentamicin does increase readthrough in other stop codon contexts, we suggest that the pseudoknot structure of the viral signal may interfere with the binding or the action of gentamicin on the ribosome.

Our results indicate that translation termination tends to be inaccurate in cancer-like cells where the RB pathway is dysfunctional but is particularly efficient in senescent cells. Early work by Stanners and colleagues showed that SV40-mediated transformation increased mistranslation in mammalian cells (241). SV40 codes for the large T antigen that binds and inactivates the RB family of tumor suppressors (242) like the E7 oncoprotein we used in this study. Diaz and colleagues found that translational fidelity is decreased in the most aggressive breast cancer cell lines (61). They also reported that the p53 tumor suppressor pathway controls translational fidelity and in particular the translation of oncogenic proteins from IRES (233). In our experimental system, the RB pathway was more important to control readthrough levels in OIS. However, we did notice that inactivation of p53 in cells where RB is also inactivated further increased readthrough levels, suggesting also an important role for p53 in controlling readthrough levels (**Figure 17A-C**). The RB tumor suppressor pathway may repress genes that modulate readthrough. First, the translation initiation factor eIF3 interacts with post-initiation ribosomes and controls readthrough (243,244). RB could repress the expression of eIF3 subunits or sequester them in PML bodies (30). Consistent with the latter mechanism the eIF3 subunits EIF3K and EIF3E (Int-6) localize to PML bodies (245,246). Viral proteins such as HTLV-I Tax can delocalize EIF3E from PML bodies (247), an event that could facilitate readthrough. Second, RB could repress the expression of suppressor tRNAs required to read termination codons. Recently, it was reported that senescent cells repress the expression of some tRNAs including the tRNA-Tyr (248), one of the tRNAs that can read stop codons. Intriguingly, cells that escaped from senescence upregulated these tRNAs (248), a phenomenon that could explain the remarkable increase in stop codon readthrough we found after escape from senescence.

Of special interest for a plausible pharmacological modulation of readthrough levels, we found that the CDK4 inhibitor palbociclib was able to reduce readthrough and re-induce the stable cell cycle arrest in cells that bypassed senescence. If the phenotypic plasticity conferred by C-terminal extended proteins plays a causal role in the origin of human cancers, palbociclib could

be used as a chemopreventive agent in patients with premalignant lesions susceptible to progress into malignant tumors.

3.3.6. Acknowledgements

This study is supported by a NSERC grant to L B-G. N.D.T. acknowledges a studentship support from the GRUM (Université de Montréal), F.L. acknowledges support from the FRSQ and CRS (Cancer Research Society), S.T. acknowledges a summer NSERC studentship, G.F. is the recipient of a CIBC chair for breast cancer research at the CR-CHUM. We are grateful to I. Topisirovic, K. Tandook, and M. Leibovitch at the Lady Davis Institute, Department of Oncology, McGill University, for their help and advices in polysome fractionation assays, M. Roberge at the University of British Columbia for CDX5-1 and X. Roucoux, J-F. Lucier and F-M. Boisvert at the Université de Sherbrooke, Département de Biochimie, for their help in the identification of readthrough events by bioinformatic analysis.

3.2.7. Supplementary material

3.2.7.1. Supplementary data

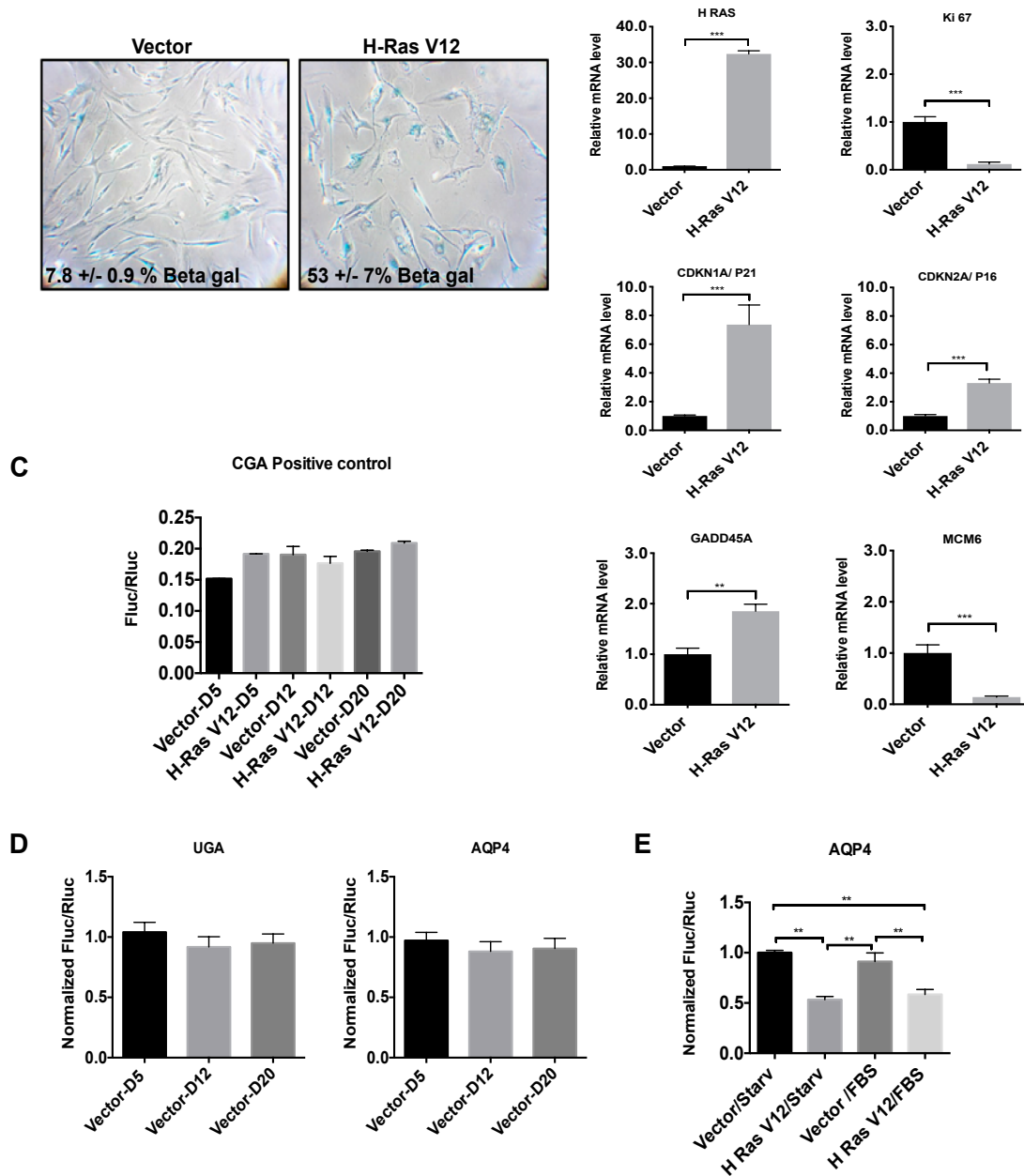


Figure S6. Readthrough is reduced in OIS

(A) SA-β-gal of proliferating (Vector) and senescent IMR90 (H-RasV12 oncogene) cells, fixed at day 12 post-infection. Data were quantified from many fields within one experiment to represent the entire petri dish. Three independent cell counts up to a total of at least 100 cells are presented as the mean and SD of positive cells. (B) RT-qPCRs for senescent marker mRNAs were performed in IMR-90 cells at

day 12 post-infection for cells as in (A). Data are normalized over TBP and HMBS, and presented as means relative to vector infected cells. Error bars indicate SD of technical triplicates. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ are significantly different, using two-tailed Student's *t*-test. (C) Luciferase activities from non-readthrough control (CGA-Positive control) in proliferating (Vector) and H-RasV12 senescent cells measured at days 5 (D5), 12 (D12) and 20 (D20) post-infection. Assays are representative of 2 independent experiments with similar results with technical triplicates for each experiment. One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD were performed. Error bars indicate SD of technical triplicates. (D) Normalized Fluc/Rluc ratios indicate that readthrough level does not change in non-senescent cells (Vector) at day 5 (D5), 12 (D12) or 20 (D20) post-infection. Error bars indicate SD of biological triplicates. (E) Luciferase activities from AQP4 reporter were measured at day 12 post-infection. Normalized Fluc/Rluc ratios from non-senescent (Vector) and senescent cells (H-RasV12), starved (Starv) or supplied with fetal bovine serum (FBS) are represented. Starvation was performed for a week to induce quiescence. Data are presented as means relative to empty vector-infected cells, which are representative of 2 independent experiments with similar results with technical triplicates for each experiment. One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD were performed. Error bars indicate SD of technical triplicates. Tukey HSD p-values indicate that * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ are significantly different.

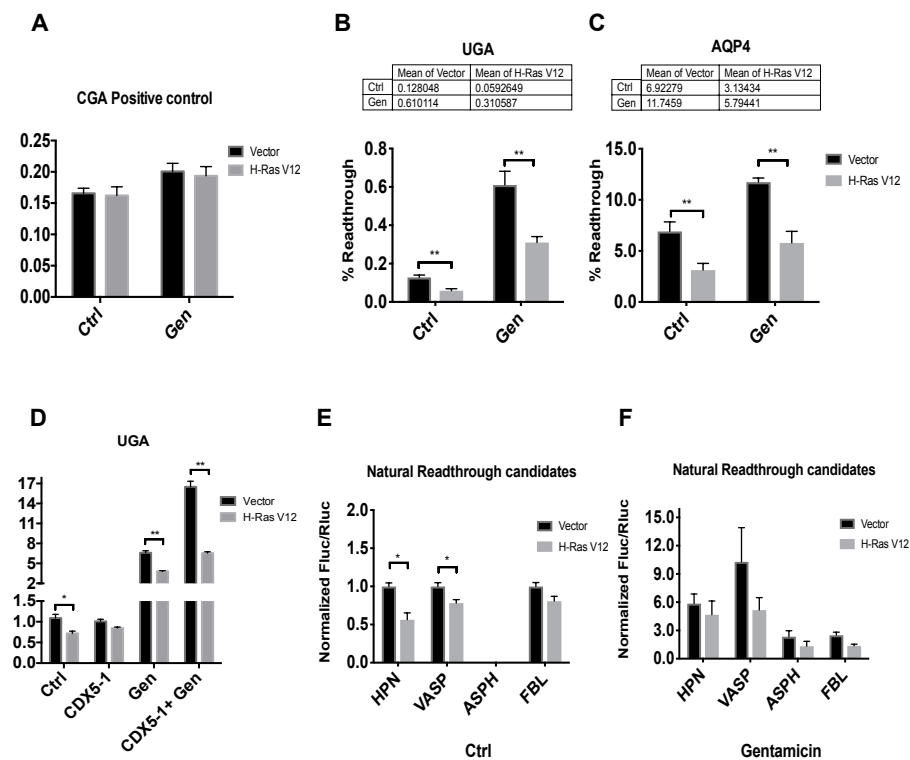


Figure S7. Senescent cells are resistant to gentamicin-induced readthrough

(A) IMR-90 cells were transduced with an empty vector (Vector) or H-RasV12 oncogene to induce OIS and with indicated non-readthrough control luciferase reporter. Cells were treated with vehicle (Ctrl) or with 900 µg/ml of gentamicin sulfate (Gen) 24 hours before measuring luciferase activities at day 12 post-infection. Error bars indicate SD of biological triplicates. (B-C) The percent of readthrough was determined by dividing Fluc/Rluc ratio from UGA or AQP4 luciferase reporters by Fluc/Rluc ratio from non-readthrough controls multiplied by 100. Error bars indicate SD of biological triplicates. ** = $p < 0.01$ is significantly different, using two-tailed Student's *t*-test. (D) IMR-90 cells were transduced with an empty vector (Vector) or H-RasV12 oncogene to induce OIS and with a UGA luciferase reporter. Cells were treated with vehicle (Ctrl) and/or 600 µg/ml of gentamicin sulfate (Gen) and/or 25 µM of CDX5-1 72 hours before measuring luciferase activities at day 12 post-infection. Error bars indicate SD of biological triplicates. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ are significantly different, using two-tailed Student's *t*-test. (E) A stop codon within natural contexts from VASP, ASPH, HPN and FBL, was inserted in the intercistronic region of Rluc-Fluc luciferase reporter. IMR-90 cells were transduced with an empty vector (Vector) or H-RasV12 oncogene to induce OIS and with luciferase reporters. Luciferase activities were measured in non-senescent and senescent cells at day 12 post-infection. Error bars indicate SD of biological triplicates. * = $p < 0.05$ is significantly different, using two-tailed Student's *t*-test. (F) Cells as in (E) were treated with 900 µg/ml of gentamicin sulfate (Gen) 24 hours before measuring luciferase activities at day 12 post-infection. Normalized Fluc/Rluc ratios indicate the efficiency of readthrough. Normalizations are presented as means relative to vector-infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment. Unpaired Student's *t*-test with equal SD were performed. Error bars indicate SD of biological triplicates.

