Implication de la biogenèse des ribosomes dans la régulation des cellules souches : étude du gène Notchless dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques chez la souris adulte

Marie Le Bouteiller

▶ **To cite this version:**

Marie Le Bouteiller. Implication de la biogenèse des ribosomes dans la régulation des cellules souches : étude du gène Notchless dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques chez la souris adulte. Biologie du développement. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66359 . tel-00832965

HAL Id: tel-00832965

https://theses.hal.science/tel-00832965

Submitted on 11 Jun 2013

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

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

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole Doctorale : Complexité du vivant

Spécialité : Biologie du Développement

Présentée par

Marie LE BOUTEILLER

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Implication de la biogenèse des ribosomes dans la régulation des cellules souches: étude du gène *Notchless* dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques chez la souris adulte

---

Soutenue le 26 septembre 2012, devant le jury composé de :

Dr Thierry Jaffredo	Président du jury
Dr Catherine Robin	Rapportrice
Pr Pierre-Emmanuel Gleizes	Rapporteur
Dr Jean-René Huynh	Examinateur
Dr Ana Cumano	Examinatrice
Dr Michel Cohen-Tannoudji	Directeur de thèse

Les sentiers battus n'offrent guère de richesse ; les autres en sont pleins

Jean Giono

Remerciements

L'ensemble de ce travail n'aurait pas été possible sans nombre de personnes. Aujourd'hui, je souhaite associer à mon projet tous ceux qui m'ont accompagnée, et que j'ai rencontrés tout au long de ces quatre ans.

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté de se plonger dans le monde de *Notchless*. Il est très valorisant de présenter ces résultats à d'autres, je vous remercie d'avoir consacré du temps à l'étude de mon travail. Je félicite particulièrement mes deux rapporteurs d'être arrivés à bout de mon introduction, que j'ai pourtant tenté de limiter.

Sûrement autant que le sujet, la thèse est marquée par le laboratoire d'accueil. Aussi, je remercie l'ensemble des membres de l'Unité de Génétique Fonctionnelle de la Souris croisés au cours de ma thèse, qui ont rendu cette expérience unique. Merci pour les repas, les cafés, et les discussions partagées, ces moments de tous les jours.

Je remercie Jean-Jacques Panthier de m'avoir accueillie dans son laboratoire pendant ces quatre années. Merci pour ta bienveillance avisée, à la cantine, en réunion, ou à la croisée des couloirs.

Je remercie bien sûr Michel. J'ai senti que tu faisais confiance au projet, que tu me faisais confiance aussi. Merci pour ton soutien au cours de toutes les manipes, de tous les résultats, de toutes les hypothèses. Merci également pour ton regard critique et pertinent, qui a souvent fait avancer ma réflexion. J'ai beaucoup apprécié nos discussions scientifiques, même, et peut-être surtout quand nous n'étions pas tout à fait d'accord : j'ai appris à chercher et à développer des arguments, et à réfléchir à deux. Je n'ai sans doute pas eu le temps de vraiment te battre au volley ou au baby-foot, on pourra essayer le ping-pong…

Arrivée au laboratoire, j'ai été accueillie au sein du module des filles, pour une formation en douceur sur *Notchless* et les techniques du laboratoire. Merci Sarah, merci Sandrine, pour votre accueil, votre aide, et votre gentillesse, toujours. Merci pour toutes les petites remarques et discussions sur la famille, la culture, les impressions du moment… sur la vie quoi.

Merci à toi Céline de m'avoir confié ton projet. C'est aussi toi qui m'as décidée, il y a quatre ans, à me lancer dans cette aventure. Tu m'as initiée aux joies du facs, de la vie du labo, des souris… Trop de souris…

Un merci tout particulier à Aline, Satoko, Teddy, Myriam, Jérôme, Léonard, Leandro, Charlène, pour les cafés, les M&Ms et les pauses inopinées, et les bières de temps en temps … Merci à Aline et Jérôme pour la relecture du manuscrit et les encouragements qui vont avec. Il reste encore quelques fautes, je le crains, mais vous m'avez bien aidée à déblayer le terrain !

Je remercie aussi chaleureusement Ziza pour ton aide et tes conseils de tous les jours.

Merci Ana de nous avoir guidés sur les chemins de l'hématopoïèse. Merci pour ton attention, pour ton écoute et ton aide, technique au facs, et scientifique sur le projet. Merci aussi à ton labo, pour les discussions en passant, et les conseils de spécialistes.

Je remercie aussi les membres de la plate-forme d'imagerie dynamique, et de la plate-forme de cytométrie, pour leur aide technique, et leur soutien psychologique patient en face des soucis techniques. Un merci particulier à Pierre-Henri pour ton aide pour plusieurs de mes projets.

La biologie des ribosomes est un monde inconnu et mystérieux pour un laboratoire de biologie du développement. Je remercie sincèrement Micheline Fromont-Racine, Pierre-Emmanuel Gleizes, Annie Mougin et Marie-Françoise O'Donohue pour leur soutien technique et leur présence au bout du mail, précieux dans cette aventure.

Je remercie mes amis, de Paris et d'ailleurs, pour les soirées, les we, les vacances. J'ai ressenti votre présence et votre amitié tout au long de ces quatre ans. Vous tous, ingénieurs, vous autres, médecins, et les autres, forts de ne pas être majoritaires, vous aviez toujours pour mon projet la curiosité qui fait plaisir et qui valorise.

Merci à ma famille aussi : pour les petites pauses du we, les déjeuners le dimanche midi, les séances photos, les chants et les rigolades, les vacances, les mails et les textos de tous les jours, et toutes ces petites attentions qui m'ont énormément portée pendant cette thèse. Merci à tous mes grands-parents, si chers à mon cœur. On ne vient pas de nulle part, et je suis fière de m'inscrire dans vos traces.

Bien sûr, merci Benjamin ! Merci pour ton aide concrète pour la réalisation de cette thèse, pour ton soutien indéfectible auprès du Mac, de word, de Mendeley, et autres logiciels… Et surtout, merci pour ta présence, ta patience et tes encouragements de tous les jours. Tu m'aides tellement à y croire !

Marie

Implication de la biogenèse des ribosomes dans la régulation des cellules souches : étude du gène *Notchless* dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques chez la souris adulte

Résumé

De nombreux facteurs régulant la fonction des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) ont été identifiés ces dernières années grâce à des modèles murins. Au cours de ma thèse, j'ai montré que le gène *Notchless* (*Nle*) était nécessaire au maintien des CSH adultes. L'inactivation ubiquitaire de *Nle* chez la souris adulte provoque la mort des souris en une douzaine de jours, précédée d'une disparition rapide des CSH et des progéniteurs multipotents. Suite à la délétion de *Nle*, les CSH entrent en cycle indiquant que *Nle* pourrait être important pour le maintien de la quiescence des CSH. Aucune augmentation de l'apoptose n'a été détectée. Différentes approches de greffes ont montré que *Nle* était requis dans les CSH de façon autonome cellulaire. L'ensemble de ces données a permis de conclure que *Nle* est un régulateur critique du maintien des CSH, à l'homéostasie et en situation de stress. Par ailleurs, des approches *in vivo* et *ex vivo* suggèrent que *Nle* n'est pas requis pour le développement et la survie des cellules B et des progéniteurs myéloïdes.

Des données récentes ont montré que l'orthologue de *Nle* chez la levure était impliqué dans la biogenèse des ribosomes. En utilisant des cellules ES murines, j'ai montré que ce rôle était conservé chez la souris. Par une approche combinée de marquages des cellules hématopoïétiques et de FISH sur les ARNr, j'ai montré que la délétion de *Nle* affectait la biogenèse des ribosomes dans les CSH et les progéniteurs immatures, mais pas dans le lignage B. Dans son ensemble, mon travail de thèse suggère que la synthèse des ribosomes pourrait être spécifiquement régulée en fonction du type cellulaire, et en particulier dans les cellules souches.

Mots-clés

Cellule souche hématopoïétique ; Biogenèse des ribosomes ; Invalidation conditionnelle ; Souris ; Notchless

Crosstalks between ribosome biogenesis and stem cell regulation :
study of the role of *Notchless* in hematopoietic stem cells homeostasis in adult mouse

Abstract

Numerous factors regulating Hematopoietic Stem Cells (HSC) function have been identified during the last decade thanks to mouse models. During my PhD, I showed that *Notchless* (*Nle*) is required for the maintenance of adult HSC. Ubiquitous inactivation of *Nle* in adult mouse induced the death of the mouse within 12 days, preceded by a rapid disappearance of HSC and multipotent progenitors. Following *Nle* inactivation, HSC entered cell cycle, suggesting that *Nle* is critical to maintain HSC quiescence. No increase in apoptosis was detected. Several transplantations approaches showed that *Nle* is cell-autonomously required in HSC. Altogether these results indicate that *Nle* is a new regulator of HSC maintenance, both in homeostasis and under stress conditions. Moreover, *in vivo* and *ex vivo* approaches suggest that *Nle* is dispensable for B cells and myeloid progenitors development and survival.

Recent data showed that *Nle* ortholog in yeast is involved in ribosome biogenesis. Using murine ES cells, I showed that this role is conserved in mouse. Using hematopoietic cells labelling coupled with FISH on rRNA, I showed that *Nle* deletion induced defects in ribosome biogenesis in HSC and immature progenitor cells, but not in B cells. Altogether, this study suggests that ribosome biogenesis might be specifically regulated depending on cell type, and particularly in stem cells.

Keywords

Hematopoietic Stem Cell ; Ribosome biogenesis ; Conditional inactivation ; Mouse ; Notchless

Sommaire

Sommaire **6**

Listes des figures et des tableaux **11**

Liste des abréviations utilisées dans ce manuscrit **14**

INTRODUCTION **15**

Partie 1 : Les cellules souches hématopoïétiques **16**

I. Les Cellules Souches Hématopoïétiques -CSH-, modèle d'étude privilégié **16**

1. Introduction : l'hématopoïèse et les CSH 16

1.1. Des CSH fortement sollicitées 16

1.2. Un système hiérarchique 16

1.3. Quelques remarques 17

2. Petite histoire de la naissance du concept de cellule souche et de l'identification des CSH 18

2.1. La naissance du concept de cellule souche 18

2.2. Les deux propriétés des cellules souches : le potentiel de différenciation et l'auto-renouvellement 18

3. Identification des CSH : caractéristiques phénotypiques et tests fonctionnels 19

3.1. Identification phénotypique des CSH 19

3.1.1. Marquages membranaires et cytométrie de flux 19

3.1.2. Propriété de « Side Population » 20

3.1.3. Des CSH quiescentes et capables de retenir un marquage de l'ADN 20

3.2. Identification fonctionnelle des CSH 21

3.2.1. Cultures *ex vivo* 21

3.2.2. La greffe, le test fonctionnel par excellence 21

3.2.3. Entre le potentiel testé des CSH et leur comportement *in vivo* : plasticité des cellules souches ? 22

4. L'environnement des CSH : la niche 23

4.1. Petite histoire de la naissance du concept de niche 23

4.2. Deux niches pour les CSH ? 23

4.2.1. La niche endostéale 23

4.2.2. La niche vasculaire 24

4.2.3. Deux, une ou plusieurs niches ? 24

4.3. Régulation par la niche 25

4.4. Conclusion : des progrès considérables et de nouvelles questions 25

5. Hétérogénéité au sein de la population des CSH 26

5.1. Une hétérogénéité dans la quiescence des CSH 26

5.2. Un auto-renouvellement variable pour les CSH ? 27

5.3. Des sous-populations de CSH au potentiel de différenciation biaisé 28
5.4. Conclusions : de multiples hétérogénéités 29
6. Quelle définition pour une cellule souche ? 30
6.1. Vers une définition moléculaire de la cellule souche … 30
6.2. … ou plutôt une définition fonctionnelle de la cellule souche ? 31
7. Conclusion : les CSH, un modèle privilégié d'étude des cellules souches 32
II. Régulation des CSH : des réponses spécifiques en situations de stress 33
1. La voie *p53* : au carrefour de l'homéostasie et de la gestion du stress 33
1.1. Rôle de *p53* dans l'auto-renouvellement des CSH 34
1.2. Rôle de *p53* dans la quiescence 35
1.3. Quelques exemples du rôle de *p53* dans d'autres cellules souches 35
1.4. Une compétition cellulaire au sein des CSH et progéniteurs arbitrée par *p53* 36
2. Entre quiescence et prolifération : plasticité des CSH face au stress 37
2.1. La quiescence est-elle nécessaire à l'auto-renouvellement ? 37
2.1.1. La perte de quiescence peut induire des défauts d'auto-renouvellement et la disparition des CSH 37
2.1.2. Une prolifération accrue des CSH sans défauts d'auto-renouvellement ? 38
2.2. Régulation de la quiescence, quelques éléments 39
2.2.1. Une régulation complexe de la quiescence 39
2.2.2. Une régulation active de la quiescence 41
2.2.3. Une régulation spécifique de la quiescence 41
2.2.4. Potentielles applications de ces connaissances sur la régulation de la quiescence 42
2.3. La quiescence, moyen de protection contre différents stress ? 42
3. Le vieillissement au sein du système hématopoïétique 43
3.1. Définitions 43
3.2. L'augmentation du nombre de CSH, une caractéristique bien documentée du vieillissement 43
3.3. Un potentiel de différenciation tourné vers le lignage myéloïde, modèle de sélection clonale ? 44
4. La gestion des dommages à l'ADN 46
4.1. L'accumulation de dommages à l'ADN physiologiques : une atteinte spécifique des cellules souches au cours du temps 46
4.1.1. Prendre en compte le temps qui passe -1- : les mécanismes de réparation de l'ADN sont essentiels dans les cellules souches 46
4.1.1.1. Des modèles de souris déficientes pour des mécanismes de réparation de l'ADN 47
4.1.1.2. L'anémie de Fanconi : 47
4.1.1.3. Conclusion 48
4.1.2. Prendre en compte le temps qui passe -2- : le complexe télomérase, gardien du maintien des télomères dans les cellules souches 48
4.1.2.1. Le maintien des télomères participe à l'intégrité du génome 48
4.1.2.2. Des modèles de souris pour l'étude du rôle de la télomérase dans les CSH 49
4.1.2.3. Des maladies liées à des défauts de l'activité télomérase 49

4.2. Une gestion des dommages à l'ADN spécifique dans les cellules souches suite à des stress aigus 50
4.2.1. La survie régulée des cellules souches ... 50
4.2.2. La différenciation, comme réponse aux dommages à l'ADN ... 51
4.2.3. Des réponses des cellules souches contribuant à la physiologie du tissu ... 52
5. L'oxygène et les CSH : adaptation à l'environnement hypoxique et gestion du stress oxydatif ... 53
5.1. Les ROS et le stress oxydant ... 53
5.2. L'environnement hypoxique des CSH ... 54
5.2.1. Localisation des CSH au sein de la niche hypoxique ... 54
5.2.2. Les CSH adaptent leur métabolisme à leur environnement hypoxique : le rôle clé de *Hif-1α* 54
5.2.3. Rôle de l'hypoxie dans la régulation des CSH ... 55
5.3. Régulation des ROS -1- : les effets néfastes de ROS sur la fonction des CSH ... 56
5.3.1. Une protection efficace dans les CSH pour maintenir un niveau faible de ROS ... 56
5.3.2. Contrôle de la quiescence par les ROS ... 57
5.3.2.1. Rôle d'ATM, et de la voie ATM-BID dans la régulation de la quiescence des CSH, via le contrôle des ROS ... 58
5.3.2.2. La voie PI3K/Akt, régulateur de la quiescence des CSH, par le contrôle des ROS ... 58
5.3.3. L'auto-renouvellement des CSH est associé avec un niveau bas de ROS ... 59
5.3.4. Les ROS peuvent induire un état de sénescence ... 60
5.3.5. D'où viennent les ROS et que font les ROS ? Aspects moléculaires de ces modèles associés à un fort niveau de ROS… ... 61
5.3.5.1. La machinerie mitochondriale, responsable de la production de ROS ... 61
5.3.5.2. Des modes d'action des ROS peu connus ... 61
5.4. Régulation des ROS -2- : le rôle physiologique des ROS pour les CSH ... 62
5.5. Conclusion : Maintien d'un niveau critique de ROS dans les CSH, ni trop fort, ni trop faible ... 62