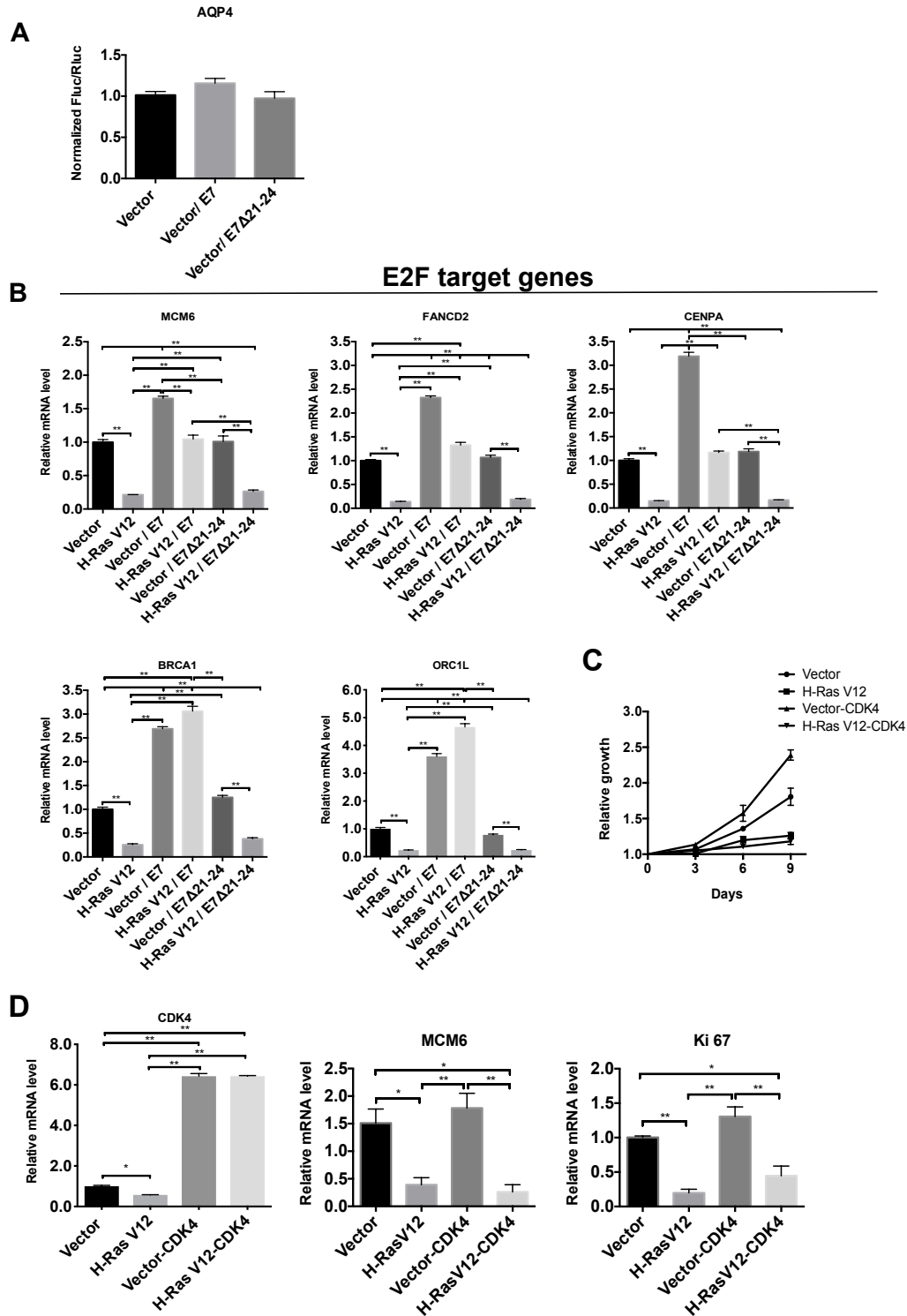


Figure S8. RB pathway disruption affects the efficiency of readthrough

(A) IMR-90 cells were transduced with luciferase reporter AQP4 and an empty vector (Vector), wild-type E7 or E7 Δ 21-24 mutant oncogene. Luciferase activities were measured at day 12 post-infection. Normalized Fluc/Rluc ratios indicate the efficiency of readthrough. Normalizations are presented as

means relative to vector-infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment. Error bars indicate SD of biological triplicates. **(B)** Representative RT-qPCR from E2Fs' target mRNAs were performed in IMR-90 cells transduced with an empty control vector (pLXSN), wild-type E7 or E7 Δ 21-24 mutant oncogene, and with an empty vector (Vector) or with H-RasV12 oncogene to induce OIS at day 12 post-infection. Data are normalized over TBP and HMBS, and presented as means relative to vector infected cells. Experiments were done three times with technical triplicates for each experiment. Error bars indicate SD of technical triplicates. Tukey HSD p-values indicate that ** = $p < 0.01$ is significantly different. **(C)** Growth curves of non-senescent (Vector) and H-RasV12 senescent IMR-90s overexpressing or not CDK4. Data are presented as means normalized to day 0 of each condition. Assays are representative of 2 independent experiments with similar results with technical triplicates for each experiment. Error bars indicate SD of technical triplicates. **(D)** RT-qPCRs for CDK4, MCM6 and Ki-67 mRNAs were performed in IMR-90 cells as in **(C)** and at day 12 post-infection. Data are normalized over TBP and HMBS, and presented as means relative to vector infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment. One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD were performed in **(A, B, D)** and Unpaired Student's *t*-test with equal SD was performed in **(C)**. Error bars indicate SD of biological triplicates. Tukey HSD p-values indicate that * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$ are significantly different.

E2F target genes

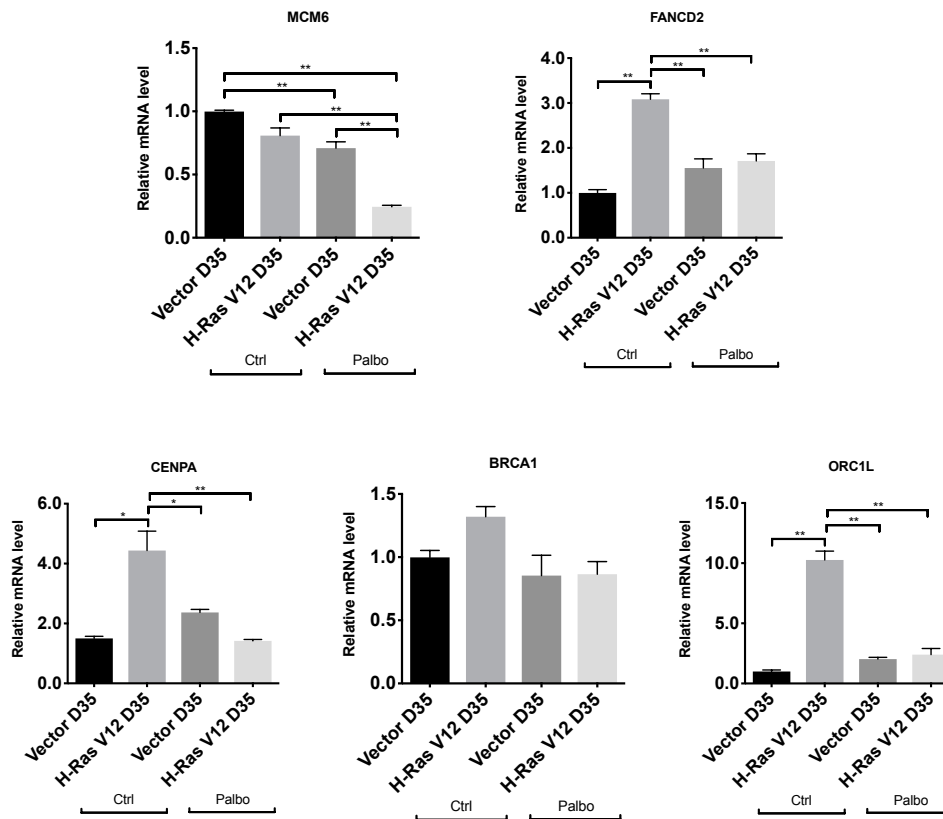


Figure S9. E2Fs target genes

RT-qPCR for E2Fs' target mRNAs were performed in IMR-90 at day 35 post-infection with an empty vector (Vector D35) or with the oncogene H-RasV12 (H-RasV12 D35) and treated with vehicle (Ctrl) or with 1 μ M of palbociclib (Palbo) for 5 days before cell lysis. Data are normalized over TBP and HMBS, and presented as means relative to vector infected cells from three independent experiments with technical triplicates for each experiment. One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD were performed. Error bars indicate SD of technical triplicates. Tukey HSD p-values indicate that * = p < 0.05, ** = p < 0.01 are significantly different.

Table S3. PCR cloning primers

Name	5' forward primer (5'-3')	3' reverse primer (5'-3')
pMSCV-RLUC-FLUC	GGAAGAAAGCGGCCGCTTCAGATCCGCTAGAGCC	TGGATGCATGAATTCGTGCATCGCTGAATAC
UGA STOP CODON	CCAAGCTTGACCAGTGACCAGCAAGGTGTACG	CGTACACCTTGCTGGTCACTGGTGAAGCTTGG

4. Discussion générale

L'objectif général de cette thèse a consisté à élucider l'implication des protéines ribosomiques dans le mécanisme de suppression tumorale de la sénescence, en plus de leur rôle dans le fonctionnement du ribosome lors de la traduction.

Les cellules sénescents ont perdu la capacité de se répliquer mais elles ont bien conservé leur faculté de traduction et de dégradation protéique. Cette faculté contribue à leur bon fonctionnement et à leur survie pour une période relativement longue, en étant une barrière contre la transformation maligne. Plus précisément, la fidélité de terminaison de la traduction dans la sénescence semble être très efficace. D'autre part, le rôle du ribosome (autant des ARNr comme des protéines ribosomiques) a été peu étudié dans la sénescence d'où l'objectif d'approfondir ce sujet. À la différence des cellules sénescents, les cellules cancéreuses profiteraient de la production de ribosomes défectueux, et donc, des erreurs de traduction, afin de développer leur capacité protéomique et d'évoluer.

Selon l'environnement, le stade du développement ou les pathologies, les ribosomes semblent avoir une composition protéique très hétérogène. Parmi cette hétérogénéité ribosomique, il peut exister soit une absence des protéines du ribosome, soit un remplacement par ses orthologues, soit des modifications post-transcriptionnelles ou post-traductionnelles (249,250). Cette hétérogénéité a un impact sur l'homéostasie cellulaire. À ceci s'ajoute l'influence des facteurs de traduction et de la grande famille des ARN (ARNm, ARNt, snoRNA, entre autres) sur la machinerie de traduction. L'accumulation d'observations suggère que l'effet régulateur de l'efficacité de traduction, par le ribosome lui-même, peut être modulée selon son hétérogénéité (250). Les résultats présentés dans cette thèse montrent les premiers indices des composants ribosomiques spécialisés dans la régulation du cycle cellulaire et dans la terminaison efficace de la traduction via la voie de RB. Suite aux purifications des ribosomes des IMR-90 exprimant les protéines modifiées RPL22-myc ou RPS14-myc (80), nous avons trouvé ces protéines dans la fraction ribosomique, suggérant que les protéines ribosomiques modifiées seraient incorporées aux ribosomes. Nous supposons que les ribosomes des cellules sénescents seraient structurellement différents des ribosomes des cellules normales. L'hétérogénéité ribosomique pourrait avoir une implication dans la traduction différentielle des messagers choisis ou dans l'efficacité de terminaison de la traduction.

4.1. RPL22/eL22, nouveau régulateur de la voie de RB

Comme expliqué antérieurement, une des caractéristiques des cellules sénescents est la perturbation de la biogenèse des ribosomes (214) et l'activation aberrante de la signalisation de mTOR (251). En conséquence, ces cellules manifestent un déséquilibre dans la synthèse de l'ARNr des sous-unités 40S et 60S, ainsi qu'une accumulation de protéines ribosomiques dans le nucléoplasme et le nucléole. Les résultats décrits au chapitre 2 ont montré que RPL22/eL22 extra-ribosomique, tout comme RPS14/uS11, également extra-ribosomique, bloque la progression du cycle cellulaire suite au stress nucléolaire. Nous avons identifié RPL22/eL22 en tant qu'inhibiteur de la phosphorylation par CDK4-Cycline D1 de RB. RB dans son état hypophosphorylé lie les facteurs de transcription de la famille d'E2F pour empêcher la progression du cycle cellulaire, induisant ainsi la sénescence (5,44,45).