Partie 2 : Un rôle régulateur pour la biogenèse des ribosomes ... 64

1. Régulation coordonnée du cycle cellulaire et de la biogenèse des ribosomes ... 65
1.1. Couplage entre les ribosomes et la régulation du cycle cellulaire ... 65
1.1.1. Contrôles réciproques de la biogenèse des ribosomes et du cycle cellulaire ... 65
1.1.2. *Arf* : rôle dans la régulation du cycle cellulaire et de la biogenèse des ribosomes ... 66
1.1.3. Le stress ribosomique : induction d'un arrêt du cycle suite à des défauts de biogenèse des ribosomes ... 67
1.1.3.1. Des défauts de biogenèse des ribosomes induisent un arrêt du cycle et une apoptose dépendants de p53 ... 67
1.1.3.2. La voie RP-Mdm2-p53, contrôle de la biogenèse des ribosomes ... 67
1.1.3.3. Des voies de réponses au stress ribosomique indépendantes de p53 ? ... 68
1.1.3.4. Des phénotypes variés suite à l'activation d'une voie de réponse au stress ribosomique 69
1.1.3.5. Conclusion : Surveillance coordonnée de la biogenèse des ribosomes et du cycle cellulaire par les RP ... 69
1.2. Couplage entre les ribosomes et la régulation de la croissance ... 69

1.2.1. Régulation de l'ARN Polymérase I en fonction des conditions de croissance 69
1.2.2. La voie mTOR, acteur majeur de la régulation de la croissance 70
1.2.2.1. TORC1 : régulation de la biogenèse des ribosomes à plusieurs niveaux 70
1.2.2.2. Le ribosome et TORC2 : des collaborateurs pour la croissance 71
1.3. Les ribosomes, à la croisée de la croissance et de la prolifération 72
2. L'hétérogénéité des ribosomes, au service d'une hétérogénéité fonctionnelle 73
2.1. Introduction : un filtre ribosomique ? 73
2.2. La séquence de l'ARNr : peu de données chez les mammifères 73
2.3. Des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr importantes pour la traduction des ARNm initiée par les IRES 74
2.4. Des modifications post-traductionnelles des RP 74
2.5. Des facteurs associés au ribosome peuvent modifier son activité 75
2.6. L'expression non homogène des RP: une source d'hétérogénéité à l'échelle de l'organisme 75
2.6.1. Des spécificités de l'expression des protéines ribosomiques paralogues chez les mammifères 75
2.6.2. Un exemple chez la plante : des ribosomes différents en fonction du stade de différenciation ? 76
2.6.3. Quelques données sur le profil d'expression des protéines ribosomiques 77
2.7. Conclusion : une hétérogénéité, pour un programme traductionnel défini ? 77
3. Rôles régulateurs des ribosomes au sein d'un organisme pluricellulaire en situation normale et pathologique 78
3.1. En situation normale 78
3.1.1. Rôles régulateurs des ribosomes au cours du développement 78
3.1.1.1. Rôle des ribosomes au cours du développement chez plusieurs espèces 78
3.1.1.2. Rôle de RPL38 au cours du développement : un nouveau régulateur des gènes Hox 78
3.1.2. Rôles régulateurs des ribosomes dans les cellules souches ? 79
3.1.2.1. Importance particulière de protéines nucléolaires et de la biogenèse des ribosomes dans le maintien des cellules ES murines ? 79
3.1.2.2. Les cellules souches chez la drosophile : des besoins quantitatifs ou qualitatifs de biogenèse des ribosomes ? 80
3.1.2.3. Des expressions spécifiques des acteurs de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches ? 81
3.2. En situation pathologique 82
3.2.1. Les ribosomopathies : des syndromes liés à des défauts de biogenèse des ribosomes 82
3.2.1.1. Les ribosomopathies, de l'hétérogénéité génétique à l'hétérogénéité clinique 82
3.2.1.2. Pourquoi une telle spécificité du lignage hématopoïétique et particulièrement érythroïde dans les ribosomopathies ? 82
3.2.2. Des relations complexes entre les ribosomes et les cancers 85
3.2.2.1. Un niveau élevé de ribosomes et de biogenèse des ribosomes associé à la tumorigenèse et au maintien des cellules cancéreuses 85

3.2.2.2. Un lien causal entre l'augmentation de la biogenèse des ribosomes et le développement de cancers ? 85
3.2.2.3. Une haploinsuffisance de facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes est aussi associée à des cancers 86
3.2.2.4. Des pistes d'explication : des défauts d'activation de p53 87
4. Conclusion 88

OBJECTIFS DE LA THESE 89

RESULTATS 91
1. Préambule : *Notchless* (*Nle*), de la voie Notch à la biogenèse des ribosomes 92
1.1. *Nle*, un régulateur de la voie Notch chez la drosophile 92
1.2. Chez la souris, *Nle* régule la survie des cellules pluripotentes de l'embryon indépendamment de la voie Notch 92
1.3. *Nle*, un acteur essentiel de la biogenèse des ribosomes chez la levure 93
1.4. *NLE* et *WDR12*, deux acteurs de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique 94
1.5. Un rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes dans d'autres espèces ? Coup d'œil chez la plante 94
1.6. Un rôle de *Nle* dans la tumorigenèse ? des données chez l'homme et le nématode 95
1.7. Les modèles d'étude de *Nle* disponibles au laboratoire 95
2. Des défauts d'export de la sous-unité pré-ribosomique 60S suite à la délétion de *Nle* dans les cellules ES 97
2.1. Visualisation d'une RP par immunofluorescence 98
2.2. Transfection d'une protéine de fusion RPL29-GFP 99
2.3. Marquage des ARNr par FISH 100
2.4. Quantification de l'accumulation de la grande sous-unité pré-ribosomique 101
3. Profil de la biogenèse des ribosomes dans la moelle osseuse : développement d'une technique de FISH couplée à des marquages des cellules hématopoïétiques 104
4. Toxicité de la recombinase Cre dans la lignage hématopoïétique : choix du contrôle 107
5. Article : une voie de biogenèse des ribosomes dépendante de *Nle*, spécifiquement requise pour le maintien des CSH 110

DISCUSSION GENERALE 112
1. Comment les CSH déficientes pour *Nle* disparaissent-elles ? 113
2. Des cellules qui semblent non affectées par la délétion de *Nle* 115
3. Des relations particulières entre cellules souches et ribosomes ? 118
4. Conclusion 120

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 121

Listes des figures et des tableaux

Figure 1. Modèle hiérarchique simplifié du système hématopoïétique
Figure 2. Combinatoires de marqueurs permettant une définition phénotypique des CSH et des différents stades de progéniteurs chez l'homme et chez la souris
Figure 3. Détermination de la fraction « Side Population » au sein des cellules hématopoïétiques
Figure 4. Les CSH distribuent aléatoirement leurs chromosomes lors des divisions
Figure 5. Comparaison entre le potentiel de cellule souche et le comportement réel *in vivo*
Figure 6. Les CSH quiescentes sont associées avec la niche endostéale
Figure 7. Les CSH sont associées avec les cellules endothéliales de la sinusoïde dans la moelle osseuse
Figure 8. Deux niches pour les CSH pour deux environnements fonctionnels
Figure 9. Cohabitation de multiples types cellulaires au sein de la niche des CSH
Figure 10. Communications entre les CSH et leur niche
Figure 11. Les CSH sont majoritairement quiescentes
Figure 12. Modèle conventionnel à une population de CSH *versus* modèle à deux populations
Figure 13. Modèle de la hiérarchie des cellules hématopoïétiques immatures selon leur auto-renouvellement
Figure 14. Identification de différentes sous-populations de CSH en fonction de leur potentiel de différenciation
Figure 15. Bilan des hétérogénéités observées au sein des CSH
Figure 16. Recherche d'une signature moléculaire des cellules souches
Figure 17. Principe de la thérapie génique pour le traitement de l'immunodéficience sévère liée à l'X
Figure 18. Différents mécanismes de défense et potentielles réponses au stress dans les CSH
Figure 19. Fonctions multiples de p53 dans les CSH, en situation d'homéostasie et en situation de stress
Figure 20. Rôles indépendants de *p53* dans la réponse au stress, la régulation de la quiescence et de l'auto-renouvellement des CSH
Figure 21. L'irradiation promeut la lymphomagenèse liée au génotype $p53^{-/-}$
Figure 22. Fonction des inhibiteurs des kinases dépendantes du cycle
Figure 23. La sortie de quiescence induit la perte de l'auto-renouvellement des CSH
Figure 24. Régulation de l'entrée en cycle des CSH
Figure 25. p21, intégrateur de signalisations régulant la quiescence des CSH
Figure 26. Modèle du vieillissement du système hématopoïétique
Figure 27. Deux modèles pour expliquer le biais de différenciation au cours du vieillissement
Figure 28. Accumulation de dommages dans les CSH avec l'âge
Figure 29. Voies de réparation des cassures double brin au cours du cycle cellulaire

Figure 30. Comparaison des réponses des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques chez l'homme et chez la souris
Figure 31. Modèle de différenciation des CSH en réponse à une irradiation
Figure 32. Modèle de différenciation des cellules souches mélanocytaires suite à un stress génotoxique
Figure 33. Impact des dommages à l'ADN sur les cellules souches, et implication dans les processus de vieillissement et de tumorigenèse
Figure 34. Les espèces dérivées de l'oxygène
Figure 35. Les CSH quiescentes sont localisées dans la niche endostéale hypoxique
Figure 36. Rôle de HIF-1a dans la réponse métabolique de la cellule à l'hypoxie
Figure 37. Modèle du rôle de l'hypoxie dans la régulation de l'autophagie mitochondriale
Figure 38. Localisation subcellulaire de FoxO3a par immunofluorescence
Figure 39. Rôle de la voie ATM-BID dans le maintien de la quiescence des CSH
Figure 40. Rôle de la voie PI3K/Akt dans la régulation de la quiescence des CSH
Figure 41. Modèle proposé pour la fonction des facteurs FoxO dans le maintien de l'intégrité des CSH
Figure 42. Modèle de l'activation des ROS par p53 au cours de l'hématopoïèse post-natale
Figure 43. Proposition d'un mode d'action des ROS dans la régulation des CSH
Figure 44. L'activation de c-Met permet la mobilisation des CSH grâce à l'induction de ROS
Figure 45. Pléiotropie contradictoire des ROS
Figure 46. Modèle d'assemblage des ribosomes
Figure 47. Régulation de l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I au cours du cycle cellulaire
Figure 48. NPM et ARF contrôlent la croissance cellulaire et la prolifération par la régulation réciproque de leur stabilité et/ou activité
Figure 49. La délétion des membres du complexe PeBoW induit un arrêt du cycle dépendant de p53
Figure 50. Représentation schématique de la voie RP-Mdm2-p53 activée par un stress ribosomique
Figure 51. Rôles clés de RPL11 dans la régulation du cycle cellulaire
Figure 52. Régulation de la transcription par l'ARN Polymérase I en réponse à des facteurs extrinsèques
Figure 53. Contrôle de la biogenèse des ribosomes par TORC1
Figure 54. Régulation de TORC2 par l'association avec le ribosome
Figure 55. Contrôle coordonné de la croissance cellulaire et de la prolifération
Figure 56. Génération de ribosomes de stress et réponse spécifique suite à un stress chez la bactérie *E.coli*
Figure 57. Hétérogénéité dans la composition des ribosomes chez A.Thaliana au cours du développement
Figure 58. Profil d'expression des protéines ribosomiques dans l'embryon de souris
Figure 59. RPL38 régule la traduction de certains gènes Hox au cours du développement

Figure 60. Modèle proposé pour le contrôle de l'expression génique au cours de l'embryogenèse
Figure 61. Wicked est ségrégée asymétriquement au cours de la mitose des cellules souches germinales
Figure 62. Modèle de ségrégation de Wicked au cours des divisions des cellules souches germinales et neurales
Figure 63. Défauts de biogenèse des ribosomes dans les ribosomopathies
Figure 64. Contrôle de la transcription par l'ARN Polymérase I par des oncogènes et des suppresseurs de tumeur
Figure 65. Exemples d'interactions génétiques entre Notch et Notchless chez la drosophile
Figure 66. Nle est nécessaire pour la survie des cellules de la masse cellulaire interne au cours du développement péri-implantatoire
Figure 67. Nle/Rsa4 interagit avec l'ATPase Rea1 au sein de la particule pré-ribosomique 60S chez la levure
Figure 68. Modèles d'étude de Nle utilisés dans le laboratoire
Figure 69. Défauts d'export observés en immunofluorescence
Figure 70. Approche par transfection de visualisation de défauts d'export
Figure 71. Marquage de FISH sur des cellules ES
Figure 72. Quantification de l'accumulation de its2 dans les cellules ES déficientes pour Nle
Figure 73. Localisations relatives des sondes et amorces utilisées pour détecter la séquence its2
Figure 74. FISH sur différentes populations hématopoïétiques
Figure 75. Comparaison des profils de FISH sur des cellules Lin- avec 2 sondes its2 et la sonde its1
Figure 76. Toxicité de la recombinase Cre dans le système hématopoïétique
Figure 77. Toxicité du pIpC dans la moelle osseuse
Figure 78. Approche expérimentale pour générer les souris d'intérêt

Tableau 1. Résumé des données concernant les efficacités de reconstitutions par une seule cellule du système hématopoïétique d'un animal irradié
Tableau 2. Liste des gènes cibles qui participent à la réponse induite par p53
Tableau 3. Régulateurs de la quiescence des CSH
Tableau 4. Ribosomopathies : détails des gènes mutés, des caractéristiques cliniques et des risques de cancer
Tableau 5. Augmentation de l'expression des protéines ribosomiques dans des cancers humains

Liste des abréviations utilisées dans ce manuscrit

4-OHT : 4-Hydroxy-Tamoxifène

BSO : L-Butathionine-sulfoximine

CAR : CXCL12 Abundant Reticular

Cellules ES : Cellules Souches Embryonnaires

CLP : Common Lymphoid Progenitor

CMP : Common Myéloid Progenitor

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSMa : Cellules Souches Mammaires

iPS : induced Pluripotent Stem

LSK : cellules Lin^- $Sca\text{-}1^+$ $c\text{-}Kit^+$

MPP : Multipotent Progenitor

Nle : Notchless

NAC : N-acetyl-L-cysteine

NPM : Nucléophosmine

PFA : Paraformaldéhyde

ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène

RP : Protéine Ribosomique

RT-qPCR : Reverse Transcription, quantitative Polymerase Chain Reaction

Introduction

Partie 1 : Les cellules souches hématopoïétiques

I. Les Cellules Souches Hématopoïétiques -CSH-, modèle d'étude privilégié

Tout au long de cette première partie, je souhaite apporter quelques éléments sur les connaissances actuelles des cellules souches, dans le système hématopoïétique. Quelques parallèles avec d'autres types de cellules souches pourront aider à saisir l'ampleur des notions abordées. Je m'intéresserai principalement à la souris.

La recherche sur les CSH a été une recherche pionnière dans le domaine de la biologie des cellules souches, autant par la découverte des concepts même de cellules souches et de niche, que par la mise au point de caractérisations phénotypiques et de tests fonctionnels. L'exemple des CSH permet également aujourd'hui d'aborder les notions d'hétérogénéité au sein de la population de cellules souches.

Comme je vais essayer de le montrer, les CSH sont un véritable modèle d'étude, à l'échelle de ma thèse bien sûr, mais également à l'échelle de la biologie des cellules souches. C'est de ce modèle dont je vais principalement m'inspirer pour tenter de proposer une définition de la cellule souche.

1. Introduction : l'hématopoïèse et les CSH

1.1. Des CSH fortement sollicitées

Chez l'homme, le système hématopoïétique assure la formation d'environ 10^6 cellules par seconde. Étonnamment, comme nous allons le voir plus en détails plus tard, les CSH sont majoritairement quiescentes. La confrontation entre les exigences incroyablement fortes du système hématopoïétique et l'inactivité des CSH peut paraître assez énigmatique. Pourtant, cet apparent paradoxe semble être résolu par une organisation hiérarchique du système.