RPL22/eL22 n'est ni essentielle pour la biogenèse du ribosome, ni pour la traduction cap-dépendante. De plus, lors de sa perte dans certains tissus, sa fonction ribosomique est compensée par son paralogue RPL22-like 1 (98). Cependant, le rôle physiologique de RPL22/eL22 intervient sur des voies peu connues jusqu'à maintenant. RPL22/eL22 se lie non seulement à l'ARNr 28S, mais aussi à l'ARN de la télomérase (252) et à l'ARNm de RPL22-like 1 (99). Parmi ces implications physiologiques, nous avons fait allusion à la suppression directe de RPL22-like 1, qui a des effets antagonistes, voire pro-cancéreux, par rapport à RPL22/eL22 (98). Il a été reporté que RPL22/eL22 s'associe également avec CK2 α (*Casein kinase 2 α*) pour inhiber la phosphorylation de ces substrats dans le cancer de poumon (83). Chez *Drosophila*, RPL22/eL22 interagit avec Ago2, le composant protéique de la machinerie de répression traductionnelle via les micro-ARN (253). Cette accumulation d'évidences souligne le potentiel régulateur de RPL22/eL22. Nos résultats suggèrent un nouveau mécanisme extra-ribosomique qui met en évidence le rôle de suppresseur de tumeur de RPL22/eL22. Étonnamment, ce mécanisme semble indépendant de l'activation de p53, généralement stimulé en réponse au stress nucléolaire (254-257).

4.1.1. Rôle nucléolaire de RPL22/eL22

Dans nos résultats, 12 jours post-infection nous avons observé un phénotype sénescence plus faible, comparé à la sénescence établie suite à la surexpression de RPS14/uS11. Cet effet est dû potentiellement à l'accumulation nucléolaire prédominante de RPL22/eL22, qui empêche son interaction avec le complexe de CDK4-Cycline D1 dans le noyau. Il se pourrait que son rôle optimal s'exerce durant les premières étapes après son induction (jour 7 post-infection, par exemple), et serait plus atténué vers les étapes tardives, ce qui amène au contournement de la sénescence. À la différence de la sénescence induite par RPL22/eL22, celle établie par la surexpression de RPS14/uS11 est plus stable. Cela est potentiellement dû à son accumulation dans le nucléoplasme et à sa faculté d'interagir avec le complexe de CDK4-Cycline D1.

Le rôle nucléolaire de RPL22/eL22 lors de l'établissement de la sénescence, mis à part son interaction avec la sous-unité 60S, reste à être éclairci. Le facteur nucléolaire UBF (*Upstream binding transcription factor*) se lie au promoteur de l'ADNr pour activer la transcription des ARNr par l'ARN Pol I. Il a été observé que cette protéine est hypophosphorylée (inactive) dans les cellules quiescentes afin d'empêcher la transcription de l'ARNr et la progression du cycle cellulaire (258). Suite à la phosphorylation par le complexe CDK4-Cycline D1 sur Ser⁴⁸⁴ d'UBF, son activité transcriptionnelle est stimulée et la progression du cycle cellulaire continue (202). Nous présumons qu'un des rôles de RPL22/eL22 dans le nucléole, serait de bloquer l'activité catalytique d'un pool des CDK4-Cycline D1, afin d'empêcher la transcription de l'ARNr par médiation d'UBF (**Figure 20**).

Il reste à identifier les sites d'interaction de RPL22/eL22 avec CDK4-Cycline D1. Nous proposons que les domaines N-terminal et C-terminal de RPL22/eL22 auraient des fonctions régulatrices antitumorales, puisque ce sont les régions qui divergent de celles de RPL22-like 1, qui a des rôles antagonistes (99).

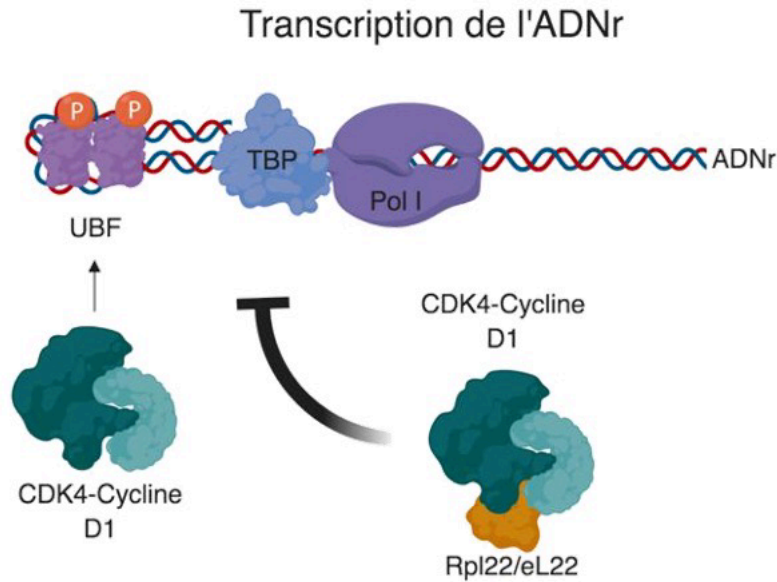


Figure 20. Modèle proposé lors du rôle nucléolaire de RPL22/eL22

Le complexe CDK4-Cycline D1 catalyse la phosphorylation d'UBF sur Ser⁴⁸⁴. UBF phosphorylé se lie au promoteur de l'ADNr pour activer la transcription des ARNr par l'ARN Pol I. RPL22/eL22 empêcherait la transcription de l'ARNr en bloquant l'activité du complexe CDK4-Cycline D1.

4.1.2. Implication de RPL22/eL22 dans le SASP

Lors de la surexpression de RPL22/eL22 dans les fibroblastes primaires, nous n'avons pas observé le phénotype sécréteur associé à la sénescence (SASP). Deux hypothèses sont suggérées. La première se base sur une induction faible de la sénescence, ce qui aurait pour conséquence l'atténuation du phénotype SASP. La deuxième explication se base sur des recherches où il a été observé que RPL22/eL22 diminue l'expression de NF- κ B par un mécanisme encore non élucidé. Dans une étude réalisée sur le développement de la leucémie T-ALL, Rao et collègues ont trouvé que la transformation maligne a lieu suite à la stimulation transcriptionnelle du facteur Lin28B, qui est la cible de NF- κ B. Lin28B inhibe la maturation du micro-ARN *let-7*, stimulant l'induction de MYC et d'autres oncogènes, ce qui accentue l'importance de RPL22/eL22 en tant que suppresseur tumoral (94). Il serait également

intéressant de regarder les niveaux d'expression du SASP dans les cellules dépourvues de RPL22/eL22 ainsi que les niveaux de RPL22-like 1, ce qui n'a pas été fait dans cette partie de notre thèse.

La **Figure 21** résume le modèle proposé lors de la régulation du cycle cellulaire et le SASP par RPL22/eL22.

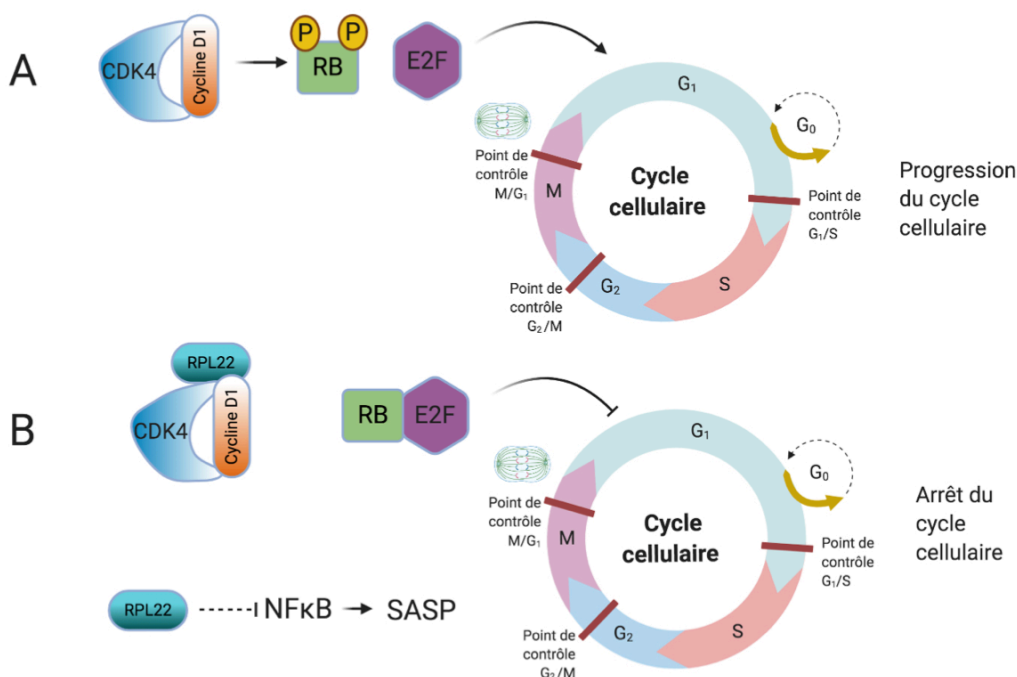


Figure 21. Modèle proposé pour le rôle régulateur de RPL22/eL22 dans le cycle cellulaire

(A) Dans des conditions sans stress nucléolaire, la progression du cycle cellulaire se déroule normalement pendant la division cellulaire. L'hyperphosphorylation de RB par médiation de CDK4/6-Cycline D1 mène à son inactivation. Cette hyperphosphorylation de RB permet la libération des facteurs de transcription de la famille des E2F et la transcription de ses gènes cibles, le cycle cellulaire peut donc entrer en phase S. (B) Lors de la surexpression de RPL22/eL22, ou dans des conditions de stress nucléolaire, RPL22/eL22 bloque la phosphorylation par CDK4-Cycline D1 de RB. RB dans son état active hypophosphorylé recrute E2F pour empêcher la progression du cycle cellulaire. RPL22/eL22 pourrait également réduire l'expression du SASP à travers l'inhibition de la voie de NF-κB.

4.2. Diminution de la translecture du codon d'arrêt dans la sénescence.

Les résultats présentés au chapitre 3 ont montré que la sénescence inhibe la translecture du codon d'arrêt à travers la participation de la voie de RB, malgré les défauts dans la ribogenèse. Dans cette partie de notre étude, nous proposons l'hypothèse que la sénescence, et notamment la voie de RB, empêcherait le potentiel oncogénique de la reprogrammation du protéome grâce à la réduction des protéines allongées en C-terminal. Les erreurs de terminaison de la traduction augmentent en présence de l'oncogène *ras* ainsi dans les cellules au comportement précancéreux, mais une fois la sénescence bien établie, ces erreurs diminuent. L'importance de la réduction de la translecture dans le cancer reste encore à être clarifiée mais des indices sur l'augmentation des protéines allongées en C-terminal dans certaines cellules tumorales (149,170), ainsi que des modèles proposés sur l'augmentation des erreurs de traduction dû aux ribosomes défectueux (259), suggèrent que la translecture pourrait avoir des implications dans la tumorigenèse. Nous suggérons que cette efficacité de terminaison contribuerait à la diminution des protéines localisées dans des compartiments cellulaires inusuels, ou avec des nouvelles fonctions oncogéniques.

Un des défis auxquels nous sommes confrontés dans cette partie de notre recherche concerne la relation directe entre RB et la diminution de la translecture du codon d'arrêt. Plus précisément, lors de la déplétion de RB via des shRNA dans les cellules sénescents, nous n'avons pas observé d'augmentation dans les niveaux de translecture du codon d'arrêt. Il est possible que p107 et p130 soient aussi essentielles lors de cette diminution. Cependant, la triple inhibition de RB, p107 et p130 par shRNA n'a pas été atteinte, limitant l'étude mécanistique.

Nous nous sommes intéressés à la mécanistique de la diminution de la translecture du codon d'arrêt en aval de la voie de RB. Pour ce faire, nous avons essayé de surexprimer E2F1, 2 et 3 (les facteurs de transcription réprimés directement par RB hypophosphorylé). Or, les cellules infectées mouraient quelques jours après l'induction des E2F.

4.2.1. Protéines endogènes allongées en C-terminal

Des analyses bio-informatiques nous ont permis d'identifier des candidats à protéines allongées en C-terminal. Nous avons validé expérimentalement la translecture du codon d'arrêt de quelques candidats (par exemple, VASP et hepsine (HPN), **Figure S7C-D**). Nos résultats indiquent une amélioration de l'efficacité de terminaison de la traduction dans les cellules sénescences, tandis que dans les cellules avec un comportement cancéreux, cette efficacité de terminaison se détériore (**Figure 17**). VASP est surexprimée dans de nombreux cancers colorectaux et dans des adénocarcinomes canauxaires pancréatiques. De plus, ses hauts niveaux coïncident avec l'apparition de métastases dans le foie et avec la réduction du temps de survie des patients atteints (260). L'hepsine est une sérine protéase de surface impliquée dans la progression du cancer et surexprimée dans des cancers épithéliaux, de la prostate, du sein, des ovaires et des reins (261,262). Il est aussi possible que les cellules cancéreuses requièrent des versions allongées en C-terminal de ces protéines afin d'améliorer leur potentiel oncogénique.