1.2. Un système hiérarchique

Le système hématopoïétique contient plus de dix types de cellules matures, parmi lesquelles des érythrocytes, des plaquettes et mégacaryocytes, des cellules myéloïdes (monocyte/macrophage et granulocytes), des mastocystes, des lymphocytes B et T, des cellules NK –Natural Killer- et des cellules dendritiques. Qu'une si grande diversité de cellules soit générée par la population de CSH est intrigant, et souligne le formidable potentiel de différenciation des CSH. Afin de comprendre

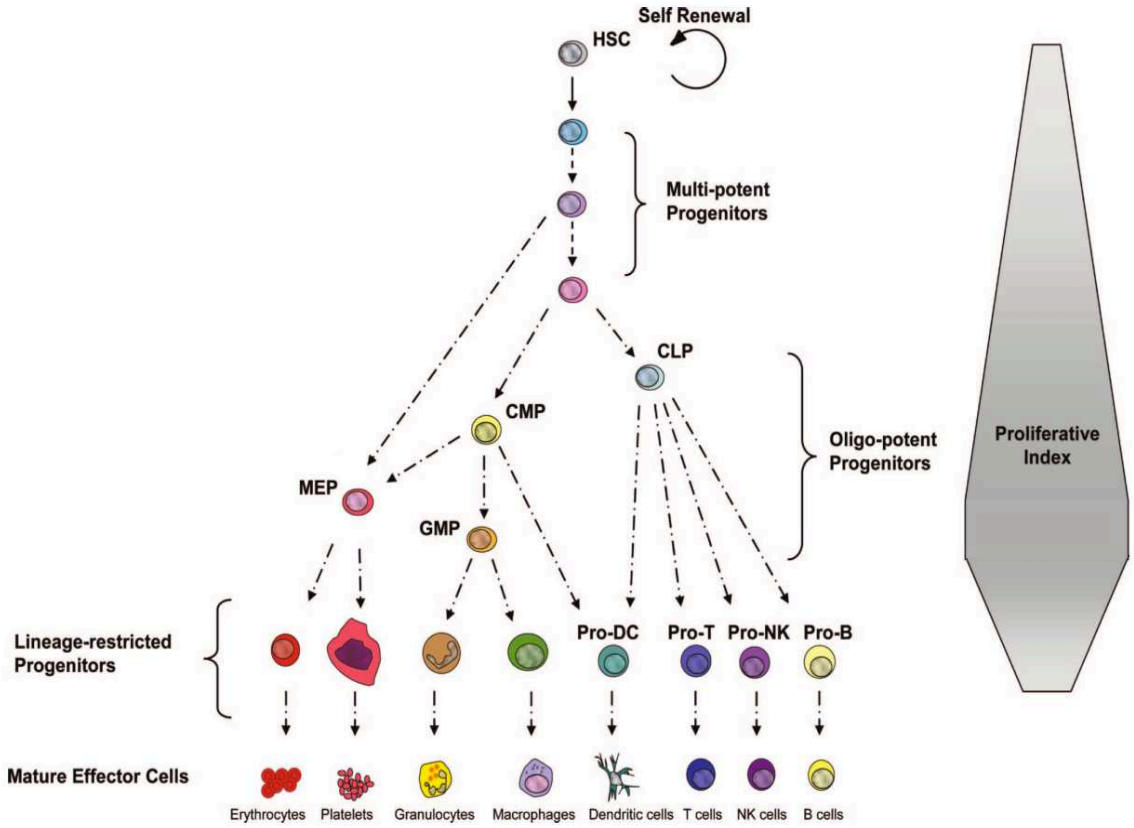


Figure 1. Modèle hiérarchique simplifié du système hématopoïétique

Les CSH, capables de s'auto-renouveler, résident au sommet de la hiérarchie du système. Elles peuvent générer des progéniteurs multipotents, eux-mêmes capables de produire les progéniteurs oligopotents, parmi lesquels les CLP –Common Lymphoid Progenitors- donnent naissance aux lymphocytes B et T et aux cellules NK. Les CMP –Common Myeloid Progenitors- donnent naissance aux progéniteurs des granulocytes et macrophages –GMP- qui se différencient en monocytes/macrophages et en granulocytes, et aux progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes –MEP- qui se différencient en mégacaryocytes/ plaquettes et en érythrocytes. Les CLP et les CMP peuvent donner naissance aux cellules dendritiques ; les lignages des mégacaryocytes et des érythrocytes pourraient être générés également directement à partir d'un progéniteur multipotent, sans passer par le stade CMP. Le processus de différenciation est généralement associé avec une augmentation de la capacité de prolifération, même si cette tendance n'est pas toujours vérifiée, ou n'a pas été élucidée pour tous les stades de différenciation.

d'après Bryder et al., 2006

comment les CSH se différenciaient pour générer toutes ces cellules matures, de nombreuses équipes ont patiemment identifié et isolé différentes populations, et testé leur potentiel de différenciation (pour revue, voir (Seita and Weissman, 2010)). L'ensemble de ces travaux nous offre aujourd'hui le modèle d'un système hématopoïétique complexe et fortement hiérarchisé (Figure 1). La présence de deux lignages, à savoir le lignage lymphoïde et le lignage myéloïde, générés respectivement par les progéniteurs communs lymphoïdes et myéloïdes (CLP et CMP), est caractéristique du système hématopoïétique. Des étapes plus précises du processus de différenciation sont présentées sur la Figure 1.

1.3. Quelques remarques

Les progéniteurs ont des capacités de prolifération énormes, suggérant que le contrôle homéostatique doit avoir lieu non seulement au niveau des CSH, mais également au niveau des progéniteurs. L'importance de l'équilibre entre les CSH, les progéniteurs et les cellules différenciées est soulignée par de nombreux exemples où une homéostasie aberrante du système peut mener à des maladies. Les défauts de différenciation ou l'acquisition anormale de capacités de prolifération par certaines cellules peuvent participer respectivement à des immunodéficiences ou à des cancers.

Il est largement postulé que le processus de différenciation est un processus irréversible. Pourtant, des interrogations sur le potentiel de différenciation de certaines populations ou sur les relations entre plusieurs sous-populations persistent. Des études récentes sur les CSH ont mis en évidence une hétérogénéité au sein de la population de CSH (*cf.* Partie 1 : I.5). Notamment, les travaux d'A.Trumpp suggèrent que les CSH peuvent passer de façon réversible d'une situation dormante à une situation activée, suggérant l'existence d'une certaine réversibilité de ces mécanismes. Nous y reviendrons plus précisément dans la suite de ce manuscrit, je souhaite cependant simplement souligner ici que le schéma proposé en Figure 1 est une vue simplifiée du système. Une hétérogénéité au sein de chaque population est très certainement attendue, et la vision de la différenciation comme celle d'un continuum d'états serait peut-être plus pertinente que celle de la juxtaposition d'un nombre fini d'états discrets. Savoir si chaque étape au cours de la différenciation est irréversible est difficile à appréhender expérimentalement ; en adoptant une vision plus globale du système, l'hypothèse d'une certaine plasticité au cours de la différenciation peut être intéressante.

De façon surprenante, les cellules dendritiques peuvent être générées à partir des progéniteurs myéloïdes CMP ou à partir des progéniteurs lymphoïdes CLP (Manz et al., 2001). De plus, il est proposé que les progéniteurs des mégacaryocytes et des érythrocytes puissent être générés soit à partir des CMP soit directement à partir des progéniteurs multipotents, sans passer par le stade CMP (Figure 1). Ces exemples soulignent la complexité du système et proposent l'existence d'une éventuelle plasticité au cours de la différenciation, propriété qui pourrait permettre au système de s'adapter rapidement aux besoins physiologiques.

La recherche sur les CSH a été stimulée par ce défi qui est de comprendre comment les CSH assurent à la fois leur maintien et la production de milliards de cellules chaque jour. La suite de cette partie va donner quelques informations sur l'identification et les définitions possibles des CSH.

2. Petite histoire de la naissance du concept de cellule souche et de l'identification des CSH

2.1. La naissance du concept de cellule souche

C'est au sein du système hématopoïétique que le concept de « cellule souche » a vu le jour. Till et McCulloch ont réalisé des expériences pionnières dans le domaine de la régénération du système hématopoïétique *in vivo* dans les années 1960 (Till and McCulloch, 1961). Dix jours après l'injection de cellules de moelle osseuse, ils observent la formation de colonies cellulaires dans la rate des animaux hôtes. L'étude de ces colonies révèle qu'une petite proportion de cellules de la moelle osseuse possède deux propriétés remarquables : la capacité de générer plusieurs types de cellules hématopoïétiques, et la capacité de s'auto-renouveler. Ces expériences ont ainsi introduit les deux propriétés clés des cellules souches, à savoir la possibilité de générer l'ensemble des cellules du tissu et de s'auto-renouveler.

En 1988, pour la première fois, Spangrude et al. isolent une population enrichie en CSH. Le développement de la technologie de cytométrie de flux, et l'apparition d'anticorps monoclonaux permettent d'isoler la population Lin^{-} $Sca\text{-}1^{+}$ $Thy\text{-}1^{low}$, qui représente à peu près 0,05% de la population de la moelle osseuse adulte (Spangrude et al., 1988). En montrant que certaines de ces cellules, à l'exclusion de toute autre, sont capables de recoloniser le système hématopoïétique d'un hôte irradié, ils valident le concept de cellule souche et ouvrent la voie à l'ère de la caractérisation phénotypique des CSH.

2.2. Les deux propriétés des cellules souches : le potentiel de différenciation et l'auto-renouvellement

Une des caractéristiques des CSH est leur potentiel de différenciation. Les CSH sont à l'origine de toutes les cellules du système hématopoïétique, qui participent à l'oxygénation des tissus, aux réponses immunitaires, et à la coagulation. Les CSH sont dites « multipotentes » : elles peuvent générer plus d'une dizaine de types cellulaires, parmi lesquels les cellules du sang, les lymphocytes B, T, les cellules NK, les cellules myéloïdes, et les cellules dendritiques. Plusieurs sous-populations ont été identifiées au sein des cellules dendritiques, des lymphocytes ou des granuclocytes, soulignant la complexité et l'ampleur de la différenciation des CSH.

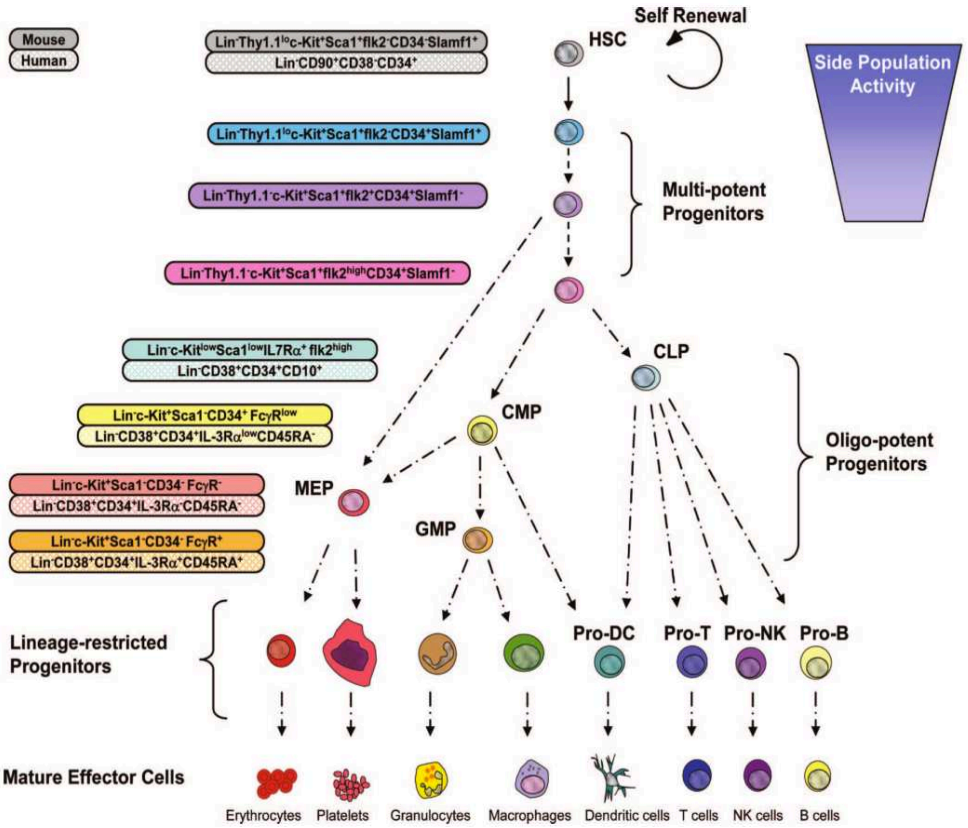


Figure 2. Combinatoires de marqueurs permettant une définition phénotypique des CSH et des progéniteurs chez l'homme et chez la souris

L'expression de marqueurs de surface chez la souris et chez l'homme est indiquée à gauche de chaque population. Seules les CSH peuvent s'auto-renouveler, et l'activité de « Side Population » est restreinte aux CSH et aux progéniteurs immédiats. Notons que certains marqueurs comme Thy1.1 ou Sca-1 sont informatifs pour certaines mais pas toutes les lignées de souris. Les analyses phénotypiques sont plus avancées chez la souris que chez l'homme. Notamment les sous-populations de progéniteurs multipotents ont été bien caractérisés fonctionnellement chez la souris, ce qui n'est pas le cas chez l'homme. Remarquons enfin que certains marqueurs diffèrent entre l'homme et la souris : par exemple que les CSH murines n'expriment pas le marqueur CD34, alors que les CSH humaines sont positives pour le CD34.

d'après Bryder et al., 2006

Une cellule souche doit être capable de se maintenir tout au long de la vie de l'individu, et d'assurer l'homéostasie et la régénération du tissu en cas de stress : il s'agit de la propriété d'auto-renouvellement. Des études ayant trait au vieillissement suggèrent que l'auto-renouvellement pourrait être limité, et affecté notamment au cours de la vie de l'individu par l'accumulation de dommages à l'ADN ou de dommages cellulaires et par la détérioration des télomères. Ces notions seront abordées dans le paragraphe Partie 1 : II.4.

On parle souvent d'un équilibre critique entre l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules souches. Un déséquilibre dans un sens ou dans l'autre aboutit à des défauts du maintien du tissu, suite à une déplétion de la population souche ou à des défauts de génération des cellules différenciées.

3. Identification des CSH : caractéristiques phénotypiques et tests fonctionnels

3.1. Identification phénotypique des CSH

3.1.1. Marquages membranaires et cytométrie de flux

L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs de surface et les avancées technologiques de la cytométrie de flux ont révolutionné le domaine et permis l'identification de combinatoires de marqueurs exprimés par les CSH. Par exemple, les cellules négatives pour les marqueurs de lignage, et exprimant les marqueurs c-Kit et Sca-1 sont regroupées sous l'appellation LSK pour Lin^- $Sca\text{-}1^+$ $c\text{-}Kit^+$. Les LSK regroupent des cellules multipotentes, il s'agit d'une population enrichie en CSH. Au sein des LSK, 21% des LSK $CD34^-$ ou 47% des LSK $CD150^+$ $CD48^-$ ont une forte activité de cellule souche (Osawa et al., 1996; Kiel et al., 2005). Ainsi, on considère qu'environ une cellule sur deux au sein de la population LSK $CD34^-$ $CD150^+$ $CD48^-$ est une CSH *bona fide*. De nouveaux marqueurs ont été proposés d'après des analyses transcriptomiques et validés comme marqueurs de CSH ces dernières années : les CSH sont également $CD49b^-$ et $EPCR^+$ (Benveniste et al., 2010; Kent et al., 2009). De même, des combinatoires de marqueurs ont été identifiées pour les progéniteurs, et l'on peut s'attendre à une définition phénotypique encore plus précise des CSH et des stades de différenciation des cellules hématopoïétiques au cours des prochaines années (Figure 2).

Ces marqueurs sont couramment utilisés, bien que les voies moléculaires et les rôles de nombre de ces marqueurs soient peu ou pas connus. Il est par ailleurs envisageable que l'expression de certains de ces marqueurs à la surface des CSH soit modifiée dans certaines situations. L'exemple du marqueur *c-Kit* est éloquent. Suite à un stress myélotoxique ou à une déplétion de la moelle induite par la délétion des gènes *c-Myc* et *N-Myc*, les CSH régulent fortement négativement l'expression de *c-Kit* (Randall and Weissman, 1997; Laurenti et al., 2008). Pourtant, ces cellules peuvent conserver des

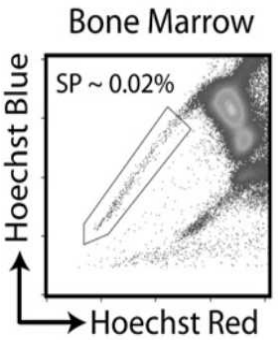


Figure 3. Détermination de la fraction « Side Population » au sein des cellules hématopoïétiques

d'après Challen et al., 2010

propriétés de cellules souches et rétablir l'expression de c-Kit après le retour à l'homéostasie (Randall and Weissman, 1997). La diminution de l'expression du marqueur c-Kit peut aussi corréler avec une diminution de l'auto-renouvellement, comme cela a été observé dans le cas de la délétion de *Gfi1* ou de *Notchless* (Hock et al., 2004a) (*cf.* article). Ces observations soulignent l'importance d'utiliser des tests fonctionnels, et pas seulement des caractéristiques phénotypiques, pour appréhender la présence et les propriétés des CSH.

3.1.2. Propriété de « Side Population »

Une autre approche pour identifier et purifier les CSH est d'utiliser leur propriété d'exclusion de certains marqueurs comme le Hoechst 33342 ou la Rhodamine 123 (Goodell et al., 1996). Sur un profil de facs, cette population se détache comme une « Side Population » d'où l'appellation SP (Figure 3).

Les cellules de la population SP cyclent peu, et des tests fonctionnels ont montré un fort enrichissement en CSH (Goodell et al., 1996). De plus, il a été montré que la propriété d'exclusion de ces marqueurs est rendue possible par l'expression de transporteurs dépendants de l'ATP, comme *Mdr1* ou *Bcrp1* (Challen and Little, 2006). Il est intéressant de noter que cette propriété permet d'éviter l'accumulation de composés toxiques et donc de protéger les CSH.

3.1.3. Des CSH quiescentes et capables de retenir un marquage de l'ADN

La quiescence est une propriété très intéressante des CSH à laquelle nous nous intéresserons plus tard (*cf.* Partie 1 : II.2). Du fait de leur faible fréquence de divisions, les CSH sont capables de retenir des marquages de l'ADN type BrdU ou de la chromatine, comme l'H2B-Gfp. Combinée à l'identification de marqueurs de surface, cette propriété de LRC –pour Label Retaining Cell- peut être utile et semble être pour l'instant la seule façon d'identifier les CSH dormantes, comme nous le verrons plus loin.

Il faut noter cependant ici que la propriété de LRC peut avoir une explication autre que la quiescence : il s'agit de l'hypothèse du brin immortel selon laquelle la cellule souche protègerait l'intégrité de son génome en gardant les mêmes brins d'ADN tout au long de sa vie. Par des divisions asymétriques, la cellule ségrégerait l'ADN nouvellement synthétisé, et éviterait ainsi l'accumulation de *de novo* mutations. Un exemple supportant cette hypothèse dans les cellules satellites du muscle squelettique a été publié récemment. L'équipe de S.Tajbakhsh propose l'existence de deux sous-populations de cellules satellites, basée sur l'expression du marqueur *Pax7* (Rocheteau et al., 2012). Par des élégantes approches de double marquage et de visualisation individuelle des chromatides couplées à de l'hybridation *in situ*, les auteurs montrent que les cellules satellites $Pax7^{High}$, contrairement aux cellules $Pax7^{Low}$, ségrégent leur ADN, que toutes les chromatides sont ségrégées asymétriquement, et que la cellule fille maintenant le brin parental d'ADN exprime les marqueurs de cellule souche et en garde les propriétés.

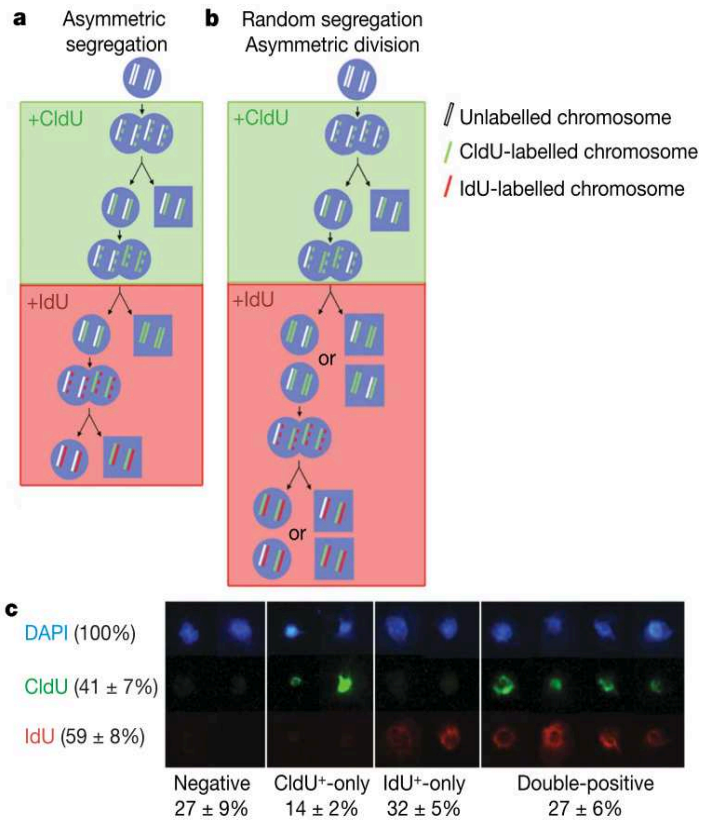


Figure 4. Les CSH distribuent aléatoirement leurs chromosomes lors des divisions

a-b. Modèle d'incorporation du CIdU et de l'IdU lors des divisions des CSH. **a**. Selon l'hypothèse du brin immortel, les CSH exposées successivement au CIdU puis à l'IdU n'incorporeront pas les deux marquages, à l'exception des rares cellules en S/G2/M lors du changement CIdU-IdU. **b**. Par contre, si la ségrégation des chromosomes est aléatoire, les CSH marquées au CIdU auront la même probabilité d'incorporer de l'IdU que les CSH non marquées. **c**. Après incorporation de CIdU puis d'IdU, il est possible d'observer des CSH non marquées, des CSH ayant incorporé l'un des deux marquages ou des CSH ayant incorporé les deux marquages, contredisant les prédictions de l'hypothèse du brin immortel.

d'après Kiel et al., 2007

Study no.	Phenotype of transferred cell	Frequency of reconstitution (%)
1	LSK, $CD150^{+}CD48^{-}$	47
2	$CD41^{-}CD150^{+}CD48^{-}$	45
3	LSK, SP^{lo}, $Thy1.1^{lo}$, $CD34^{-}$, $CD135^{-}$	35
4	Lin^{neg}, SP, Rho^{lo}	33
5	LSK, $CD34^{lo/-}$	22
6	$CD150^{+}CD48^{-}$	21
7	LSK, $Thy1.1^{lo}$	18

Tableau 1. Résumé des données concernant les efficacités de reconstitution par une seule cellule du système hématopoïétique d'un animal irradié.

SP^{low} : extrémité de la population SP sur le profil facs ; Rho : Rhodamine

d'après Wilson et al., 2007

Dans le système hématopoïétique, des expériences d'incorporations successives de deux marquages de l'ADN, l'utilisation de modèles mathématiques et le suivi de quelques divisions *ex vivo* ont suggéré que les CSH ne ségrégent pas leur ADN, *i.e.* que les brins d'ADN sont aléatoirement distribués lors des divisions des cellules souches (Figure 4) (Kiel et al., 2007a). Cependant, cette étude n'exclut pas que les CSH pourraient ségréger asymétriquement un nombre limité de chromosomes, ou qu'à l'image des cellules $Pax7^{High}$ du muscle squelettique, une sous-population de CSH serait capable de ségréger son ADN.

3.2. Identification fonctionnelle des CSH

Les caractéristiques présentées ci-dessus sont utiles pour identifier et isoler les CSH. Cependant, ces caractéristiques phénotypiques n'ont pu être validées qu'en testant les CSH. En effet, les tests fonctionnels restent le moyen le plus pertinent de vérifier la présence et la fréquence des CSH. De nombreuses expériences ont été proposées pour tester différents aspects des propriétés des CSH, je souhaite ici en présenter quelques-unes rapidement.

3.2.1. Cultures *ex vivo*

Les tests CFC ou CFU –pour Colony-Forming Cell ou Colony-Forming Unit- aident à appréhender la présence de progéniteurs de différentes natures parmi les cellules testées. Les conditions de culture à faible densité, dans un milieu semi-solide, en présence de cytokines, permettent la formation de colonies à partir des progéniteurs. Le LTC-IC –pour Long-Term Culture Initiating Cell- permet d'évaluer la présence de CSH, capables de produire une progénie myéloïde sur du long terme (au moins 4 semaines) (pour la présentation des tests détaillée, voir (Miller et al., 2008)).

3.2.2. La greffe, le test fonctionnel par excellence

Une cellule hématopoïétique peut être considérée comme CSH lorsqu'elle est capable de contribuer au système hématopoïétique d'un hôte irradié sur du long terme. Dans le domaine des cellules souches, ce test a été consacré comme le test fonctionnel par excellence. En effet, il permet d'évaluer les deux critères définissant une cellule souche, à savoir l'auto-renouvellement et le potentiel de différenciation dans tous les lignages du tissu. Le développement de cette approche de greffe a été favorisé par les propriétés des CSH. En effet, facilement extraites de leur environnement, les CSH peuvent aussi facilement être injectées dans le sang circulant d'un nouvel individu. Elles peuvent alors survivre, rejoindre et intégrer la niche de l'individu hôte, et maintenir leurs propriétés de cellules souches. Cette flexibilité reflète sans doute le comportement migratoire des CSH à l'homéostasie : elles quittent fréquemment la niche pour la circulation, avant d'y revenir. La réalisation de greffes d'une cellule unique a notamment permis de consolider le concept de cellule souche et de valider certains marqueurs de CSH (Tableau 1) (Osawa et al., 1996; Wagers et al., 2002).

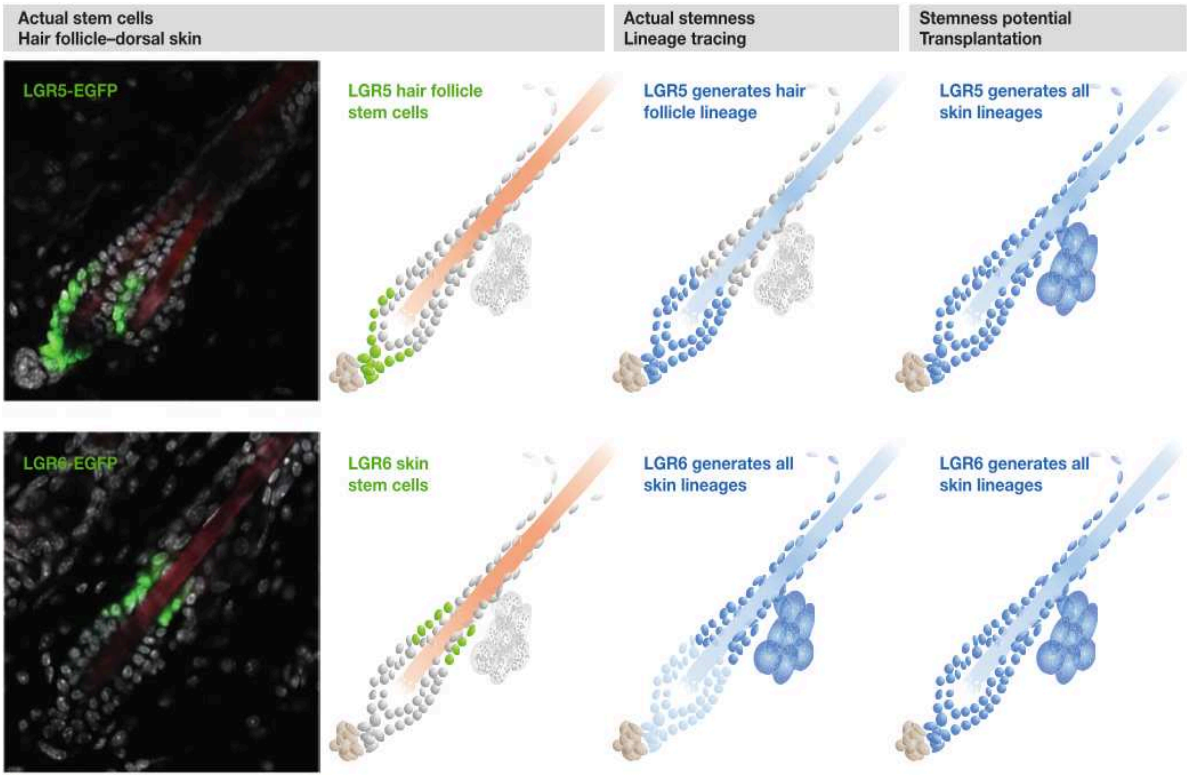


Figure 5. Comparaison entre le potentiel de cellule souche et le comportement réel *in vivo*

LGR5 et LGR6 marquent des populations de cellules souches le long du follicule pileux. Les cellules souches (en vert) et le follicule pileux (en rouge) sont présentés sur des images confocales et sur les schémas à gauche. Des analyses de lignage cellulaire révèlent le potentiel de différenciation de ces cellules. A l'homéostasie, les cellules souches LGR5 génèrent une progénie au sein du follicule pileux (en bleu), alors que les cellules souches LGR6 génèrent principalement des cellules de la glande sébacée et de l'épiderme interfolliculaire (en bleu), et dans une moindre mesure, des cellules du follicule pileux (en bleu clair). Suite à des expériences de transplantations, les deux populations sont capables de générer les trois lignages présentés (en bleu, schémas à droite).

d'après Snippert et al., 2010

D'un point de vue expérimental, les critères généralement acceptés lors d'une expérience de greffe pour définir une CSH sont les suivants : lorsqu'elle est injectée dans un receveur irradié, une CSH est capable de produire une progénie lymphoïde et myéloïde à plus de 1% du sang circulant de l'hôte, sur une période de 16 semaines après la transplantation. Cette définition permet à la fois de garder des durées d'expérimentations raisonnables et de distinguer les CSH dites à « court-terme » (ST-CSH), et les CSH dites à « long-terme » (LT-CSH), capables respectivement de recoloniser la moelle sur quelques semaines ou sur plus de 16 semaines. L'efficacité de la reconstitution peut être suivie dans le sang circulant de l'animal, en prenant en compte les temps de demi-vie des populations différenciées. En effet, les cellules lymphoïdes peuvent persister pendant plusieurs mois ; leur présence à un temps t n'atteste donc pas de la présence de progéniteurs en amont fonctionnels. Ainsi, le suivi des cellules myéloïdes est plus pertinent (Benveniste et al., 2010).

Au cours d'une greffe, les cellules à tester peuvent être injectées seules ou en présence de cellules compétitrices afin d'évaluer le potentiel de recolonisation de ces cellules de façon absolue, ou relativement à d'autres cellules, respectivement. La greffe compétitive peut permettre également de maintenir l'homéostasie du système, grâce à l'injection de cellules compétitrices sauvages. Les transplantations en conditions limites aident à évaluer le nombre de CSH, grâce à des modélisations mathématiques. Enfin, les transplantations en série permettent de tester l'auto-renouvellement des CSH en situations de stress sur du long-terme.