La détection par immunobuvardage de type western des protéines endogènes allongées en C-terminal est difficilement mesurable, car elles ne sont pas fortement exprimées, mais également, ces nouvelles isoformes pourraient différer de la protéine canonique seulement de quelques acides aminés. Une technique alternative serait le profilage des ribosomes des cellules sénescences et des cellules qui ont contourné la sénescence, à titre de comparaison. Ceci nous permettrait d'observer quelles protéines allongées en C-terminal seraient inhibées, et aurait un impact sur les connaissances de la régulation de la translecture du codon d'arrêt dans la sénescence. D'un autre côté, des analyses par spectrométrie de masse dans les cellules qui ont contourné la sénescence, comparées à celles de cellules sénescences *ras* pourraient nous aider à identifier quelles protéines endogènes, dont le domaine C-terminal est allongé, sont modulées dans la sénescence.

4.2.3. Modifications post-transcriptionnelles

L'hypothèse concernant l'implication des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr dans la variation des erreurs ne doit pas être exclue. Comme expliqué dans l'Introduction, la perturbation de ces modifications sur certains sites du ribosome a un impact sur l'incorporation incorrecte des acides aminés, sur la translecture des codons d'arrêt, ainsi que sur les changements du mode d'initiation de la traduction (158-160). La méthyltransférase fibrillarine participe avec les protéines nucléolaires Snu13 (*Small Nuclear Ribonucleoprotein 13*) (15.5K), NOP56, NOP58 (NOP5) ainsi qu'avec les snoRNA à boîtes C/D dans la catalyse des 2'-O-méthylations sur les riboses des ARNr (263). Des approches protéomiques nous ont permis d'identifier des protéines nucléolaires qui sont dégradées lors de l'établissement de la sénescence. Parmi ces protéines se trouvaient NOP56 et NOP58 (53). Nous supposons que la dégradation de NOP56 et de NOP58 affecterait le patron de 2'-O-méthylations des ARNr des cellules sénescents, ayant un impact sur la modulation de la translecture du codon d'arrêt. De futures recherches sur la mesure du patron des modifications post-transcriptionnelles les plus abondantes, telles que les pseudouridylations et 2'-O-méthylations, pourraient être envisagées dans la sénescence.

Pour ce faire, une méthode suggérée serait d'isoler par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 4% (contenant de l'urée 7M) les ARNr des cellules non sénescents et sénescents. Les ARNr seraient digérés avec la RNase A ou T1. Les produits de digestion seraient ensuite analysés par Chromatographie liquide (LC)/spectrométrie de masse (MS) (264). Cette méthode est très spécifique et sensible et si l'efficacité ionique est bonne, elle permettra l'identification des molécules selon la masse et la charge.

Une alternative mise en lumière récemment est le RiboMethSeq, une approche basée sur le séquençage approfondi de l'ARNr 2'-O-méthylé (71). Malheureusement cette méthode n'est pas encore optimisée pour l'étude des pseudouridylations (265). Dans le cas où l'analyse par LC-MS ne fonctionnerait pas, une méthode alternative consisterait à localiser et quantifier les 2'-O-méthylations par extension d'amorce, en utilisant la transcriptase reverse AMV (*Avian Myeloblastosis Virus*) pour synthétiser l'ADNc (ADN complémentaire) à partir de l'ARNr. Deux concentrations différentes de dNTP seraient utilisées: une faible concentration provoquant l'arrêt de l'extension de la chaîne quand il y a une 2'-O-méthylation; et une haute concentration grâce à laquelle la transcription aurait lieu malgré les modifications (58). Le rapport entre

l'ADNc à faibles concentrations des dNTP et l'ADNc à hautes concentrations des dNTP permettrait d'observer la variation de la quantité des modifications sur des positions spécifiques. D'autre part, afin d'évaluer les niveaux de pseudouridines, cette modification pourrait être altérée sélectivement avec un dérivé de la carbodiimide (266) et la même procédure que pour évaluer les 2'-O-méthylations pourrait être suivie.

4.2.4. RPS14/uS11 et RPL22/eL22 en tant qu'inhibiteurs des erreurs de la translecture

L'implication de RPS14/uS11 et de RPL22/eL22 dans l'efficacité de terminaison de la traduction n'a jamais été observée auparavant. Nous supposons que la diminution de la translecture du codon d'arrêt dans des cellules exprimant de forts niveaux de ces deux protéines, est lié à leur rôle dans l'activation de la voie de RB, plutôt qu'en tant que modulateurs de l'architecture des ribosomes. Néanmoins, cette hypothèse reste un défi pour de futures recherches. Nous commençons à peine à mettre en lumière notre hypothèse. Nous avons surexprimé dans des fibroblastes primaires le paralogue de RPL22/eL22, RPL22-like 1, qui présente des rôles semblables à RPL22/eL22 dans la traduction des protéines (95). Cependant, leurs rôles lors de la suppression tumorale sont opposés. Nous avons observé que, dans les mêmes conditions, la surexpression de RPL22/eL22 diminuait les erreurs de translecture tandis que celle de RPL22-like 1 n'avait aucun effet, voire une tendance à augmenter les erreurs avec le temps. Ces résultats préliminaires, sur l'efficacité de terminaison de la traduction, suggèrent que l'effet de ces deux protéines ribosomiques pourrait être causé par l'inhibition du complexe CDK4-Cycline D1, et non par leur rôle structurel dans le ribosome.

4.2.5. L'autophagie pourrait contribuer à une meilleure efficacité de terminaison de la traduction

Un dernier point à ne pas négliger est l'augmentation de l'activité autophagique dans la sénescence et son rôle dans la régénération des ribosomes. Il est considéré que l'homéostasie des ribosomes se fait par deux mécanismes, soit via la dégradation lysosomiale du ribosome ou

ribophagie (267,268), soit par la réparation du ribosome en remplaçant les protéines ribosomiques, principalement de l'interphase 40S et 60S, par les protéines ribosomiques qui se trouvent dans le cytosol. Il a été répertorié que les protéines RPL10/uL6, RPL36A/eL42, RPL24/eL24, RPL34/eL34 et RPL19/eL19 sont les plus rapidement remplacées dans le ribosome (269). La réparation des ribosomes par substitution des protéines ribosomiques impliquerait la prolongation de la demi-vie des ribosomes. Cependant, la conséquence d'une plus longue demi-vie serait l'accumulation de ribosomes défectueux, car seulement un pool de protéines peut être réparé par remplacement. Il se pourrait que l'autophagie augmentée dans les cellules sénescents contribue à diminuer la quantité de ribosomes défectueux, en améliorant, en conséquence, la fidélité de terminaison de la traduction. Nous n'avons aucune certitude suggérant cette possibilité mais des analyses de la demi-vie des ribosomes sénescents, c'est-à-dire, des analyses du renouvellement des ARNr, pourraient être envisagées. Néanmoins, le paradigme entre la perturbation de la biogenèse des ribosomes et la ribophagie augmentée dans la sénescence reste encore à explorer.

5. Conclusion

La voie de RB semble être le point de convergence entre notre étude sur le nouveau rôle de régulateur du cycle cellulaire de RPL22/eL22 et notre étude sur l'efficacité de terminaison de la traduction. Ce point de convergence accentue l'importance de cette voie lors de l'établissement de la sénescence et lors du potentiel antitumoral. Les cellules sénescents, à la différence des cellules au comportement malin, diminuent considérablement la production des protéines allongées en C-terminal, contrôlée potentiellement par la voie de RB. Nous retrouvons les mêmes résultats lors de la surexpression de RPL22/eL22, qui active également la voie de RB.

Bien que le paradigme entre la perturbation de la biogenèse des ribosomes et l'optimisation de la terminaison de la traduction dans la sénescence reste à être élucidé, nos recherches constituent un point d'ancrage et un guide qui peuvent mener à d'autres découvertes. Comme proposé par Thomas Kuhn, dans toutes les sciences, le paradigme caractérise l'évolution de la pensée scientifique.

La littérature révèle la participation de multiples protéines du ribosome dans la suppression tumorale (80,94,105,254), dans la signalisation immunitaire (270-273) et lors du développement (103,274,275). L'interaction de plusieurs protéines ribosomiques avec des CDK, ayant un rôle en tant que régulateurs du cycle cellulaire, commence à peine à être mise en lumière. Des thérapies actuelles contre le cancer ciblent l'inhibition de la ribogenèse en activant potentiellement les voies de sauvegarde après la libération des protéines ribosomiques (189,276). Notre recherche pourrait avoir comme perspective de contribuer au développement de stratégies thérapeutiques qui utiliseraient de petites molécules ou des peptides imitant les effets inhibiteurs de ces protéines ribosomiques. P53 constitue l'un des gènes les plus mutés, qui touche environ 50% des cancers (275,276). Pour cette raison, certains traitements sont inefficaces à cause de leur dépendance de l'activation de ce suppresseur de tumeur. Les types de cancers dont la voie de p53 est perturbée, pourraient être également des cibles de ces stratégies thérapeutiques. En plus de l'effet régulateur du cycle cellulaire, la réduction de nouvelles versions de protéines potentiellement dangereuses pour le bon fonctionnement

cellulaire, pourrait être comprise parmi les effets inhibiteurs de ces petites molécules ou peptides.

Dans notre recherche, nous avons concentré notre attention sur la translecture en région 3'UTR. Pour de futurs projets, il serait intéressant d'évaluer la variation de la translecture du codon d'arrêt des uORF dans les régions 5'UTR. Les uORF sont corrélés avec la répression de la traduction des gènes de prolifération (277,278). De plus, la dé-répression des messagers régulés par ces uORF peut être stimulée par la translecture de leur codon d'arrêt ainsi que par l'inactivation du facteur eIF2 α sous des conditions de stress (278). Considérant la sénescence comme barrière anti-cancer, une meilleure terminaison de la traduction des uORF dans ces cellules pourrait éviter la traduction, soit des protéines allongées en N-terminal, soit des peptides hors cadre de lecture potentiellement oncogéniques ayant un impact sur le comportement normal de la cellule.

6. Bibliographie

1. Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, **10**, 789-799.
2. Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**, 646-674.
3. Maley, C.C., Galipeau, P.C., Li, X., Sanchez, C.A., Paulson, T.G. and Reid, B.J. (2004) Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus. *Cancer Res*, **64**, 3414-3427.
4. Lowe, S.W., Cepero, E. and Evan, G. (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature*, **432**, 307-315.
5. Campisi, J. and d'Adda di Fagagna, F. (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 729-740.
6. Levitt, N.C. and Hickson, I.D. (2002) Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med*, **8**, 179-186.
7. van Heemst, D., den Reijer, P.M. and Westendorp, R.G. (2007) Ageing or cancer: a review on the role of caretakers and gatekeepers. *Eur J Cancer*, **43**, 2144-2152.
8. Oliveira, A.M., Ross, J.S. and Fletcher, J.A. (2005) Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. *Am J Clin Pathol*, **124 Suppl**, S16-28.
9. Vousden, K.H. and Prives, C. (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, **137**, 413-431.
10. Brady, C.A. and Attardi, L.D. (2010) p53 at a glance. *J Cell Sci*, **123**, 2527-2532.
11. He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D. *et al.* (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, **447**, 1130-1134.
12. Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P. *et al.* (2009) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, **458**, 223-227.
13. Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. *et al.* (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**, 1674-1677.
14. Tibbetts, R.S., Brumbaugh, K.M., Williams, J.M., Sarkaria, J.N., Cliby, W.A., Shieh, S.Y., Taya, Y., Prives, C. and Abraham, R.T. (1999) A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*, **13**, 152-157.
15. Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. and Prives, C. (2000) The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, **14**, 289-300.
16. Zilfou, J.T. and Lowe, S.W. (2009) Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **1**, a001883.
17. 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.