3.2.3. Entre le potentiel testé des CSH et leur comportement *in vivo* : plasticité des cellules souches ?

Les tests fonctionnels présentés ci-dessus et utilisés en routine dans le domaine permettent d'évaluer les propriétés des cellules dans des conditions bien particulières de stress, que ce soit pour la culture *ex vivo* ou pour les transplantations. Ces tests sont puissants car ils vérifient fonctionnellement les deux propriétés des CSH, à savoir l'auto-renouvellement et le potentiel de différenciation. Cependant, il faut garder à l'esprit que les cellules testées ne sont pas dans leur environnement homéostatique. Plusieurs exemples révèlent effectivement des différences entre le comportement *in vivo* et le potentiel testé de certaines cellules. Des expériences de transplantations de cellules du bulbe du follicule pileux illustrent ce point. Lorsqu'elles sont transplantées, les cellules exprimant la kératine1-15 sont capables de participer à la formation des trois lignages de la peau : le follicule pileux, la glande sébacée et l'épiderme interfolliculaire. Pourtant, en conditions homéostatiques, ces cellules génèrent principalement le follicule pileux (Morris et al., 2004). L'identification de nouveaux marqueurs au sein des cellules du bulge ont confirmé ces résultats (Figure 5) (pour revue, voir (Snippert and Clevers, 2011)). Il est alors important de distinguer le potentiel de cellule souche et le comportement de cellule souche, en conditions homéostatiques et en conditions de stress physiologique.

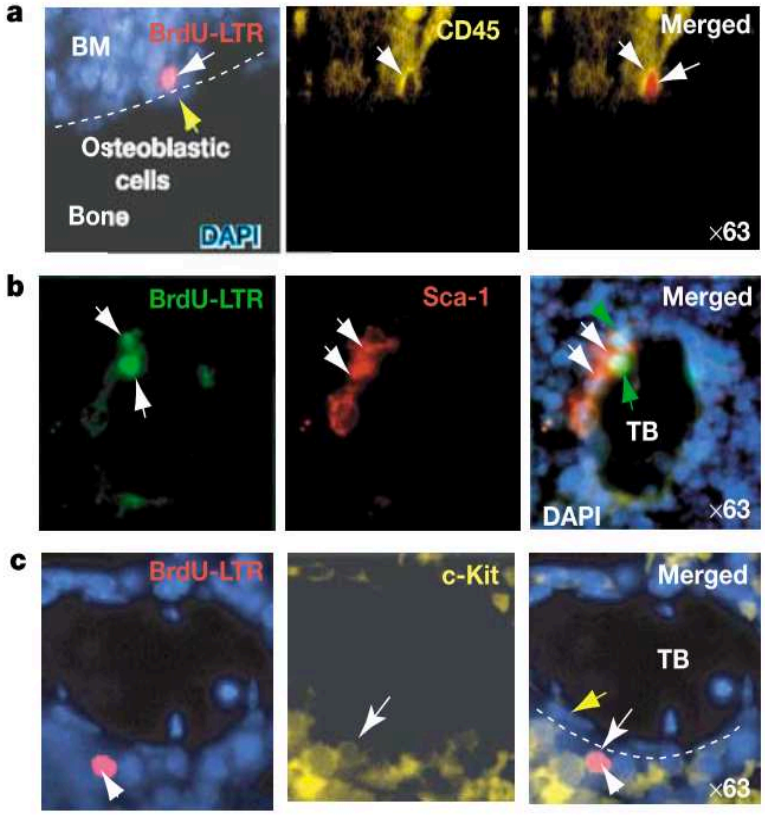


Figure 6. Les CSH quiescentes sont associées avec la niche endostéale

Les cellules retenant le marquage au BrdU (notées BrdU-LTR, pour Long-term Retaining, indiquées par une flèche blanche) sont positives pour le marqueur hématopoïétique CD45 (**a**, à 92%), et pour des marqueurs de CSH Sca-1(**b**, à 74%) et c-Kit (**c**, à 72%). Les flèches jaunes indiquent les ostéoblastes, positifs pour la N-cadhérine. La plupart des cellules positives pour le BrdU sont localisées à la surface de l'os. TB : trabecular bone.

d'après Zhang et al., 2003

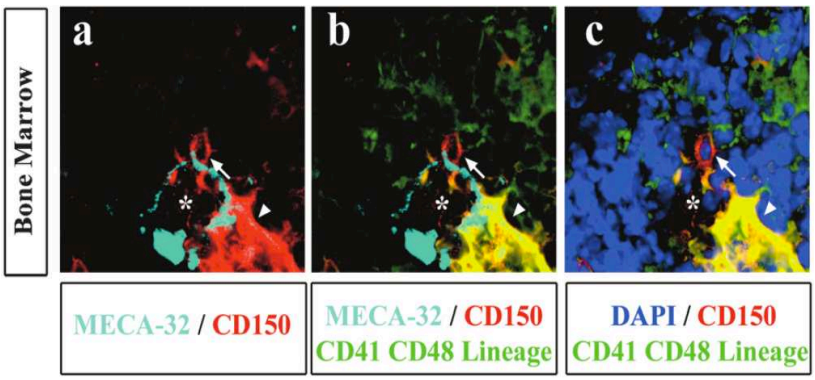


Figure 7. Les CSH sont associées avec les cellules endothéliales de la sinusoïde dans la moelle osseuse

Dans une moelle osseuse, les cellules CD150+ CD48- CD41- Lin- représentent 0,0067% +/- 0,0016% des cellules sur les sections observées. Certaines sont associées avec l'endosteum (non montré) mais la plupart sont en contact avec l'endothelium de la sinusoïde (flèche). Un large mégacaryocyte est associé également avec la sinusoïde (tête de flèche). Le marqueur MECA-32 permet d'identifier toutes les cellules endothéliales, le DAPI marque les noyaux.

d'après Kiel et al., 2005

4. L'environnement des CSH : la niche

4.1. Petite histoire de la naissance du concept de niche

Le concept de « niche », définie comme un micro-environnement organisé qui contrôle l'homéostasie des CSH, a été proposé par Schofield il y a plus de 30 ans (Schofield, 1978). Ce concept a été adopté suite à l'étude de deux lignées de souris mutantes W et Sl. Ces souris présentent un phénotype similaire, à savoir des défauts du maintien de l'homéostasie hématopoïétique (pour revue, voir (Seita and Weissman, 2010)). Les premières expériences de transplantation de moelle osseuse ont révélé l'existence d'effets extrinsèques aux cellules hématopoïétiques, suggérant la présence d'éléments environnementaux nécessaires au maintien des CSH. Pendant longtemps, la structure et la localisation de cet environnement, ainsi que les bases moléculaires et cellulaires de l'activité de la niche sont restées complètement obscures. Ce n'est que dans les années 1990 que la voie de signalisation moléculaire sous-tendant les phénotypes des souris W et Sl a été identifiée : le gène critique codé dans le locus W code pour le récepteur à tyrosine kinase c-Kit, et son ligand SCF –pour Stem Cell Factor- est codé par le locus Sl.

Suite à l'apparition du concept de niche, des études chez les invertébrés, et notamment chez la drosophile ou le ver c.elegans, ont apporté des premières données moléculaires et cellulaires sur le fonctionnement de la niche. Plus récemment chez les mammifères, la niche hématopoïétique a commencée à être caractérisée. Quelles sont les cellules requises pour le fonctionnement du micro-environnement ? Quelle est la nature des relations entre les CSH et la niche ? Comment ces signaux contrôlent le maintien des CSH ? Autant de questions abordées depuis une dizaine d'années, et suscitant toujours autant d'intérêt.

4.2. Deux niches pour les CSH ?

4.2.1. La niche endostéale

Les premières approches pour tenter de localiser les CSH ont révélé que les cellules primitives capables de former des colonies *in vitro* étaient localisées à la surface de l'endosteum, tissu conjonctif qui tapisse la cavité médullaire des os (Lord et al., 1975). Des séries d'études *in vitro* ont révélé que les ostéoblastes, situés dans cette région, sécrétaient des cytokines, dont le G-CSF, GM-CSF, les interleukines IL-6, IL-1 et le TGF-β. Ces cytokines peuvent promouvoir l'expansion de progéniteurs myéloïdes en culture (Taichman et al., 1996). Par la suite, des analyses *in vivo* ont rapporté des interactions entre les CSH et les ostéoblastes. Des CSH quiescentes ont effectivement été visualisées au contact des ostéoblastes au sein de la niche endostéale (Figure 6) (Zhang et al., 2003; Wilson et al., 2008). Je ne m'attarderai pas ici à décrire l'ensemble des études attestant des relations entre les ostéoblastes et les CSH. Je soulignerai juste que certains résultats ont soulevé des questions qui

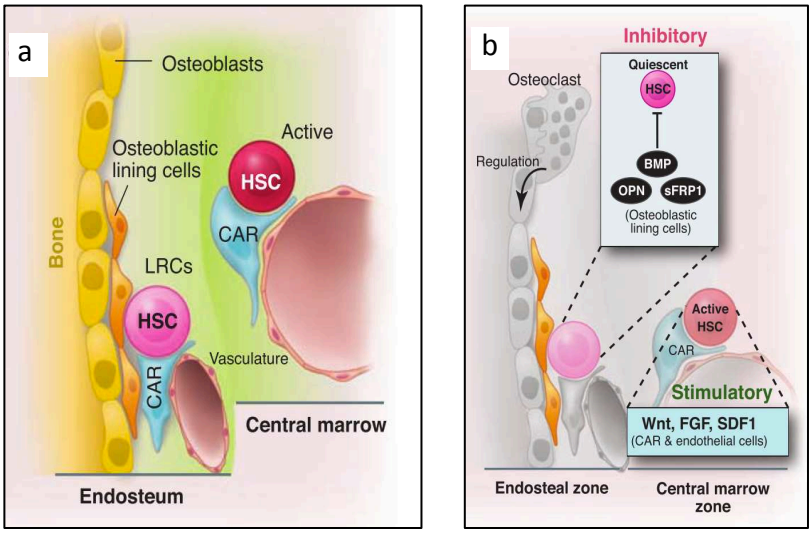


Figure 8. Deux niches pour les CSH pour deux environnements fonctionnels

a. Les CSH quiescentes sont localisées dans la région endostéale, alors que les CSH plus activées sont situées dans une région plus centrale de la moelle osseuse, autour de la sinusoïde et en l'absence d'ostéoblastes. **b**. Au sein de la niche endostéale, les voies de signalisation BMP, OPN et sFRP1 inhibent l'entrée en cycle des cellules. Au contraire, près de la sinusoïde, les cellules endothéliales, les mégacaryocytes et les cellules CAR sécrètent du Wnt, FGF et SDF1, permettant l'entrée en cycle des CSH.

d'après Li et Clevers, 2010

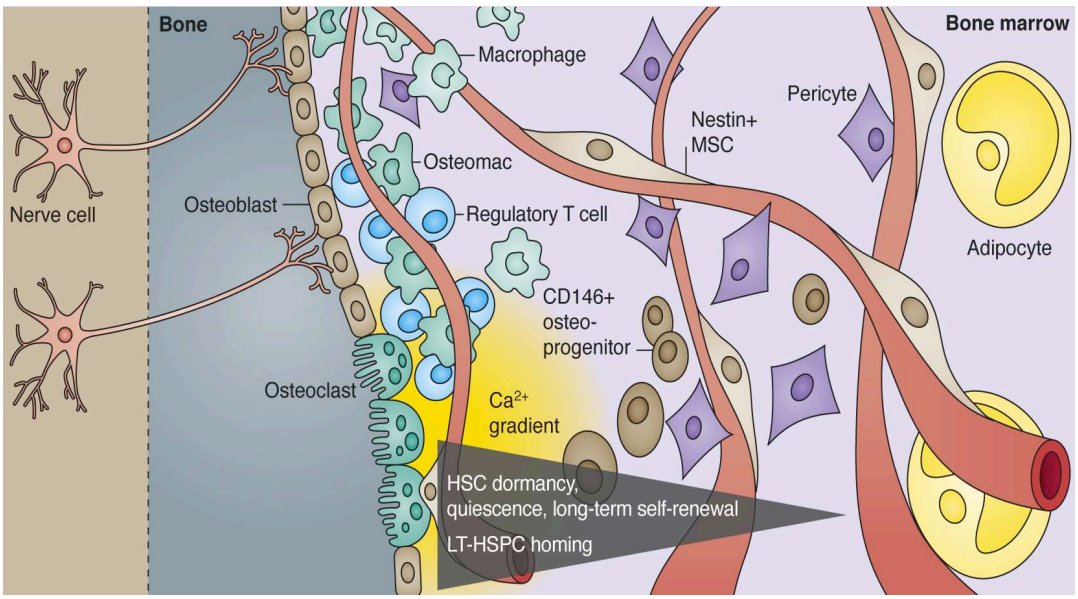


Figure 9. Cohabitation de multiples types cellulaires au sein de la niche des CSH

Le long de la surface endostéale, différentes populations d'ostéoblastes participent à la régulation des CSH. Les CSH interagissent avec les cellules souches mésenchymateuses positives pour la Nestine, avec les progéniteurs du lignage ostéoblastique (CD146+) et avec différents types d'ostéoblastes. Les ostéoclastes, macrophages responsables de la résorption de l'os, et les ostéomacs, autre population de macrophages, seraient également impliqués dans cette régulation. Les cellules lymphoïdes T régulatrices assurent le maintien d'un « privilège immun » au sein de la niche. Les adipocytes et le système nerveux autonome influencent la greffe et la mobilisation des CSH respectivement. Enfin, un gradient de Ca2+ est généré par les ostéaclastes et participe à la définition de la niche.

d'après Lo Celso et Scadden, 2011

persistent encore : Dans quelle mesure les ostéoblastes sont-ils nécessaires au maintien des CSH ? Y a-t-il des sous-populations d'ostéblastes avec des fonctions diverses ?

Au sein de la niche endostéale, divers types de cellules cohabitent. Il s'avère que plusieurs types cellulaires, dérivés de progéniteurs mésenchymateux, pourraient participer également au maintien des CSH, parmi lesquels les adipocytes, des macrophages ostéoclastes, et « osteomacs »…

4.2.2. La niche vasculaire

Le modèle de la niche endostéale a été remis en question en 2005 par le groupe de S.Morrison (Kiel et al., 2005). Grâce à l'identification des marqueurs Slam, cette équipe a pu utiliser des approches d'immunofluorescence pour localiser les CSH *in vivo* (Figure 7). De façon surprenante, la majorité des CSH a été trouvée associée à des cellules endothéliales au niveau des sinusoïdes, ces vaisseaux spécialisés avec de fines parois permettant le passage de cellules hématopoïétiques dans la circulation. Ainsi est née l'hypothèse de la niche vasculaire.

Cette hypothèse a été soutenue par des expériences *in vivo*, soulignant le rôle des cellules endothéliales dans le contrôle de l'hématopoïèse. Ainsi, la signalisation induite par le récepteur gp130, ou l'expression du ligand SCF dans les cellules endothéliales sont requis pour le maintien des propriétés des CSH (Yao et al., 2005; Ding et al., 2012). Sans rentrer dans les détails des modèles expérimentaux ou des voies de signalisation impliquées, ces exemples apportent des preuves du rôle important des cellules endothéliales dans l'environnement des CSH.

Une population de cellules réticulaires a été identifiée autour des sinusoïdes. Nommées cellules CAR, pour CXCL12 Abundant Reticular, elles sécrètent comme leur nom l'indique une grande quantité du facteur CXCL12 (ou SDF-1). En imageant ces cellules, Sugiyama et al. ont montré que presque toutes les CSH étaient localisées contre des cellules CAR (Sugiyama et al., 2006).

4.2.3. Deux, une ou plusieurs niches ?

Afin de réconcilier les données soutenant le rôle de la niche endostéale et le rôle des cellules endothéliales de la niche vasculaire, le modèle suivant a été proposé. La niche endostéale procure un environnement adapté pour les CSH quiescentes, maintenant leur auto-renouvellement grâce à la présence d'un certain nombre de cytokines et de molécules d'adhésion. Cette niche permet le maintien de conditions hypoxiques, qui comme nous le verrons plus loin, sont importantes pour l'homéostasie des CSH (*cf.* Partie 1 : II.5.2.3). La niche vasculaire, quant à elle, assure le maintien des CSH activées, en train de se diviser ou de participer à la régénération du tissu en fonction des besoins physiologiques (Figure 8).

Considérer la niche comme deux régions distinctes, pour ségréger les CSH quiescentes et les CSH qui vont se diviser est cependant peut-être un modèle un peu trop simplifié. L'hypothèse d'une seule niche au sein de laquelle deux compartiments s'organisent pourrait être envisagée. Les cellules de l'environnement proche des sinusoïdes et celles proches de l'endosteum communiqueraient entre

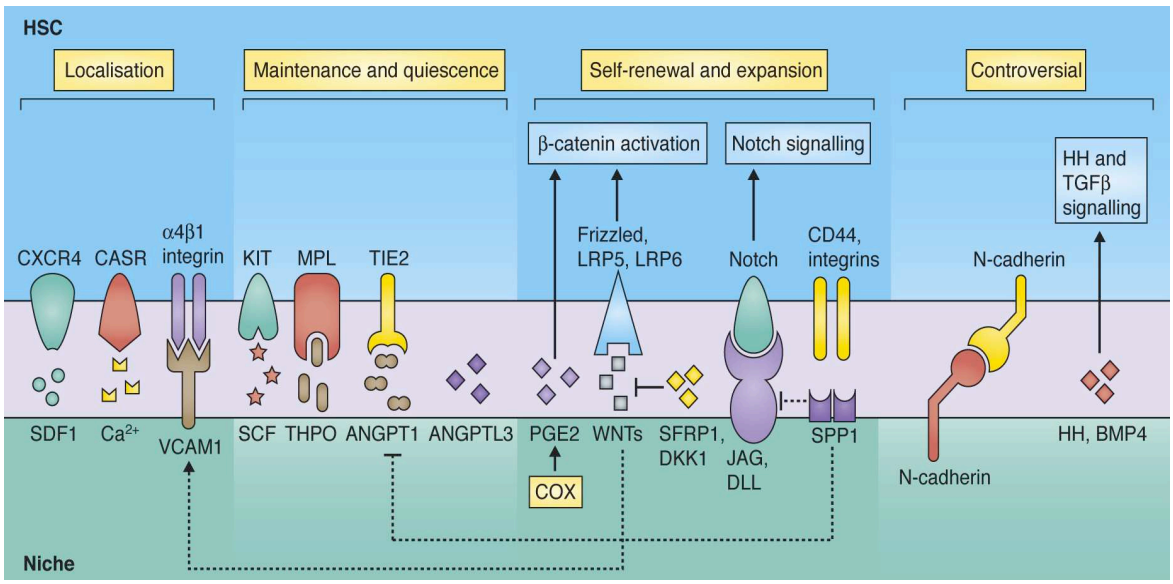


Figure 10. Communications entre les CSH et leur niche

De nombreux régulateurs moléculaires extrinsèques des CSH ont été décrits. Certains sont produits par les ostéoblastes, cependant, il est possible que plusieurs types cellulaires produisent plusieurs de ces facteurs. Des couples facteurs sécrétés/ligands régulent le maintien des CSH : le couple SDF1-CXCR4 contrôle la localisation des CSH, les couples SCF/c-Kit, THPO/MPL et ANGPT1/TIE2 régulent le maintien et la quiescence des CSH. Les molécules d'adhésion intégrines participent à la communication entre les CSH et leur niche : l'intégrine α4β1 permet la rétention des CSH dans la niche, les intégrines α1β1 et α5β1 interagissent avec SPP1, protéine extracellulaire sécrétée par les ostéoblastes. Des études récentes ont mis en évidence le rôle de plusieurs acteurs de la voie Wnt dans les interactions entre les CSH et leur niche. Les facteurs DKK1 et SFRP1, inhibiteurs de la voie Wnt sécrétés par les ostéoblastes, affectent l'auto-renouvellement des CSH. Le facteur sécrété PGE2 permet la stabilisation de la voie Wnt dans les CSH. Les études sur la voie Notch ont donné des résultats contradictoires. On sait que JAG1 est exprimé à la surface des cellules CD146+ de la niche chez l'homme, et l'expression des récepteurs Notch1 et Notch2 à la surface des CSH particpent à la réponse à des facteurs sécrétés par des cellules endothéliales. Le rôle des voies TGF-β et HH et des cadhérines est aujourd'hui controversé. Le facteur stromal BMP4 semble contribuer au maintien des CSH.

SDF1 : stroma-derived factor 1 ; CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4 ; SCF : stem cell factor ; THPO : thrombopoietin ; MPL : myeloproliferative leukemia virus oncogene ; ANGPT1 : angiopoietin 1 ; TIE2 : tyrosine kinase ; SPP1 : secreted phosphoprotein 1 ; DKK1 : dickkopf homolog 1 ; SFRP1 : secreted frizzled-related protein 1 ; PGE2 : prostaglandin E2 ; JAG1 : Jagged1 ; TGF-β : Transforming Growth Factor β ; HH : Hedgehog.

d'après Lo Celso et Scadden, 2011

elles, et un subtil équilibre de facteurs sécrétés et diffusés au sein de cette niche contrôlerait le comportement des CSH. Cette vision est suggérée par la présence de cellules CAR aux alentours des deux compartiments étudiés, à savoir l'endosteum et la sinusoïde. Plus encore, Kiel et al. indiquent que toutes les CSH, y compris celles situées le long de l'endosteum, se trouveraient dans une région proche de la sinusoïde, suggérant un rapprochement physique des deux régions étudiées (Kiel et al., 2007b). Les sinusoïdes assurent une circulation de sang veineux pauvre en oxygène, les régions aux alentours pourraient être relativement hypoxiques. Cependant, des analyses plus précises seront nécessaires pour connaître les concentrations en oxygène des CSH, en fonction de leur localisation.

Le nombre de types cellulaires connus impliqués dans le micro-environnement des CSH augmente au fur et à mesure des années de recherche dans le domaine (Figure 9). De plus, la population de CSH apparaît de plus en plus hétérogène. Ces deux éléments laissent entrevoir la complexité de l'environnement au sein duquel les CSH naviguent … De nouvelles niches, de nouvelles conditions de maintien des CSH et de nouvelles signalisations extrinsèques seront certainement identifiées ces prochaines années, et le modèle sera amené à évoluer.

4.3. Régulation par la niche

La niche permet de maintenir les CSH, on sait aujourd'hui qu'elle participe à la régulation du comportement des CSH, en situation d'homéostasie et en situation de stress. Il est intéressant de remarquer que des types de régulation très divers entrent en jeu dans la communication avec la niche. En effet, ont été mises en évidence des interactions entre des ligands sécrétés et des récepteurs à la surface des CSH, le rôle de certaines grandes voies de signalisations développementales, l'interaction avec la matrice extracellulaire, la présence de molécules d'adhésion, et des gradients chimiques, de calcium et d'oxygène. Une vue schématisée de la synapse CSH-niche est présentée Figure 10. Notons simplement que la niche participe à la régulation de la localisation, de la quiescence et de l'auto-renouvellement, et qu'elle contrôle le nombre de CSH, jouant ainsi un rôle essentiel pour le maintien des propriétés des CSH.

4.4. Conclusion : des progrès considérables et de nouvelles questions

De grands pas ont été réalisés depuis la proposition du concept et l'identification de la niche des CSH. Les analyses fonctionnelles chez la souris, et le développement des approches d'imagerie ont participé à la définition actuelle de la niche, avec un certain nombre de cellules et de signalisation associées. Cette recherche récente a levé le voile sur le rôle et la nature de la niche. Répondant à certaines de nos questions, elle en soulève aujourd'hui beaucoup de nouvelles. Combien de niches existe-t-il pour soutenir les CSH ? Quelles sont les relations entre les différentes niches ? Combien de CSH chaque niche contient-elle ? Quels sont les rôles de la/des niche(s) en situation d'homéostasie et

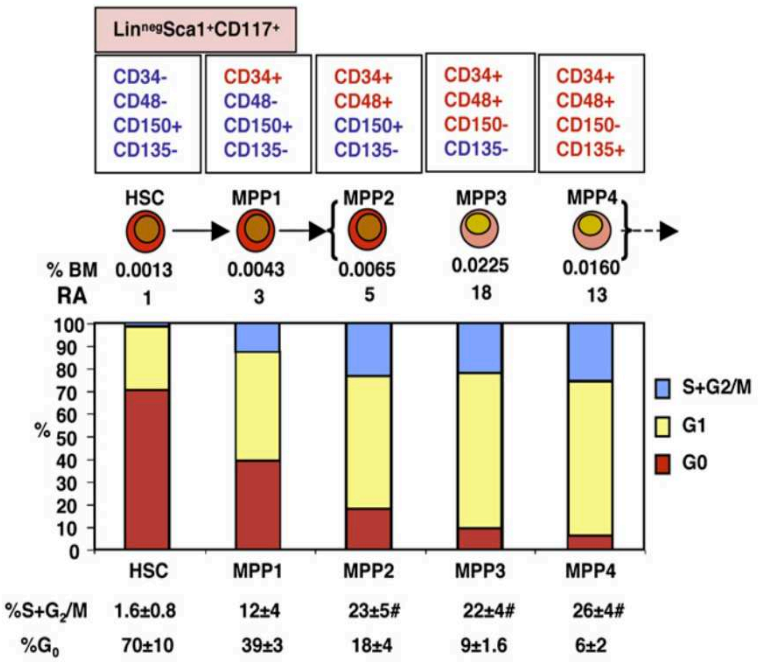


Figure 11. Les CSH sont majoritairement quiescentes

La population de LSK est subdivisée en 5 sous-populations pour cette étude. D'après les marqueurs de surface, l'abondance relative, le statut de cycle cellulaire, et le potentiel de recolonisation à long-terme des CSH, une hiérarchie a été proposée (les populations sont notées HSC puis MPP1, MPP2, MPP3 et MPP4). Les CSH sont les cellules LSK les plus quiescentes : 70% des cellules sont en G0 (Ki67- et contenu en ADN de 2N), et 1.6% en S/G2/M (Ki67+, contenu en ADN >2N).

d'après Wilson et al., 2008

en situation de stress ? Quelles cellules sécrètent quels facteurs ? Les signalisations extrinsèques induites par les différents types cellulaires sont-elles en partie redondantes ?

5. Hétérogénéité au sein de la population des CSH

Des données récentes suggèrent que la population de CSH est hétérogène. Plusieurs pistes de réflexion peuvent nous aider à appréhender cette idée. L'hétérogénéité au sein d'une population peut être due à une hétérogénéité intrinsèque, corrélée avec des propriétés prédéterminées et héritées au cours de transplantations. Par ailleurs, une hétérogénéité stochastique peut être à l'origine de comportements différents de la cellule en fonction de son état à un moment donné. Enfin, les études récentes sur la/les niche(s) des CSH suggèrent que la localisation des CSH pourrait participer à des propriétés distinctes, suggérant que des expositions variables à des facteurs extrinsèques pourraient être sources d'hétérogénéité.

Au cours de cette partie, je vais aborder trois types d'hétérogénéités décrites dans la littérature, à savoir des différences dans la propriété de quiescence, dans la propriété d'auto-renouvellement, et dans le potentiel de différenciation. Les analyses à l'échelle d'une cellule mises en place aujourd'hui pourront apporter des données sur d'éventuelles hétérogénéités moléculaires et fonctionnelles qui ne seront pas développées ici.

5.1. Une hétérogénéité dans la quiescence des CSH

La nature même de cellule souche fait que l'apparition de mutations peut avoir des conséquences dramatiques pour l'ensemble de l'organisme. La réplication représente un risque majeur de lésions à l'ADN, pouvant aboutir à des mutations. Ainsi, il est généralement admis que la quiescence peut être un moyen de protection, notamment contre les stress liés à la réplication. Dans le système hématopoïétique effectivement, les CSH sont majoritairement quiescentes : environ 70% des CSH sont en G0 (Figure 11) (Passegué et al., 2005; Wilson et al., 2008; Cheshier et al., 1999).

Des expériences suivant l'incorporation au BrdU ont d'abord mis en défaut l'existence de CSH qui ne se diviseraient pas sur quelques mois (Cheshier et al., 1999; Kiel et al., 2007a). Le modèle proposé serait un pool de CSH homogènes, qui se divisent rarement mais régulièrement, avec une entrée en cycle chaque jour de 6-8% des CSH (Figure 12.a). Par la suite, deux équipes ont modélisé finement la dilution de marquages au sein des CSH (LSK $CD34^-$ $CD150^+$ $CD48^-$) (Wilson et al., 2008; van der Wath et al., 2009; Foudi et al., 2009). Ils aboutissent à un résultat différent et proposent un modèle à deux populations de CSH : entre 55 et 80% seraient des CSH dites « primed » en anglais, que je traduirai ici par « en éveil ». Ces CSH sont majoritairement quiescentes, mais elles se divisent une fois tous les 28-36 jours. Les 20 à 45% des CSH restantes seront dites « dormantes ». Avec une

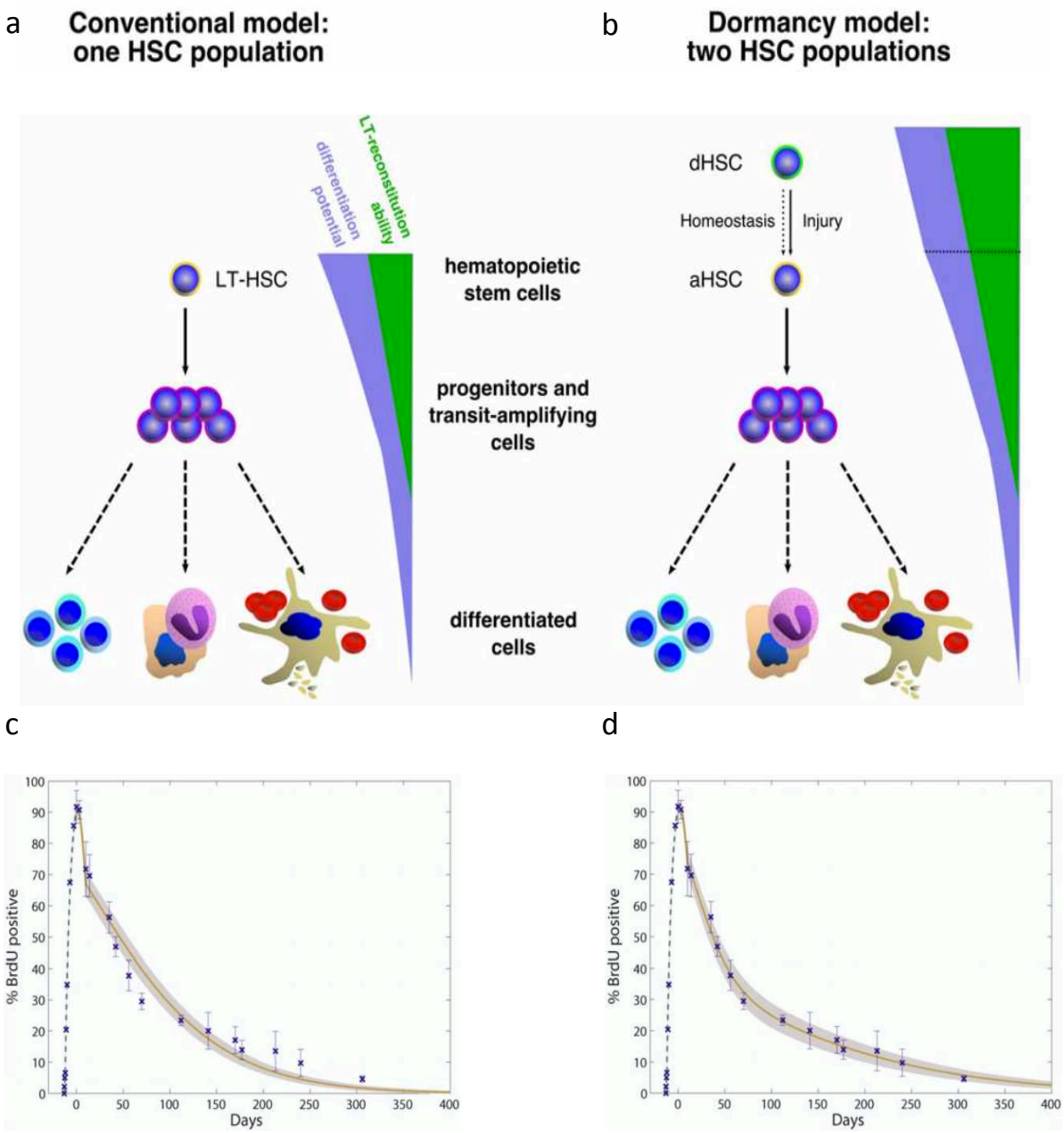


Figure 12. Modèle conventionnel à une population de CSH *versus* modèle à deux populations