18. Huang, H.J., Yee, J.K., Shew, J.Y., Chen, P.L., Bookstein, R., Friedmann, T., Lee, E.Y. and Lee, W.H. (1988) Suppression of the neoplastic phenotype by replacement of the RB gene in human cancer cells. *Science*, **242**, 1563-1566.
19. Riley, D.J., Lee, E.Y. and Lee, W.H. (1994) The retinoblastoma protein: more than a tumor suppressor. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 1-29.
20. Buchkovich, K., Duffy, L.A. and Harlow, E. (1989) The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle. *Cell*, **58**, 1097-1105.
21. Sherr, C.J., Beach, D. and Shapiro, G.I. (2016) Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. *Cancer Discov*, **6**, 353-367.
22. Macdonald, J.I. and Dick, F.A. (2012) Posttranslational modifications of the retinoblastoma tumor suppressor protein as determinants of function. *Genes Cancer*, **3**, 619-633.
23. Farkas, T., Hansen, K., Holm, K., Lukas, J. and Bartek, J. (2002) Distinct phosphorylation events regulate p130- and p107-mediated repression of E2F-4. *J Biol Chem*, **277**, 26741-26752.
24. Trimarchi, J.M. and Lees, J.A. (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 11-20.
25. Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*, **12**, 2245-2262.
26. Guan, D. and Kao, H.Y. (2015) The function, regulation and therapeutic implications of the tumor suppressor protein, PML. *Cell Biosci*, **5**, 60.
27. Wang, Z.G., Delva, L., Gaboli, M., Rivi, R., Giorgio, M., Cordon-Cardo, C., Grosveld, F. and Pandolfi, P.P. (1998) Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science*, **279**, 1547-1551.
28. Ferbeyre, G., de Stanchina, E., Querido, E., Baptiste, N., Prives, C. and Lowe, S.W. (2000) PML is induced by oncogenic ras and promotes premature senescence. *Genes Dev*, **14**, 2015-2027.
29. Bischof, O., Kirsh, O., Pearson, M., Itahana, K., Pelicci, P.G. and Dejean, A. (2002) Deconstructing PML-induced premature senescence. *EMBO J*, **21**, 3358-3369.
30. Vernier, M., Bourdeau, V., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O., Begin, V., Saad, F., Mes-Masson, A.M. and Ferbeyre, G. (2011) Regulation of E2Fs and senescence by PML nuclear bodies. *Genes Dev*, **25**, 41-50.
31. de Stanchina, E., Querido, E., Narita, M., Davuluri, R.V., Pandolfi, P.P., Ferbeyre, G. and Lowe, S.W. (2004) PML is a direct p53 target that modulates p53 effector functions. *Mol Cell*, **13**, 523-535.
32. Chelbi-Alix, M.K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M.H. and de The, H. (1998) Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. *J Virol*, **72**, 1043-1051.
33. Regad, T. and Chelbi-Alix, M.K. (2001) Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene*, **20**, 7274-7286.
34. Masroori, N., Merindol, N. and Berthoux, L. (2016) The interferon-induced antiviral protein PML (TRIM19) promotes the restriction and transcriptional silencing of lentiviruses in a context-specific, isoform-specific fashion. *Retrovirology*, **13**, 19.
35. Hayflick, L. (1998) A brief history of the mortality and immortality of cultured cells. *Keio J Med*, **47**, 174-182.
36. Hayflick, L. (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, **37**, 614-636.

37. McHugh, D. and Gil, J. (2018) Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*, **217**, 65-77.
38. Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M. and Narita, M. (2014) Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev*, **28**, 99-114.
39. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J. and Peeper, D.S. (2010) The essence of senescence. *Genes Dev*, **24**, 2463-2479.
40. Harley, C.B., Futcher, A.B. and Greider, C.W. (1990) Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, **345**, 458-460.
41. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S. and Wright, W.E. (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-352.
42. Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K., Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W. *et al.* (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, **436**, 725-730.
43. d'Adda di Fagagna, F. (2008) Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer*, **8**, 512-522.
44. Chandler, H. and Peters, G. (2013) Stressing the cell cycle in senescence and aging. *Curr Opin Cell Biol*, **25**, 765-771.
45. Braig, M., Lee, S., Loddenkemper, C., Rudolph, C., Peters, A.H., Schlegelberger, B., Stein, H., Dorken, B., Jenuwein, T. and Schmitt, C.A. (2005) Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature*, **436**, 660-665.
46. Honda, R. and Yasuda, H. (1999) Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J*, **18**, 22-27.
47. Roninson, I.B. and Dokmanovic, M. (2003) Induction of senescence-associated growth inhibitors in the tumor-suppressive function of retinoids. *J Cell Biochem*, **88**, 83-94.
48. Finkel, T., Serrano, M. and Blasco, M.A. (2007) The common biology of cancer and ageing. *Nature*, **448**, 767-774.
49. Martin, G.M. (2011) The biology of aging: 1985-2010 and beyond. *FASEB J*, **25**, 3756-3762.
50. Kuilman, T. and Peeper, D.S. (2009) Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nat Rev Cancer*, **9**, 81-94.
51. Acosta, J.C., O'Loughlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N. *et al.* (2008) Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell*, **133**, 1006-1018.
52. Andreou, A.M. and Tavernarakis, N. (2009) SUMOylation and cell signalling. *Biotechnol J*, **4**, 1740-1752.
53. Deschenes-Simard, X., Gaumont-Leclerc, M.F., Bourdeau, V., Lessard, F., Moiseeva, O., Forest, V., Igelmann, S., Mallette, F.A., Saba-El-Leil, M.K., Meloche, S. *et al.* (2013) Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation. *Genes Dev*, **27**, 900-915.
54. Deschenes-Simard, X., Lessard, F., Gaumont-Leclerc, M.F., Bardeesy, N. and Ferbeyre, G. (2014) Cellular senescence and protein degradation: breaking down cancer. *Cell Cycle*, **13**, 1840-1858.
55. Kressler, D., Hurt, E. and Bassler, J. (2010) Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta*, **1803**, 673-683.
56. Turowski, T.W. and Tollervey, D. (2015) Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **6**, 129-139.

57. Lewis, J.D. and Tollervey, D. (2000) Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. *Science*, **288**, 1385-1389.
58. Woolford, J.L., Jr. and Baserga, S.J. (2013) Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **195**, 643-681.
59. Khatter, H., Myasnikov, A.G., Natchiar, S.K. and Klaholz, B.P. (2015) Structure of the human 80S ribosome. *Nature*, **520**, 640-645.
60. Jack, K., Bellodi, C., Landry, D.M., Niederer, R.O., Meskauskas, A., Musalgaonkar, S., Kopmar, N., Krasnykh, O., Dean, A.M., Thompson, S.R. *et al.* (2011) rRNA pseudouridylation defects affect ribosomal ligand binding and translational fidelity from yeast to human cells. *Mol Cell*, **44**, 660-666.
61. Belin, S., Beghin, A., Solano-Gonzalez, E., Bezin, L., Brunet-Manquat, S., Textoris, J., Prats, A.C., Mertani, H.C., Dumontet, C. and Diaz, J.J. (2009) Dysregulation of ribosome biogenesis and translational capacity is associated with tumor progression of human breast cancer cells. *PLoS One*, **4**, e7147.
62. Liang, X.H., Liu, Q., Liu, Q., King, T.H. and Fournier, M.J. (2010) Strong dependence between functional domains in a dual-function snoRNA infers coupling of rRNA processing and modification events. *Nucleic Acids Res*, **38**, 3376-3387.
63. Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M. and Kiss, T. (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, **85**, 1077-1088.
64. Ganot, P., Bortolin, M.L. and Kiss, T. (1997) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell*, **89**, 799-809.
65. Ni, J., Tien, A.L. and Fournier, M.J. (1997) Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell*, **89**, 565-573.
66. Meier, U.T. (2005) The many facets of H/ACA ribonucleoproteins. *Chromosoma*, **114**, 1-14.
67. 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.
68. Baudin-Baillieu, A., Fabret, C., Liang, X.H., Piekna-Przybylska, D., Fournier, M.J. and Rousset, J.P. (2009) Nucleotide modifications in three functionally important regions of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosome affect translation accuracy. *Nucleic Acids Res*, **37**, 7665-7677.
69. Ofengand, J., Malhotra, A., Remme, J., Gutgsell, N.S., Del Campo, M., Jean-Charles, S., Peil, L. and Kaya, Y. (2001) Pseudouridines and pseudouridine synthases of the ribosome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **66**, 147-159.
70. Maden, B.E. (1990) The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **39**, 241-303.
71. Krogh, N., Jansson, M.D., Hafner, S.J., Tehler, D., Birkedal, U., Christensen-Dalsgaard, M., Lund, A.H. and Nielsen, H. (2016) Profiling of 2'-O-Me in human rRNA reveals a subset of fractionally modified positions and provides evidence for ribosome heterogeneity. *Nucleic Acids Res*, **44**, 7884-7895.
72. Decatur, W.A. and Fournier, M.J. (2002) rRNA modifications and ribosome function. *Trends Biochem Sci*, **27**, 344-351.
73. Meng, L., Yasumoto, H. and Tsai, R.Y. (2006) Multiple controls regulate nucleostemin partitioning between nucleolus and nucleoplasm. *J Cell Sci*, **119**, 5124-5136.

74. Romanova, L., Grand, A., Zhang, L., Rayner, S., Katoku-Kikyo, N., Kellner, S. and Kikyo, N. (2009) Critical role of nucleostemin in pre-rRNA processing. *J Biol Chem*, **284**, 4968-4977.
75. Mialon, A., Thastrup, J., Kallunki, T., Mannermaa, L., Westermarck, J. and Holmstrom, T.H. (2008) Identification of nucleolar effects in JNK-deficient cells. *FEBS Lett*, **582**, 3145-3151.
76. Tafforeau, L., Zorbas, C., Langhendries, J.L., Mullineux, S.T., Stamatopoulou, V., Mullier, R., Wacheul, L. and Lafontaine, D.L. (2013) The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. *Mol Cell*, **51**, 539-551.
77. 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.
78. Sloan, K.E., Leisegang, M.S., Doebele, C., Ramirez, A.S., Simm, S., Safferthal, C., Kretschmer, J., Schorge, T., Markoutsas, S., Haag, S. *et al.* (2015) The association of late-acting snoRNPs with human pre-ribosomal complexes requires the RNA helicase DDX21. *Nucleic Acids Res*, **43**, 553-564.
79. Hirano, Y., Ishii, K., Kumeta, M., Furukawa, K., Takeyasu, K. and Horigome, T. (2009) Proteomic and targeted analytical identification of BXDC1 and EBNA1BP2 as dynamic scaffold proteins in the nucleolus. *Genes Cells*, **14**, 155-166.
80. Lessard, F., Igelmann, S., Trahan, C., Huot, G., Saint-Germain, E., Mignacca, L., Del Toro, N., Lopes-Paciencia, S., Le Calve, B., Montero, M. *et al.* (2018) Senescence-associated ribosome biogenesis defects contributes to cell cycle arrest through the Rb pathway. *Nat Cell Biol*, **20**, 789-799.
81. Young, A.R., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J.F., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F.M. *et al.* (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev*, **23**, 798-803.
82. Weichhart, T. (2018) mTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology*, **64**, 127-134.
83. Dai, M.S., Zeng, S.X., Jin, Y., Sun, X.X., David, L. and Lu, H. (2004) Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol*, **24**, 7654-7668.
84. Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M. and Vousden, K.H. (2003) Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell*, **3**, 577-587.
85. Cao, B., Fang, Z., Liao, P., Zhou, X., Xiong, J., Zeng, S. and Lu, H. (2017) Cancer-mutated ribosome protein L22 (RPL22/eL22) suppresses cancer cell survival by blocking p53-MDM2 circuit. *Oncotarget*, **8**, 90651-90661.
86. Zhang, Y. and Lu, H. (2009) Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell*, **16**, 369-377.
87. Deisenroth, C. and Zhang, Y. (2010) Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene*, **29**, 4253-4260.
88. Liu, Y., Deisenroth, C. and Zhang, Y. (2016) RP-MDM2-p53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis and Tumor Surveillance. *Trends Cancer*, **2**, 191-204.
89. Choismel, V., Bacqueville, D., Rouquette, J., Noaillac-Depeyre, J., Fribourg, S., Cretien, A., Leblanc, T., Tchernia, G., Da Costa, L. and Gleizes, P.E. (2007) Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood*, **109**, 1275-1283.