Au sein de la population de CSH, deux modèles peuvent être proposés. **a**. Le modèle « conventionnel » propose que la population de CSH est une population homogène se divisant peu fréquemment mais régulièrement. **b**. Le modèle à deux populations propose l'existence d'une population de CSH dormantes. Les CSH en éveil (aHSC) assurent le maintien de l'homéostasie, et les CSH dormantes (dHSC) ne se divisent que quelques fois au cours de la vie de la souris (flèche en pointillé), elles peuvent être activées et participer à la régénération suite à des déplétions (flèche pleine). **c-d**. Modèle prédisant la perte du marquage BrdU. Les valeurs expérimentales sont indiquées en bleu, la partie ombrée représente la variance estimée par le modèle suite à des simulations stochastiques. **c**. Le graphe indique les prédictions pour une population de CSH homogènes. **d**. Le graphe indique les prédictions pour deux populations avec des fréquences de divisions différentes. Les paramètres du modèle choisi sont les suivants : la population dormante représente 40% des CSH, le BrdU n'est plus détecté après 6-7 divisions.

d'après Van der Wath et al., 2009

proportion plus importante encore de cellules en G0, ces cellules se divisent une fois tous les 149-193 jours soit 4-5 fois au cours de la vie de la souris (Figure 12.b). Des modélisations similaires sont obtenues lorsque le marquage suivi est le BrdU (Figure 12.c-d) (Wilson et al., 2008; van der Wath et al., 2009) ou l'H2B-GFP (Wilson et al., 2008; Foudi et al., 2009). Les CSH dormantes ainsi identifiées sont localisées prioritairement dans la niche endostéale (Wilson et al., 2008). Par des expériences fonctionnelles de transplantations successives, les deux équipes, indépendamment, ont montré que les CSH dormantes présentent un potentiel d'auto-renouvellement plus important que les CSH en éveil : la CSH *bona fide* serait donc la CSH dormante. Pour conclure, le pool de CSH pourrait s'organiser ainsi : en conditions d'homéostasie, la très faible activité des CSH dormantes et l'activité un peu plus soutenue des CSH en éveil sont suffisantes pour maintenir le renouvellement du tissu. En cas de stress (lésion, infection) ou de traitements expérimentaux (5-FU, BrdU, interféron), les CSH dormantes peuvent être massivement sollicitées (Wilson et al., 2008; Sato et al., 2009; Essers et al., 2009). Après le retour à l'homéostasie, elles peuvent revenir à un état de « dormance ». En fonction des besoins du système hématopoïétique, les CSH peuvent donc passer de façon réversible d'un état dormant à un état d'éveil.

Le modèle généralement admis propose donc l'existence de deux populations distinctes avec des propriétés de prolifération différentes. Au sein du pool de CSH, la distribution serait donc bimodale, et non pas continue entre l'état dormant et l'état d'éveil. Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que les CSH en éveil expriment plus de 100 fois plus d'ARNm CD34 que les CSH dormantes, alors qu'elles restent $CD34^-$ phénotypiquement (Wilson et al., 2008). Ce résultat peut être interprété comme une préparation transcriptionnelle des CSH en éveil à se différencier en progéniteurs plus engagés, et illustre la notion de cellules « primed » en anglais, *i.e.* de cellules préparant leur engagement vers la différenciation. Ceci suggère cette fois que le passage d'une CSH en éveil à un progéniteur $CD34^+$ pourrait plus s'apparenter à un continuum d'états qu'à une situation bimodale.

5.2. Un auto-renouvellement variable pour les CSH ?

L'équipe de N.Iscove a analysé l'hétérogénéité au sein du pool de CSH en s'intéressant à leur potentiel d'auto-renouvellement (Benveniste et al., 2010). Par des expériences de transplantations en dilution limite, ils s'assurent de greffer une CSH unique par hôte. S'ils observent bien que certaines CSH donnent naissance à une progénie se maintenant sur plus de 32 semaines, ils trouvent aussi que d'autres s'épuisent beaucoup plus vite. Ils mettent ainsi en évidence l'existence d'une population de CSH dite à « terme-intermédiaire » IT-CSH, dont l'auto-renouvellement est, comme son nom l'indique, intermédiaire entre celui des ST-CSH et LT-CSH (Figure 13) : la progénie myéloïde des IT-CSH est présente à 16 semaines, mais disparaît entre 16 et 32 semaines. La capacité d'isoler ces cellules en utilisant la combinatoire de marqueurs Lin^- $Sca\text{-}1^+$ $c\text{-}Kit^+$ $Rho123^{low}$ $CD49b^{high}$ démontre

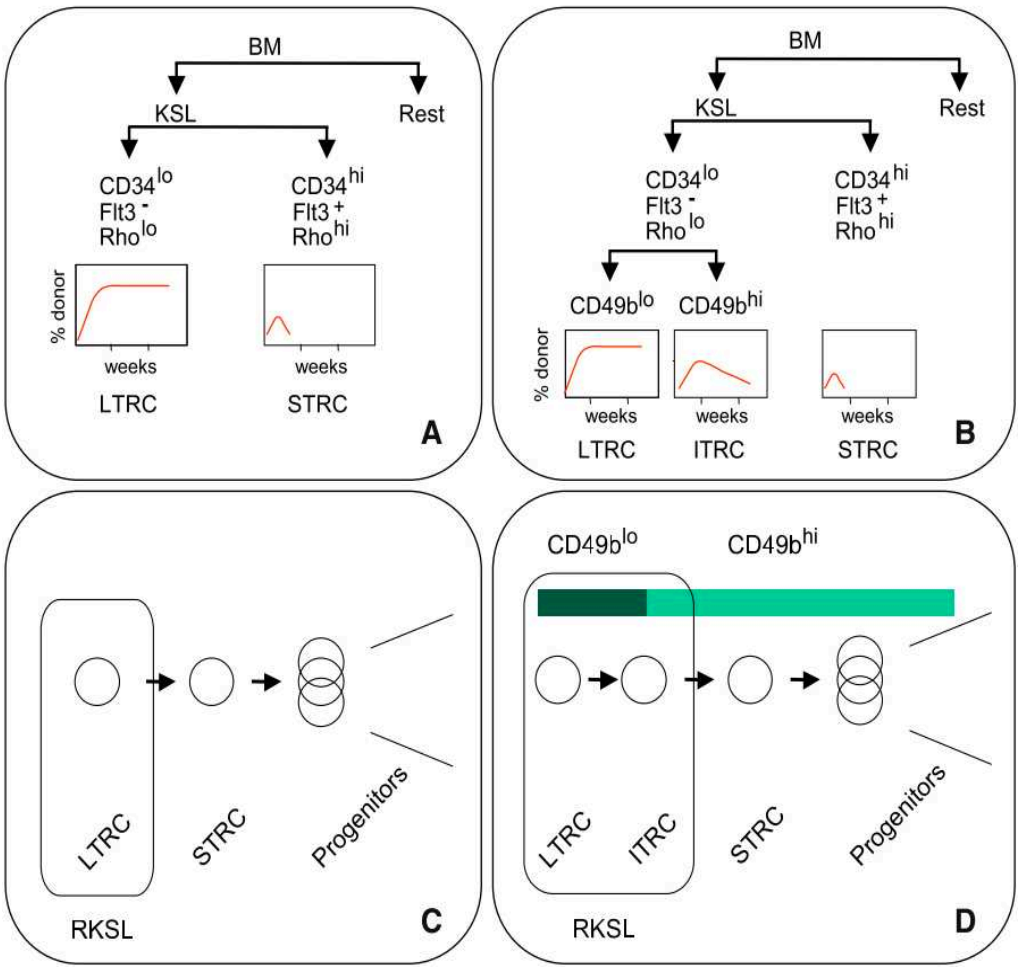


Figure 13. Modèle de la hiérarchie des cellules hématopoïétiques immatures selon leur auto-renouvellement

Comme illustré sur les figures **A** et **C** (schéma de purification et vue hiérarchique respectivement), le modèle classique propose la séparation des cellules LSK entre des LT-CSH et des ST-CSH, basée sur l'expression des marqueurs CD34 et Flt3, et sur les propriétés d'exclusion de la Rhodamine 123. L'étude de Benveniste et al. propose une subdivision de la population de LT-CSH par l'existence d'une population de CSH dites « intermédiaires » IT-CSH (**B** et **C**, pour le schéma de purification et la vue hiérarchique respectivement). Les LT-CSH et IT-CSH sont identifiées grâce au marqueur CD49b.

d'après Benveniste et al., 2010

que cette propriété d'auto-renouvellement intermédiaire est intrinsèque à la cellule au moment de la transplantation.

Ce résultat remet en cause le critère classique de 16 semaines comme critère d'auto-renouvellement à long-terme. Par ailleurs, on peut considérer que les appellations « court-terme » et « long-terme » ne sont pas très heureuses pour les CSH. En effet, par définition, une CSH est capable de se maintenir à long terme. Une ST-CSH n'est donc pas *stricto sensu* une CSH, ce serait donc plutôt un progéniteur. Ces appellations permettent de hiérarchiser artificiellement la population de cellules immatures du système hématopoïétique. L'identification des cellules IT-CSH ajoute une étape à ce processus de différenciation, elle a le mérite d'illustrer plus encore que la population de cellules hématopoïétiques immatures se présente probablement comme un continuum de cellules dont l'auto-renouvellement décroît avec la différenciation. Déterminer une limite pour la définition de « CSH » devient alors forcément artificielle, et l'utilisation des termes ST, IT ou LT-CSH peut aider à répondre à cette question. Dans quelle mesure la différenciation de ces cellules est linéaire et irréversible n'est pas très clair, une certaine plasticité peut être envisagée, comme c'est le cas pour les CSH quiescentes ou activées (*cf.* Partie 1 : I.5.1).

5.3. Des sous-populations de CSH au potentiel de différenciation biaisé

Des transplantations de CSH en dilution limite ont permis de mettre en évidence des potentiels variés d'auto-renouvellement et de différenciation. En étudiant un grand nombre de transplantations, l'équipe de C.Eaves a mis en évidence l'existence de plusieurs types de CSH, avec des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation variées (Dykstra et al., 2007). Les CSH de types γ et δ permettent une reconstitution à 16 semaines, mais ne peuvent pas recoloniser un hôte lors d'une transplantation secondaire, indiquant un auto-renouvellement réduit. Les CSH de types α et β présentent des biais de différenciation respectivement myéloïde et lymphoïde. L'étude propose un modèle selon lequel les CSH α et β seraient les CSH *bona fide* (Figure 14). Plusieurs marqueurs ont été proposés afin d'identifier les CSH en fonction de leur potentiel de différenciation. Le marqueur CD150 ou les propriétés différentielles d'exclusion du Hoechst permettent d'isoler sélectivement ces CSH et d'analyser leurs propriétés au niveau moléculaire ou fonctionnel (Morita et al., 2010; Beerman et al., 2010; Challen et al., 2010).

Ces deux études indiquent que les CSH à fort potentiel myéloïde (cellules $CD150^{high}$ dans l'étude de Morita et al., et CSH α dans l'étude de Dykstra et al.) ont un auto-renouvellement plus important que celles biaisées vers le lignage lymphoïde. Cette différence d'auto-renouvellement pourrait s'expliquer par une relation hiérarchique entre ces deux types de CSH, illustrée par le perte du marqueur CD150 au cours de la différenciation (Morita et al., 2010). Il faut noter que certaines CSH $CD150^{high}$ ne présentent pas de progénie, ou une progénie myéloïde uniquement, au cours de la première transplantation, mais sont capables de s'auto-renouveler et retrouvent un potentiel de

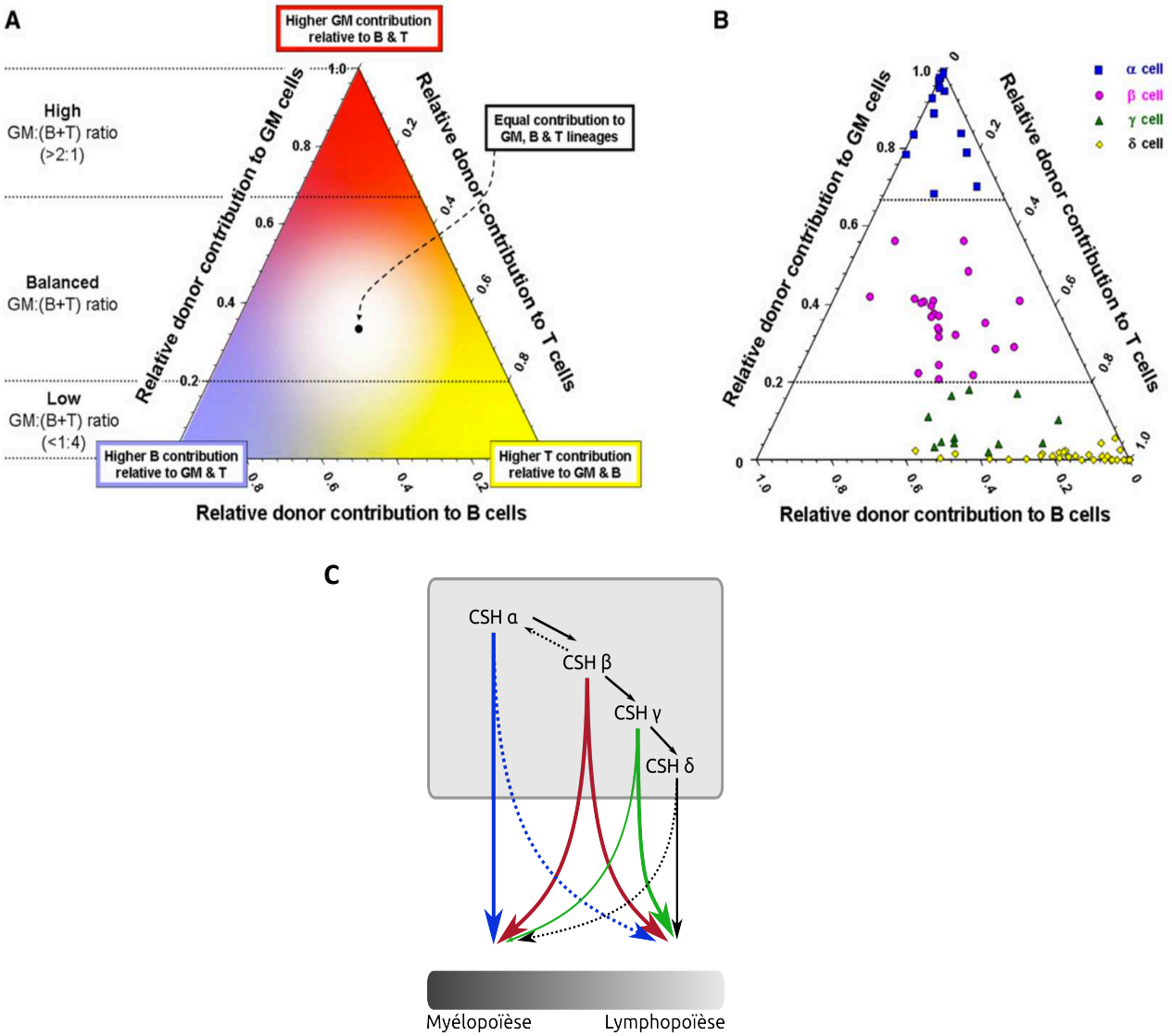


Figure 14. Identification de différentes sous-populations de CSH en fonction de leur potentiel de différenciation

A. Comparaison des contributions au lignage myéloïde (GM pour granulocyte-macrophage), au lignage B et au lignage T. Si un clone reconstitue uniquement le lignage myéloïde, il sera représenté dans le coin du triangle en haut ; s'il reconstitue uniquement le lignage B, il sera représenté dans le coin en bas à gauche ; s'il reconstitue uniquement le lignage T, il sera représenté dans le coin en bas à droite. Un clone reconstituant de façon équivalente les 3 lignages sera au centre du triangle. Une contribution plus importante aux lignages myéloïde, B ou T sera corrélée avec un décalage vers le haut, vers le bas à gauche, ou vers le bas à droite respectivement. **B**. Les contributions des CSH aux différents lignages sont évaluées au sein de souris greffées, 16 semaines après la transplantation. Une subdivision en 4 sous-populations est proposée, en fonction des potentiels de différenciation des CSH. **C**. Représentation schématique des relations entre les différentes sous-populations de CSH. Au sein du carré gris, les cellules peuvent recoloniser un hôte pendant plus de 16 semaines. Des transplantations en série et des cultures *in vitro* suggèrent que les CSH s'organisent selon un modèle hiérarchique, où le potentiel de générer des cellules myéloïdes diminue progressivement, avant que l'activité de recolonisation à long terme ne soit perdue. Les CSH α ont une forte propension à générer des cellules myéloïdes. Elles peuvent être maintenues au cours de transplantations en série, et peuvent donner naissance à des cellules capables de recoloniser le lignage lymphoïde.

d'après Dykstra et al., 2007

différenciation myéloïde et lymphoïde dans les transplantations suivantes. De telles cellules sont retrouvées dans l'étude de Dykstra, et pourraient être des cellules « latentes », en amont de la cascade de différenciation (Dykstra et al., 2007). La différence d'auto-renouvellement peut également s'expliquer par des différences de prolifération : des analyses transcriptomiques et des marquages classiques de cycle cellulaire suggèrent que les CSH biaisées vers le lignage lymphoïde prolifèrent plus que celles biaisées vers la différenciation myéloïde (Challen et al., 2010). Cette prolifération pourrait amener à une extinction plus rapide de cette population de CSH.