90. Doherty, L., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choesmel, V., O'Donohue, M.F., Clinton, C., Schneider, H.E., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Ball, S.E. *et al.* (2010) Ribosomal protein genes RPS10 and RPS26 are commonly mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Am J Hum Genet*, **86**, 222-228.
91. 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.
92. Boria, I., Quarello, P., Avondo, F., Garelli, E., Aspesi, A., Carando, A., Campagnoli, M.F., Dianzani, I. and Ramenghi, U. (2008) A new database for ribosomal protein genes which are mutated in Diamond-Blackfan Anemia. *Hum Mutat*, **29**, E263-270.
93. 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.
94. Rao, S., Lee, S.Y., Gutierrez, A., Perrigoue, J., Thapa, R.J., Tu, Z., Jeffers, J.R., Rhodes, M., Anderson, S., Oravec, T. *et al.* (2012) Inactivation of ribosomal protein L22 promotes transformation by induction of the stemness factor, Lin28B. *Blood*, **120**, 3764-3773.
95. Novetsky, A.P., Zigelboim, I., Thompson, D.M., Jr., Powell, M.A., Mutch, D.G. and Goodfellow, P.J. (2013) Frequent mutations in the RPL22 gene and its clinical and functional implications. *Gynecol Oncol*, **128**, 470-474.
96. Stadanlick, J.E., Zhang, Z., Lee, S.Y., Hemann, M., Biery, M., Carleton, M.O., Zambetti, G.P., Anderson, S.J., Oravec, T. and Wiest, D.L. (2011) Developmental arrest of T cells in Rpl22-deficient mice is dependent upon multiple p53 effectors. *J Immunol*, **187**, 664-675.
97. Longuet, M., Auger-Buendia, M.A. and Tavitian, A. (1979) Studies on the distribution of ribosomal proteins in mammalian ribosomal subunits. *Biochimie*, **61**, 1113-1123.
98. O'Leary, M.N., Schreiber, K.H., Zhang, Y., Duc, A.C., Rao, S., Hale, J.S., Academia, E.C., Shah, S.R., Morton, J.F., Holstein, C.A. *et al.* (2013) The ribosomal protein Rpl22 controls ribosome composition by directly repressing expression of its own paralog, Rpl22i1. *PLoS Genet*, **9**, e1003708.
99. Zhang, Y., Duc, A.C., Rao, S., Sun, X.L., Bilbee, A.N., Rhodes, M., Li, Q., Kappes, D.J., Rhodes, J. and Wiest, D.L. (2013) Control of hematopoietic stem cell emergence by antagonistic functions of ribosomal protein paralogs. *Dev Cell*, **24**, 411-425.
100. Guan, X.Y., Fung, J.M., Ma, N.F., Lau, S.H., Tai, L.S., Xie, D., Zhang, Y., Hu, L., Wu, Q.L., Fang, Y. *et al.* (2004) Oncogenic role of eIF-5A2 in the development of ovarian cancer. *Cancer Res*, **64**, 4197-4200.
101. Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B. and Gray, J.W. (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet*, **21**, 99-102.
102. Bagchi, A., Papazoglu, C., Wu, Y., Capurso, D., Brodt, M., Francis, D., Bredel, M., Vogel, H. and Mills, A.A. (2007) CHD5 is a tumor suppressor at human 1p36. *Cell*, **128**, 459-475.
103. Anderson, S.J., Lauritsen, J.P., Hartman, M.G., Foushee, A.M., Lefebvre, J.M., Shinton, S.A., Gerhardt, B., Hardy, R.R., Oravec, T. and Wiest, D.L. (2007) Ablation of ribosomal protein L22 selectively impairs alphabeta T cell development by activation of a p53-dependent checkpoint. *Immunity*, **26**, 759-772.
104. Rao, S., Cai, K.Q., Stadanlick, J.E., Greenberg-Kushnir, N., Solanki-Patel, N., Lee, S.Y., Fahl, S.P., Testa, J.R. and Wiest, D.L. (2016) Ribosomal Protein Rpl22 Controls the Dissemination of T-cell Lymphoma. *Cancer Res*, **76**, 3387-3396.

105. Komrokji, R.S., Padron, E., Ebert, B.L. and List, A.F. (2013) Deletion 5q MDS: molecular and therapeutic implications. *Best Pract Res Clin Haematol*, **26**, 365-375.
106. Schneider, R.K., Schenone, M., Ferreira, M.V., Kramann, R., Joyce, C.E., Hartigan, C., Beier, F., Brummendorf, 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.
107. Narla, A. and Ebert, B.L. (2010) Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, **115**, 3196-3205.
108. Schmeing, T.M., Voorhees, R.M., Kelley, A.C. and Ramakrishnan, V. (2011) How mutations in tRNA distant from the anticodon affect the fidelity of decoding. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 432-436.
109. Rodnina, M.V. and Wintermeyer, W. (2009) Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*, **21**, 435-443.
110. Aylett, C.H. and Ban, N. (2017) Eukaryotic aspects of translation initiation brought into focus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **372**.
111. Pisarev, A.V., Hellen, C.U. and Pestova, T.V. (2007) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell*, **131**, 286-299.
112. Sonenberg, N. and Hinnebusch, A.G. (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, **136**, 731-745.
113. Kozak, M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell*, **44**, 283-292.
114. Browning, K.S. and Bailey-Serres, J. (2015) Mechanism of cytoplasmic mRNA translation. *Arabidopsis Book*, **13**, e0176.
115. Pelletier, J., Kaplan, G., Racaniello, V.R. and Sonenberg, N. (1988) Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol*, **8**, 1103-1112.
116. Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C. and Wimmer, E. (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol*, **62**, 2636-2643.
117. Cullen, B.R. (2009) Viral RNAs: lessons from the enemy. *Cell*, **136**, 592-597.
118. Plant, E.P., Nguyen, P., Russ, J.R., Pittman, Y.R., Nguyen, T., Quesinberry, J.T., Kinzy, T.G. and Dinman, J.D. (2007) Differentiating between near- and non-cognate codons in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, **2**, e517.
119. Graifer, D., Molotkov, M., Styazhkina, V., Demeshkina, N., Bulygin, K., Eremina, A., Ivanov, A., Laletina, E., Ven'yaminova, A. and Karpova, G. (2004) Variable and conserved elements of human ribosomes surrounding the mRNA at the decoding and upstream sites. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3282-3293.
120. Bertram, G., Bell, H.A., Ritchie, D.W., Fullerton, G. and Stansfield, I. (2000) Terminating eukaryote translation: domain 1 of release factor eRF1 functions in stop codon recognition. *RNA*, **6**, 1236-1247.
121. Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M. *et al.* (2009) Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev*, **23**, 1106-1118.
122. Preis, A., Heuer, A., Barrio-Garcia, C., Hauser, A., Eyler, D.E., Berninghausen, O., Green, R., Becker, T. and Beckmann, R. (2014) Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1. *Cell Rep*, **8**, 59-65.

123. Brown, A., Shao, S., Murray, J., Hegde, R.S. and Ramakrishnan, V. (2015) Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes. *Nature*, **524**, 493-496.
124. McCaughan, K.K., Brown, C.M., Dalphin, M.E., Berry, M.J. and Tate, W.P. (1995) Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5431-5435.
125. Alkalaeva, E.Z., Pisarev, A.V., Frolova, L.Y., Kisselev, L.L. and Pestova, T.V. (2006) In vitro reconstitution of eukaryotic translation reveals cooperativity between release factors eRF1 and eRF3. *Cell*, **125**, 1125-1136.
126. Behrmann, E., Loerke, J., Budkevich, T.V., Yamamoto, K., Schmidt, A., Penczek, P.A., Vos, M.R., Burger, J., Mielke, T., Scheerer, P. *et al.* (2015) Structural snapshots of actively translating human ribosomes. *Cell*, **161**, 845-857.
127. Shoemaker, C.J. and Green, R. (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, E1392-1398.
128. Jackson, R.J., Hellen, C.U. and Pestova, T.V. (2012) Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv Protein Chem Struct Biol*, **86**, 45-93.
129. Schuller, A.P., Wu, C.C., Dever, T.E., Buskirk, A.R. and Green, R. (2017) eIF5A Functions Globally in Translation Elongation and Termination. *Mol Cell*, **66**, 194-205 e195.
130. Roy, B. and von Arnim, A.G. (2013) Translational Regulation of Cytoplasmic mRNAs. *Arabidopsis Book*, **11**, e0165.
131. Wethmar, K., Schulz, J., Muro, E.M., Talyan, S., Andrade-Navarro, M.A. and Leutz, A. (2016) Comprehensive translational control of tyrosine kinase expression by upstream open reading frames. *Oncogene*, **35**, 1736-1742.
132. Calvo, S.E., Pagliarini, D.J. and Mootha, V.K. (2009) Upstream open reading frames cause widespread reduction of protein expression and are polymorphic among humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 7507-7512.
133. Lynch, M. and Conery, J.S. (2003) The origins of genome complexity. *Science*, **302**, 1401-1404.
134. Kramer, E.B. and Farabaugh, P.J. (2007) The frequency of translational misreading errors in *E. coli* is largely determined by tRNA competition. *RNA*, **13**, 87-96.
135. Kramer, E.B., Vallabhaneni, H., Mayer, L.M. and Farabaugh, P.J. (2010) A comprehensive analysis of translational missense errors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA*, **16**, 1797-1808.
136. Dinman, J.D. (2012) Mechanisms and implications of programmed translational frameshifting. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **3**, 661-673.
137. Ketteler, R. (2012) On programmed ribosomal frameshifting: the alternative proteomes. *Front Genet*, **3**, 242.
138. Bekaert, M., Ivanov, I.P., Atkins, J.F. and Baranov, P.V. (2008) Ornithine decarboxylase antizyme finder (OAF): fast and reliable detection of antizymes with frameshifts in mRNAs. *BMC Bioinformatics*, **9**, 178.
139. Dulude, D., Berchiche, Y.A., Gendron, K., Brakier-Gingras, L. and Heveker, N. (2006) Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, **345**, 127-136.
140. Frankel, A.D. and Young, J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, **67**, 1-25.
141. Brierley, I. (1995) Ribosomal frameshifting viral RNAs. *J Gen Virol*, **76 (Pt 8)**, 1885-1892.

142. Jungreis, I., Lin, M.F., Spokony, R., Chan, C.S., Negre, N., Victorsen, A., White, K.P. and Kellis, M. (2011) Evidence of abundant stop codon readthrough in *Drosophila* and other metazoa. *Genome Res*, **21**, 2096-2113.
143. Pittman, Y.R., Kandl, K., Lewis, M., Valente, L. and Kinzy, T.G. (2009) Coordination of eukaryotic translation elongation factor 1A (eEF1A) function in actin organization and translation elongation by the guanine nucleotide exchange factor eEF1B α . *J Biol Chem*, **284**, 4739-4747.
144. Korkmaz, G., Holm, M., Wiens, T. and Sanyal, S. (2014) Comprehensive analysis of stop codon usage in bacteria and its correlation with release factor abundance. *J Biol Chem*, **289**, 30334-30342.
145. Chauvin, C., Salhi, S., Le Goff, C., Viranaicken, W., Diop, D. and Jean-Jean, O. (2005) Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation. *Mol Cell Biol*, **25**, 5801-5811.
146. Dabrowski, M., Bukowy-Bieryllo, Z. and Zietkiewicz, E. (2015) Translational readthrough potential of natural termination codons in eucaryotes--The impact of RNA sequence. *RNA Biol*, **12**, 950-958.
147. Bertram, G., Innes, S., Minella, O., Richardson, J. and Stansfield, I. (2001) Endless possibilities: translation termination and stop codon recognition. *Microbiology*, **147**, 255-269.
148. Beznoskova, P., Gunisova, S. and Valasek, L.S. (2016) Rules of UGA-N decoding by near-cognate tRNAs and analysis of readthrough on short uORFs in yeast. *RNA*, **22**, 456-466.
149. Schueren, F., Lingner, T., George, R., Hofhuis, J., Dickel, C., Gartner, J. and Thoms, S. (2014) Peroxisomal lactate dehydrogenase is generated by translational readthrough in mammals. *Elife*, **3**, e03640.
150. Alam, S.L., Wills, N.M., Ingram, J.A., Atkins, J.F. and Gesteland, R.F. (1999) Structural studies of the RNA pseudoknot required for readthrough of the gag-termination codon of murine leukemia virus. *J Mol Biol*, **288**, 837-852.
151. Wills, N.M., Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. (1991) Evidence that a downstream pseudoknot is required for translational read-through of the Moloney murine leukemia virus gag stop codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6991-6995.
152. Houck-Loomis, B., Durney, M.A., Salguero, C., Shankar, N., Nagle, J.M., Goff, S.P. and D'Souza, V.M. (2011) An equilibrium-dependent retroviral mRNA switch regulates translational recoding. *Nature*, **480**, 561-564.
153. Hasan, S., Platta, H.W. and Erdmann, R. (2013) Import of proteins into the peroxisomal matrix. *Front Physiol*, **4**, 261.
154. Loughran, G., Chou, M.Y., Ivanov, I.P., Jungreis, I., Kellis, M., Kiran, A.M., Baranov, P.V. and Atkins, J.F. (2014) Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes. *Nucleic Acids Res*, **42**, 8928-8938.
155. Dunn, J.G., Foo, C.K., Belletier, N.G., Gavis, E.R. and Weissman, J.S. (2013) Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *eLife*, **2**, e01179.
156. Chan, C.S., Jungreis, I. and Kellis, M. (2013) Heterologous stop codon readthrough of metazoan readthrough candidates in yeast. *PLoS One*, **8**, e59450.
157. Baxter-Roshek, J.L., Petrov, A.N. and Dinman, J.D. (2007) Optimization of ribosome structure and function by rRNA base modification. *PLoS One*, **2**, e174.
158. Basu, A., Das, P., Chaudhuri, S., Bevilacqua, E., Andrews, J., Barik, S., Hatzoglou, M., Komar, A.A. and Mazumder, B. (2011) Requirement of rRNA methylation for 80S

- ribosome assembly on a cohort of cellular internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol*, **31**, 4482-4499.
159. Ruggero, D. (2013) Translational control in cancer etiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **5**.
160. Fatscher, T., Boehm, V. and Gehring, N.H. (2015) Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell Mol Life Sci*, **72**, 4523-4544.
161. Hug, N., Longman, D. and Caceres, J.F. (2016) Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res*, **44**, 1483-1495.
162. Chang, Y.F., Imam, J.S. and Wilkinson, M.F. (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, **76**, 51-74.
163. Jia, J., Werkmeister, E., Gonzalez-Hilarion, S., Leroy, C., Gruenert, D.C., Lafont, F., Tulasne, D. and Lejeune, F. (2017) Premature termination codon readthrough in human cells occurs in novel cytoplasmic foci and requires UPF proteins. *J Cell Sci*, **130**, 3009-3022.
164. Reynolds, N.M., Ling, J., Roy, H., Banerjee, R., Repasky, S.E., Hamel, P. and Ibba, M. (2010) Cell-specific differences in the requirements for translation quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 4063-4068.
165. Lee, J.W., Beebe, K., Nangle, L.A., Jang, J., Longo-Guess, C.M., Cook, S.A., Davisson, M.T., Sundberg, J.P., Schimmel, P. and Ackerman, S.L. (2006) Editing-defective tRNA synthetase causes protein misfolding and neurodegeneration. *Nature*, **443**, 50-55.
166. Liu, Y., Satz, J.S., Vo, M.N., Nangle, L.A., Schimmel, P. and Ackerman, S.L. (2014) Deficiencies in tRNA synthetase editing activity cause cardioproteinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 17570-17575.
167. Lu, J., Bergert, M., Walther, A. and Suter, B. (2014) Double-sieving-defective aminoacyl-tRNA synthetase causes protein mistranslation and affects cellular physiology and development. *Nat Commun*, **5**, 5650.
168. Fan, Y., Evans, C.R., Barber, K.W., Banerjee, K., Weiss, K.J., Margolin, W., Igoshin, O.A., Rinehart, J. and Ling, J. (2017) Heterogeneity of Stop Codon Readthrough in Single Bacterial Cells and Implications for Population Fitness. *Mol Cell*, **67**, 826-836 e825.
169. Hofhuis, J., Schueren, F., Notzel, C., Lingner, T., Gartner, J., Jahn, O. and Thoms, S. (2016) The functional readthrough extension of malate dehydrogenase reveals a modification of the genetic code. *Open Biol*, **6**.
170. Hsu, P.P. and Sabatini, D.M. (2008) Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell*, **134**, 703-707.
171. Eswarappa, S.M., Potdar, A.A., Koch, W.J., Fan, Y., Vasu, K., Lindner, D., Willard, B., Graham, L.M., DiCorleto, P.E. and Fox, P.L. (2014) Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-Ax. *Cell*, **157**, 1605-1618.
172. Hicklin, D.J. and Ellis, L.M. (2005) Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, **23**, 1011-1027.
173. Ferrara, N. (2009) Vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **29**, 789-791.
174. Xin, H., Zhong, C., Nudleman, E. and Ferrara, N. (2016) Evidence for Pro-angiogenic Functions of VEGF-Ax. *Cell*, **167**, 275-284 e276.
175. Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A. *et al.* (2013) Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, **502**, 333-339.

176. Nagarajan, N., Bertrand, D., Hillmer, A.M., Zang, Z.J., Yao, F., Jacques, P.E., Teo, A.S., Cutcutache, I., Zhang, Z., Lee, W.H. *et al.* (2012) Whole-genome reconstruction and mutational signatures in gastric cancer. *Genome biology*, **13**, R115.
177. Yang, M., Sun, H., Wang, H., Zhang, S., Yu, X. and Zhang, L. (2013) Down-regulation of ribosomal protein L22 in non-small cell lung cancer. *Med Oncol*, **30**, 646.
178. Jaenisch, R.B., Hentschke, V.S., Quagliotto, E., Cavinato, P.R., Schmeing, L.A., Xavier, L.L. and Dal Lago, P. (2011) Respiratory muscle training improves hemodynamics, autonomic function, baroreceptor sensitivity, and respiratory mechanics in rats with heart failure. *J Appl Physiol (1985)*, **111**, 1664-1670.
179. Ruggero, D. and Pandolfi, P.P. (2003) Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer*, **3**, 179-192.
180. White, R.J. (2005) RNA polymerases I and III, growth control and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**, 69-78.
181. Mullineux, S.T. and Lafontaine, D.L. (2012) Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie*, **94**, 1521-1532.
182. White, R.J. (2008) RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer. *Trends Genet*, **24**, 622-629.
183. Zhou, X., Hao, Q., Liao, J., Zhang, Q. and Lu, H. (2013) Ribosomal protein S14 unties the MDM2-p53 loop upon ribosomal stress. *Oncogene*, **32**, 388-396.
184. Munoz-Espin, D., Canamero, M., Maraver, A., Gomez-Lopez, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodriguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M. *et al.* (2013) Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, **155**, 1104-1118.
185. Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J. *et al.* (2013) Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, **155**, 1119-1130.
186. Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S.A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J.R., Laberge, R.M., Vijg, J., Van Steeg, H., Dolle, M.E. *et al.* (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell*, **31**, 722-733.
187. Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J. and Peeper, D.S. (2005) BRAF^{E600}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, **436**, 720-724.
188. Goudarzi, K.M. and Lindstrom, M.S. (2016) Role of ribosomal protein mutations in tumor development (Review). *Int J Oncol*, **48**, 1313-1324.
189. Lessard, F., Brakier-Gingras, L. and Ferbeyre, G. (2019) Ribosomal Proteins Control Tumor Suppressor Pathways in Response to Nucleolar Stress. *Bioessays*, **41**, e1800183.
190. Ferreira, A.M., Tuominen, I., van Dijk-Bos, K., Sanjabi, B., van der Sluis, T., van der Zee, A.G., Hollema, H., Zazula, M., Sijmons, R.H., Aaltonen, L.A. *et al.* (2014) High frequency of RPL22 mutations in microsatellite-unstable colorectal and endometrial tumors. *Hum Mutat*, **35**, 1442-1445.
191. Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X. and Ferbeyre, G. (2009) Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol*, **29**, 4495-4507.
192. Allen, M.A., Andrysiak, Z., Dengler, V.L., Mellert, H.S., Guarnieri, A., Freeman, J.A., Sullivan, K.D., Galbraith, M.D., Luo, X., Kraus, W.L. *et al.* (2014) Global analysis of p53-

- regulated transcription identifies its direct targets and unexpected regulatory mechanisms. *Elife*, **3**, e02200.
193. Mallette, F.A., Goumard, S., Gaumont-Leclerc, M.F., Moiseeva, O. and Ferbeyre, G. (2004) Human fibroblasts require the Rb family of tumor suppressors, but not p53, for PML-induced senescence. *Oncogene*, **23**, 91-99.
 194. Dorr, J.R., Yu, Y., Milanovic, M., Beuster, G., Zasada, C., Dabritz, J.H., Lisec, J., Lenze, D., Gerhardt, A., Schleicher, K. *et al.* (2013) Synthetic lethal metabolic targeting of cellular senescence in cancer therapy. *Nature*, **501**, 421-425.
 195. Coppe, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y. and Campisi, J. (2008) Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*, **6**, 2853-2868.
 196. 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.
 197. 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.
 198. Horn, H.F. and Vousden, K.H. (2008) Cooperation between the ribosomal proteins L5 and L11 in the p53 pathway. *Oncogene*, **27**, 5774-5784.
 199. Marechal, V., Elenbaas, B., Piette, J., Nicolas, J.C. and Levine, A.J. (1994) The ribosomal L5 protein is associated with mdm-2 and mdm-2-p53 complexes. *Mol Cell Biol*, **14**, 7414-7420.
 200. Rashkovan, M., Vadnais, C., Ross, J., Gigoux, M., Suh, W.K., Gu, W., Kosan, C. and Moroy, T. (2014) Miz-1 regulates translation of Trp53 via ribosomal protein L22 in cells undergoing V(D)J recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, E5411-5419.
 201. Voit, R., Hoffmann, M. and Grummt, I. (1999) Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *EMBO J*, **18**, 1891-1899.
 202. Collado, M. and Serrano, M. (2010) Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer*, **10**, 51-57.
 203. Vernier, M. and Ferbeyre, G. (2014) Complete senescence: RB and PML share the task. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*, **13**, 696.
 204. Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovskiy, V., Cordon-Cardo, C. and Lowe, S.W. (2007) Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*, **445**, 656-660.
 205. Kang, T.W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A. *et al.* (2011) Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, **479**, 547-551.
 206. Milanovic, M., Fan, D.N.Y., Belenki, D., Dabritz, J.H.M., Zhao, Z., Yu, Y., Dorr, J.R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I.A. *et al.* (2018) Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature*, **553**, 96-100.
 207. Romanov, S.R., Kozakiewicz, B.K., Holst, C.R., Stampfer, M.R., Haupt, L.M. and Tlsty, T.D. (2001) Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes. *Nature*, **409**, 633-637.
 208. Hernandez-Segura, A., de Jong, T.V., Melov, S., Guryev, V., Campisi, J. and Demaria, M. (2017) Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol*, **27**, 2652-2660 e2654.

209. Gosselin, K., Martien, S., Pourtier, A., Vercamer, C., Ostoich, P., Morat, L., Sabatier, L., Duprez, L., T'Kint de Roodenbeke, C., Gilson, E. *et al.* (2009) Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res*, **69**, 7917-7925.
210. Nassour, J., Martien, S., Martin, N., Deruy, E., Tomellini, E., Malaquin, N., Bouali, F., Sabatier, L., Wernert, N., Pinte, S. *et al.* (2016) Defective DNA single-strand break repair is responsible for senescence and neoplastic escape of epithelial cells. *Nat Commun*, **7**, 10399.
211. Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F. and Ferbeyre, G. (2007) The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes Dev*, **21**, 43-48.
212. Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. and Lowe, S.W. (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, **88**, 593-602.
213. Acevedo, M., Vernier, M., Mignacca, L., Lessard, F., Huot, G., Moiseeva, O., Bourdeau, V. and Ferbeyre, G. (2016) A CDK4/6-Dependent Epigenetic Mechanism Protects Cancer Cells from PML-induced Senescence. *Cancer Res*, **76**, 3252-3264.
214. Dinami, R., Buemi, V., Sestito, R., Zappone, A., Ciani, Y., Mano, M., Petti, E., Sacconi, A., Blandino, G., Giacca, M. *et al.* (2017) Epigenetic silencing of miR-296 and miR-512 ensures hTERT dependent apoptosis protection and telomere maintenance in basal-type breast cancer cells. *Oncotarget*, **8**, 95674-95691.
215. Saunderson, E.A., Stepper, P., Gomm, J.J., Hoa, L., Morgan, A., Allen, M.D., Jones, J.L., Gribben, J.G., Jurkowski, T.P. and Ficiz, G. (2017) Hit-and-run epigenetic editing prevents senescence entry in primary breast cells from healthy donors. *Nat Commun*, **8**, 1450.
216. Xia, L., Huang, W., Bellani, M., Seidman, M.M., Wu, K., Fan, D., Nie, Y., Cai, Y., Zhang, Y.W., Yu, L.R. *et al.* (2017) CHD4 Has Oncogenic Functions in Initiating and Maintaining Epigenetic Suppression of Multiple Tumor Suppressor Genes. *Cancer Cell*, **31**, 653-668 e657.
217. Bidou, L., Rousset, J.P. and Namy, O. (2010) Translational errors: from yeast to new therapeutic targets. *FEMS Yeast Res*, **10**, 1070-1082.
218. Drummond, D.A. and Wilke, C.O. (2009) The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nature reviews. Genetics*, **10**, 715-724.
219. True, H.L., Berlin, I. and Lindquist, S.L. (2004) Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature*, **431**, 184-187.
220. Charbonneau, J., Gendron, K., Ferbeyre, G. and Brakier-Gingras, L. (2012) The 5' UTR of HIV-1 full-length mRNA and the Tat viral protein modulate the programmed -1 ribosomal frameshift that generates HIV-1 enzymes. *RNA*, **18**, 519-529.
221. Schueren, F. and Thoms, S. (2016) Functional Translational Readthrough: A Systems Biology Perspective. *PLoS genetics*, **12**, e1006196.
222. Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Mamarbachi, A.M., Villeneuve, L., Mallette, F.A., Ferbeyre, G., Farhat, N., Perrault, L.P., Carrier, M. and Thorin, E. (2010) Endogenous oxidative stress prevents telomerase-dependent immortalization of human endothelial cells. *Mech Ageing Dev*, **131**, 354-363.
223. Del Toro, N., Fernandez-Ruiz, A., Mignacca, L., Kalegari, P., Rowell, M.C., Igelmann, S., Saint-Germain, E., Benfdil, M., Lopes-Paciencia, S., Brakier-Gingras, L. *et al.* (2019) Ribosomal protein RPL22/eL22 regulates the cell cycle by acting as an inhibitor of the CDK4-cyclin D complex. *Cell Cycle*, **18**, 759-770.

224. Gendron, K., Dulude, D., Lemay, G., Ferbeyre, G. and Brakier-Gingras, L. (2005) The virion-associated Gag-Pol is decreased in chimeric Moloney murine leukemia viruses in which the readthrough region is replaced by the frameshift region of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, **334**, 342-352.
225. Rosenberger, G., Koh, C.C., Guo, T., Rost, H.L., Kouvonen, P., Collins, B.C., Heusel, M., Liu, Y., Caron, E., Vichalkovski, A. *et al.* (2014) A repository of assays to quantify 10,000 human proteins by SWATH-MS. *Sci Data*, **1**, 140031.
226. Gandin, V., Sikstrom, K., Alain, T., Morita, M., McLaughlan, S., Larsson, O. and Topisirovic, I. (2014) Polysome fractionation and analysis of mammalian translomes on a genome-wide scale. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
227. Manuvakhova, M., Keeling, K. and Bedwell, D.M. (2000) Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA*, **6**, 1044-1055.
228. Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D. and Oroszlan, S. (1985) Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 1618-1622.
229. Baradaran-Heravi, A., Balgi, A.D., Zimmerman, C., Choi, K., Shidmoosavee, F.S., Tan, J.S., Bergeaud, C., Krause, A., Flibotte, S., Shimizu, Y. *et al.* (2016) Novel small molecules potentiate premature termination codon readthrough by aminoglycosides. *Nucleic Acids Res*, **44**, 6583-6598.
230. Regad, T., Saib, A., Lallemand-Breitenbach, V., Pandolfi, P.P., de The, H. and Chelbi-Alix, M.K. (2001) PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. *EMBO J*, **20**, 3495-3505.
231. El Asmi, F., Maroui, M.A., Dutrieux, J., Blondel, D., Nisole, S. and Chelbi-Alix, M.K. (2014) Implication of PMLIV in both intrinsic and innate immunity. *PLoS Pathog*, **10**, e1003975.
232. Deschenes-Simard, X., Roy, S. and Ferbeyre, G. (2016) Genome reprogramming in cells that escape from senescence. *Bionatura*, **1**, 54-61.
233. Marcel, V., Ghayad, S.E., Belin, S., Therizols, G., Morel, A.P., Solano-Gonzalez, 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 fibrillar and rRNA methylation in cancer. *Cancer Cell*, **24**, 318-330.
234. Helt, A.M. and Galloway, D.A. (2001) Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol*, **75**, 6737-6747.
235. Law, M.E., Corsino, P.E., Narayan, S. and Law, B.K. (2015) Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Anticancer Therapeutics. *Mol Pharmacol*.
236. 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.
237. Ajore, R., Raiser, D., McConkey, M., Joud, M., Boidol, B., Mar, B., Saksena, G., Weinstock, D.M., Armstrong, S., Ellis, S.R. *et al.* (2017) Deletion of ribosomal protein genes is a common vulnerability in human cancer, especially in concert with TP53 mutations. *EMBO Mol Med*, **9**, 498-507.
238. Stiebler, A.C., Freitag, J., Schink, K.O., Stehlik, T., Tillmann, B.A., Ast, J. and Bolker, M. (2014) Ribosomal readthrough at a short UGA stop codon context triggers dual localization of metabolic enzymes in Fungi and animals. *PLoS genetics*, **10**, e1004685.

239. Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W. and Bartel, D.P. (2015) Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, **4**.
240. Green, L. and Goff, S.P. (2015) Translational readthrough-promoting drugs enhance pseudoknot-mediated suppression of the stop codon at the Moloney murine leukemia virus gag-pol junction. *J Gen Virol*, **96**, 3411-3421.
241. Pollard, J.W., Harley, C.B., Chamberlain, J.W., Goldstein, S. and Stanners, C.P. (1982) Is transformation associated with an increased error frequency in mammalian cells? *J Biol Chem*, **257**, 5977-5979.
242. DeCaprio, J.A., Ludlow, J.W., Figge, J., Shew, J.Y., Huang, C.M., Lee, W.H., Marsilio, E., Paucha, E. and Livingston, D.M. (1988) SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, **54**, 275-283.
243. Beznoskova, P., Cuchalova, L., Wagner, S., Shoemaker, C.J., Gunisova, S., von der Haar, T. and Valasek, L.S. (2013) Translation initiation factors eIF3 and HCR1 control translation termination and stop codon read-through in yeast cells. *PLoS genetics*, **9**, e1003962.
244. Beznoskova, P., Wagner, S., Jansen, M.E., von der Haar, T. and Valasek, L.S. (2015) Translation initiation factor eIF3 promotes programmed stop codon readthrough. *Nucleic Acids Res*, **43**, 5099-5111.
245. Morris-Desbois, C., Bochar, V., Reynaud, C. and Jalinot, P. (1999) Interaction between the Ret finger protein and the Int-6 gene product and co-localisation into nuclear bodies. *J Cell Sci*, **112 (Pt 19)**, 3331-3342.
246. Salsman, J., Pinder, J., Tse, B., Corkery, D. and Dellaire, G. (2013) The translation initiation factor 3 subunit eIF3K interacts with PML and associates with PML nuclear bodies. *Exp Cell Res*, **319**, 2554-2565.
247. Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F. and Jalinot, P. (1996) Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science*, **273**, 951-953.
248. Guillon, J., Toutain, B., Boissard, A., Guette, C. and Coqueret, O. (2020) tRNA biogenesis and specific Aminoacyl-tRNA Synthetases regulate senescence stability under the control of mTOR. *bioRxiv*, 2020.2004.2030.068114.
249. Nacarelli, T., Azar, A. and Sell, C. (2015) Aberrant mTOR activation in senescence and aging: A mitochondrial stress response? *Exp Gerontol*, **68**, 66-70.
250. Le, S., Sternglanz, R. and Greider, C.W. (2000) Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA. *Mol Biol Cell*, **11**, 999-1010.
251. Yang, M., Sun, H., He, J., Wang, H., Yu, X., Ma, L. and Zhu, C. (2014) Interaction of ribosomal protein L22 with casein kinase 2alpha: a novel mechanism for understanding the biology of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, **32**, 139-144.
252. Zhou, R., Hotta, I., Denli, A.M., Hong, P., Perrimon, N. and Hannon, G.J. (2008) Comparative analysis of argonaute-dependent small RNA pathways in *Drosophila*. *Mol Cell*, **32**, 592-599.
253. Bhat, K.P., Itahana, K., Jin, A. and Zhang, Y. (2004) Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J*, **23**, 2402-2412.
254. Zhu, Y., Poyurovsky, M.V., Li, Y., Biderman, L., Stahl, J., Jacq, X. and Prives, C. (2009) Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Mol Cell*, **35**, 316-326.
255. 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.
256. Xiang, X., Wang, Y., Zhang, H., Piao, J., Muthusamy, S., Wang, L., Deng, Y., Zhang, W., Kuang, R., Billadeau, D.D. *et al.* (2018) Vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes

- liver metastasis of gastrointestinal cancer by activating a beta1-integrin-FAK-YAP1/TAZ signaling pathway. *NPJ Precis Oncol*, **2**, 2.
257. 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.
258. Magee, J.A., Araki, T., Patil, S., Ehrig, T., True, L., Humphrey, P.A., Catalona, W.J., Watson, M.A. and Milbrandt, J. (2001) Expression profiling reveals hepsin overexpression in prostate cancer. *Cancer Res*, **61**, 5692-5696.
259. Sulima, S.O., Patchett, S., Advani, V.M., De Keersmaecker, K., Johnson, A.W. and Dinman, J.D. (2014) Bypass of the pre-60S ribosomal quality control as a pathway to oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **111**, 5640-5645.
260. Miao, J., Mu, D., Ergel, B., Singavarapu, R., Duan, Z., Powers, S., Oliva, E. and Orsulic, S. (2008) Hepsin colocalizes with desmosomes and induces progression of ovarian cancer in a mouse model. *Int J Cancer*, **123**, 2041-2047.
261. Xing, P., Li, J.G., Jin, F., Zhao, T.T., Liu, Q., Dong, H.T. and Wei, X.L. (2011) Clinical and biological significance of hepsin overexpression in breast cancer. *J Investig Med*, **59**, 803-810.
262. Zhang, M., Zhao, J., Tang, W., Wang, Y., Peng, P., Li, L., Song, S., Wu, H., Li, C., Yang, C. *et al.* (2016) High Hepsin expression predicts poor prognosis in Gastric Cancer. *Sci Rep*, **6**, 36902.
263. Reichow, S.L., Hamma, T., Ferre-D'Amare, A.R. and Varani, G. (2007) The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res*, **35**, 1452-1464.
264. Bakin, A. and Ofengand, J. (1993) Four newly located pseudouridylate residues in Escherichia coli 23S ribosomal RNA are all at the peptidyltransferase center: analysis by the application of a new sequencing technique. *Biochemistry*, **32**, 9754-9762.
265. Ossareh-Nazari, B., Nino, C.A., Bengtson, M.H., Lee, J.W., Joazeiro, C.A. and Dargemont, C. (2014) Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy. *J Cell Biol*, **204**, 909-917.
266. Ashford, T.P. and Porter, K.R. (1962) Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J Cell Biol*, **12**, 198-202.
267. Mathis, A.D., Naylor, B.C., Carson, R.H., Evans, E., Harwell, J., Knecht, J., Hexem, E., Peelor, F.F., 3rd, Miller, B.F., Hamilton, K.L. *et al.* (2017) Mechanisms of In Vivo Ribosome Maintenance Change in Response to Nutrient Signals. *Mol Cell Proteomics*, **16**, 243-254.
268. Zhang, H.X., Liu, Z.X., Sun, Y.P., Zhu, J., Lu, S.Y., Liu, X.S., Huang, Q.H., Xie, Y.Y., Zhu, H.B., Dang, S.Y. *et al.* (2013) Rig-I regulates NF-kappaB activity through binding to Nf-kappab1 3'-UTR mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, 6459-6464.
269. Jia, J., Arif, A., Willard, B., Smith, J.D., Stuehr, D.J., Hazen, S.L. and Fox, P.L. (2012) Protection of extraribosomal RPL13a by GAPDH and dysregulation by S-nitrosylation. *Mol Cell*, **47**, 656-663.
270. Green, L., Houck-Loomis, B., Yueh, A. and Goff, S.P. (2012) Large ribosomal protein 4 increases efficiency of viral recoding sequences. *J Virol*, **86**, 8949-8958.
271. Zehring, W.A., Lee, J.M., Weeks, J.R., Jokerst, R.S. and Greenleaf, A.L. (1988) The C-terminal repeat domain of RNA polymerase II largest subunit is essential in vivo but is not required for accurate transcription initiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 3698-3702.

272. Duncan, K.A., Jimenez, P. and Carruth, L.L. (2009) The selective estrogen receptor-alpha coactivator, RPL7, and sexual differentiation of the songbird brain. *Psychoneuroendocrinology*, **34 Suppl 1**, S30-38.
273. Perucho, L., Artero-Castro, A., Guerrero, S., Ramon y Cajal, S., ME, L.L. and Wang, Z.Q. (2014) RPLP1, a crucial ribosomal protein for embryonic development of the nervous system. *PLoS One*, **9**, e99956.
274. Burger, K., Muhl, B., Harasim, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Orban, M., Kellner, M., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Holzner, M. *et al.* (2010) Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem*, **285**, 12416-12425.
275. Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. and Rotter, V. (2011) Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*, **2**, 466-474.
276. Parrales, A. and Iwakuma, T. (2015) Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Front Oncol*, **5**, 288.
277. Wethmar, K., Smink, J.J. and Leutz, A. (2010) Upstream open reading frames: molecular switches in (patho)physiology. *Bioessays*, **32**, 885-893.
278. Johnstone, T.G., Bazzini, A.A. and Giraldez, A.J. (2016) Upstream ORFs are prevalent translational repressors in vertebrates. *EMBO J*, **35**, 706-723.