Enfin, ces équipes ont montré que les CSH transplantées conservent leur potentiel de différenciation. Ce résultat est important car il montre le caractère intrinsèque de cette spécificité. Par ailleurs, des analyses transcriptomiques indiquent que les CSH à différenciation myéloïde expriment faiblement le récepteur à l'IL-7, cytokine lymphopoïétique, et que leur prolifération est induite par le TGF-β1, alors que les CSH biaisées vers le lignage lymphoïde répondent fortement à l'IL-7 et que leur prolifération est inhibée par le TGF-β1 (Muller-Sieburg et al., 2004; Challen et al., 2010). Ces résultats suggèrent que des mécanismes moléculaires intrinsèques régulent différentiellement ces deux types de CSH.

5.4. Conclusions : de multiples hétérogénéités

Les études détaillées plus haut mettent en évidence plusieurs types d'hétérogénéités au sein de la population de CSH. Cette hétérogénéité est corrélée avec des propriétés intrinsèques des CSH, et avec la localisation au sein de la niche. On peut noter que d'autres populations de cellules souches présentent également des hétérogénéités. Les potentiels d'auto-renouvellement et le type de division asymétrique ou symétrique réalisé par les cellules satellites permettent d'ordonner le pool de cellules souches du muscle squelettique (pour revue, voir (Brack and Rando, 2012)). Par ailleurs, dans la crypte intestinale, deux populations de cellules souches semblent cohabiter : les cellules au fond de la crypte $Lgr5^+$ et les cellules « +4 » (pour revue, voir (Carlone and Breault, 2012)). Il est proposé que les cellules « +4 » sont majoritairement quiescentes alors que les cellules $Lgr5^+$ prolifèrent rapidement, mais les potentielles relations hiérarchiques entre ces deux populations, en conditions d'homéostasie et en conditions de stress, ne sont pas encore élucidées. De telles études sur les hétérogénéités au sein des populations de cellules souches dans plusieurs systèmes apportent ainsi de nouvelles données sur la biologie des cellules souches.

Les hétérogénéités peuvent être vues comme un nombre d'états distincts fini ou comme un continuum d'états. Il semble aujourd'hui généralement admis que les CSH sont distribuées en deux sous-populations distinctes, en fonction de leurs propriétés de cycles. Par ailleurs, un modèle de différenciation hiérarchisé avec un continuum d'états, aux potentiels d'auto-renouvellement progressivement réduits, et aux propriétés de différenciation progressivement biaisées vers le lignage lymphoïde peut être proposé (Figure 15). La différenciation en soi est un processus irréversible,

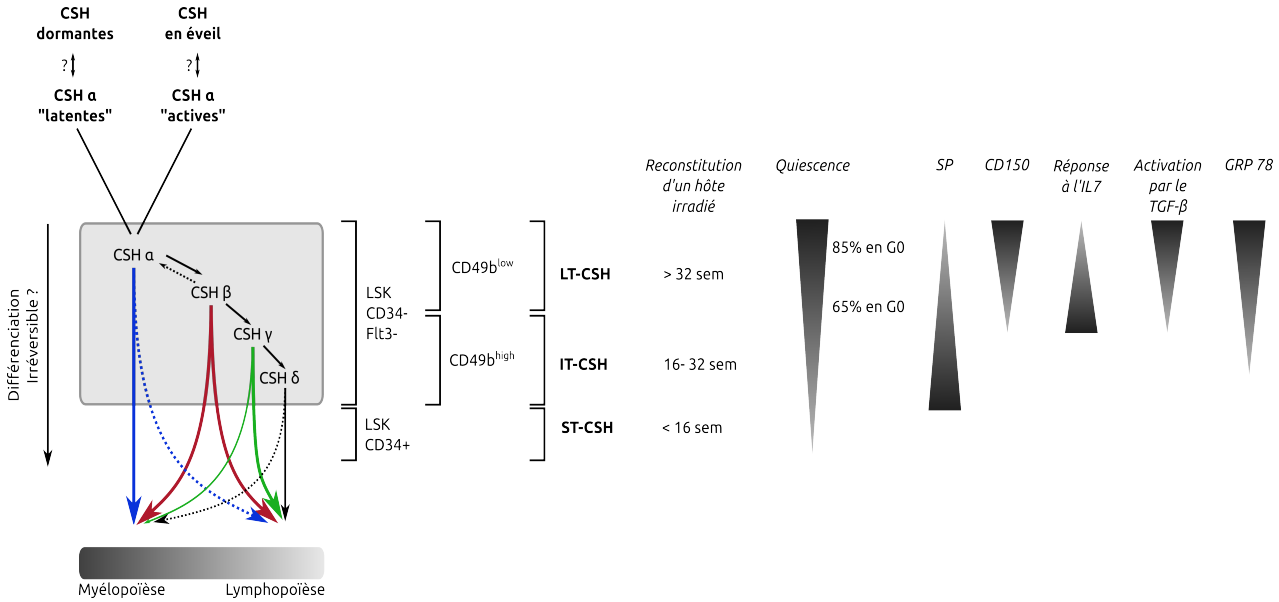


Figure 15. Bilan des hétérogénéités observées au sein des CSH

Un modèle hiérarchique, mais constitué d'un continuum d'états peut être proposé. Les CSH α, β, γ et δ ont été décrites par Dykstra et al. en fonction de leur potentiel d'auto-renouvellement et de différenciation. Au sein du cadre gris, les cellules peuvent recoloniser la moelle d'un hôte irradié pendant au moins 16 semaines. Les CSH γ et δ correspondent aux IT-CSH, décrites par Benveniste et al., et exprimant le marqueur CD49b : elles recolonisent un hôte irradié pendant 16 semaines, puis leur contribution décroît pour disparaître ensuite. Seules les CSH α et β peuvent recoloniser un hôte sur plus de 32 semaines. Les ST-CSH sont hors du cadre gris, et ne sont pas des CSH en tant que telles. Challen et al. décrivent les propriétés de cycle cellulaire des populations, avec une diminution de la proportion de cellules en G0 au cours de la différenciation. Le phénotype SP, l'expression du marqueur CD150 et du récepteur GRP78 sont modulés et aident à distinguer les sous-populations (Challen et al., 2010 ; Dykstra et al., 2007 ; Morita et al., 2010 ; Miharada et al., 2011). D'un point de vue fonctionnel, les CSH avec un potentiel biaisé vers le lignage lymphoïde répondent davantage à l'interleukine 7, grâce à une plus forte expression du récepteur IL7-R, et sont inhibées par le TGF-β, qui active les CSH α. (Muller-Sieburg et al., 2004 ; Challen et al., 2010). Parmi les CSH α sont trouvées des CSH « latentes », qui pourraient être des CSH dormantes. Les CSH α pourraient suivre une distribution à deux populations, à savoir des CSH dormantes et des CSH en éveil.

cependant, chaque modification de l'état de la CSH pourrait être réversible, apportant de la plasticité au système. Les études présentées plus haut ont détaillé les différents types d'hétérogénéité, néanmoins peu de données permettent de les mettre en lien. La Figure 15 propose un bilan de ces données. On peut notamment relever que les CSH γ et δ répondent aux critères des IT-CSH de l'étude de P.Benveniste. Par ailleurs, l'identification de CSH α dites « latentes » pourrait refléter la présence de CSH dormantes. Analyser le potentiel de différenciation des CSH dormantes *versus* en éveil aidera notamment à faire des liens entre ces résultats.

Enfin, ces études soulignent l'importance de la définition fonctionnelle d'une CSH. Classiquement, une cellule est considérée comme CSH lors d'une transplantation lorsqu'elle est capable de recoloniser les lignages lymphoïde et myéloïde à plus de 1% du sang circulant de l'hôte irradié, pendant 16 semaines. Cependant, les IT-CSH et les probablement équivalentes CSH γ et δ répondent à ces critères mais ne peuvent pas se maintenir sur du long terme (plus de 16 semaines). Au contraire, les CSH α « latentes » ne régénèrent peu ou pas un premier hôte irradié, elles ne sont pas considérées comme CSH au vu des critères proposés ; pourtant, elles sont capables de s'auto-renouveler au cours de plusieurs transplantations successives, et peuvent générer, dès la seconde transplantation, tous les lignages, répondant ainsi à la définition fonctionnelle des CSH. Rigoureusement, il faudrait donc définir comme CSH une cellule capable de s'auto-renouveler sur plus de 32 semaines, et de participer à la recolonisation des lignages lymphoïdes et myéloïdes au cours d'une seconde transplantation. Des compromis entre des critères sans doute toujours plus rigoureux et des limitations dues à l'expérimentation devront bien sûr être envisagés. Il est surtout important de bien définir les critères de chaque étude, et d'être conscient des limites inévitablement introduites.

6. Quelle définition pour une cellule souche ?

6.1. Vers une définition moléculaire de la cellule souche …

La réactivation de quelques gènes clés du développement précoce dans des cellules somatiques différenciées suffit à induire la dé-différenciation de ces cellules et à générer des cellules dites iPS –induced pluripotent stem cells- (Takahashi and Yamanaka, 2006). Cette découverte peut amener la question suivante : à l'image des facteurs de transcription induisant la reprogrammation des cellules différenciées en cellules iPS, existe-t-il des gènes associés au caractère souche dans les cellules souches au sein de plusieurs systèmes ? A la recherche d'une définition moléculaire des cellules souches, plusieurs équipes ont analysé les profils d'expression des cellules Souches Embryonnaires -ES-, des CSH, des cellules souches neurales et des cellules progénitrices de la rétine (Figure 16.a) (Ramalho-Santos et al., 2002; Ivanova et al., 2002; Fortunel et al., 2003). La comparaison des profils d'expression de ces populations met en évidence un faible chevauchement des

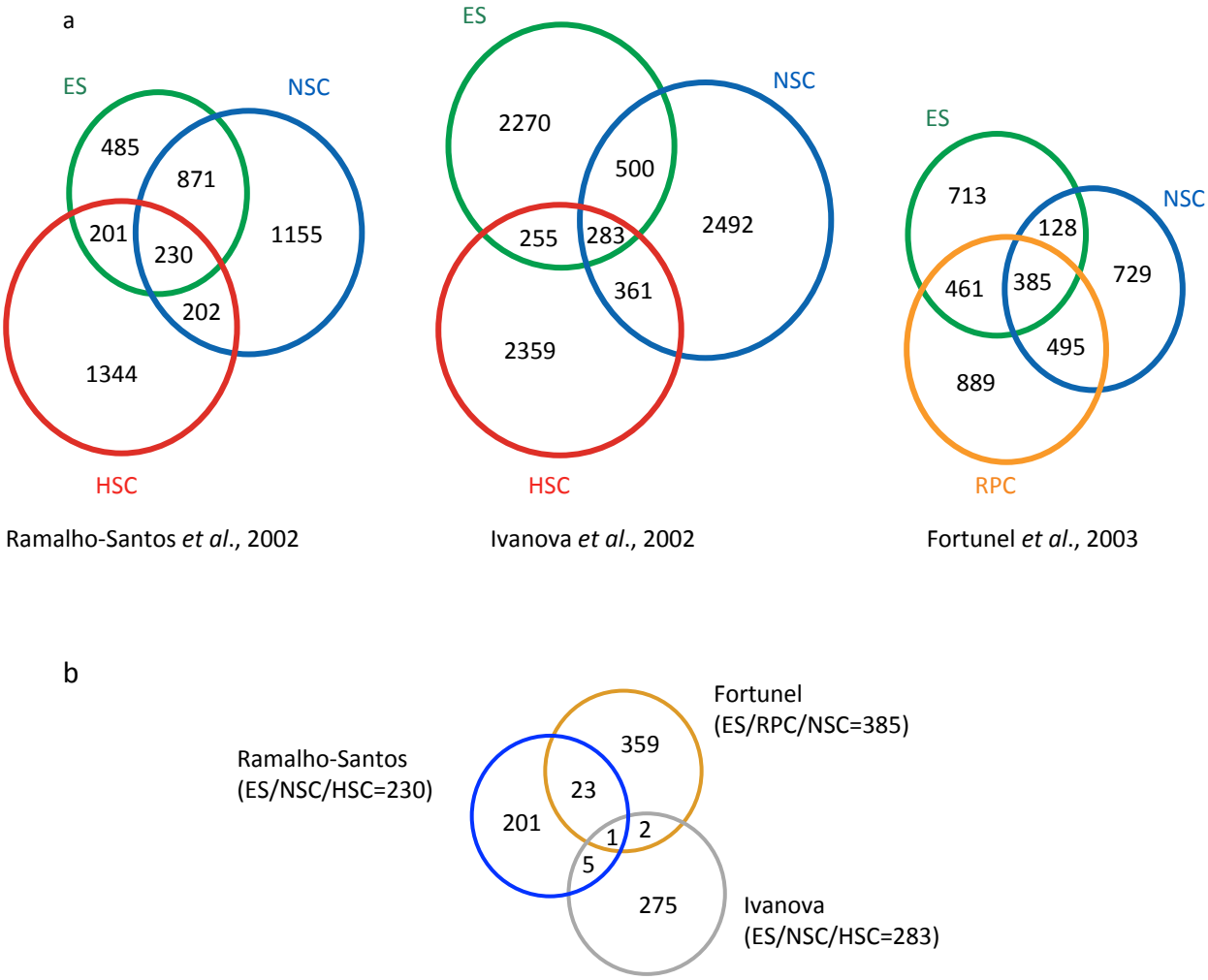


Figure 16. Recherche d'une signature moléculaire des cellules souches

a. Diagrammes représentant le nombre de gènes spécifiquement exprimés dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC), dans les cellules souches neurales (NSC), dans les cellules souches embryonnaires (ES) et dans les cellules progénitrices de la rétine (RPC) au cours de trois études différentes. La confrontation de ces listes de gènes permet d'identifier 230 (Ramalho-Santos et al., 2002), 283 (Ivanova et al., 2002) ou 385 (Fortunel et el., 2003) gènes en commun exprimés par toutes les cellules souches analysées. **b**. Diagrammes représentant la confrontation entre les résultats des trois études. Les signatures moléculaires déterminées par les trois groupes indépendants ne présentent qu'un seul gène en commun.

d'après Fortunel et al., 2003 ; Céline Souilhol

résultats : en particulier, un seul gène est identifié dans les trois études (Figure 16.b). Malgré les limites pratiques de l'identification et des tris des cellules souches de ces expériences réalisées au début des années 2000, ces résultats suggèrent que le caractère souche ne peut pas être défini de façon absolue par l'expression de quelques gènes. Les cellules souches utiliseraient différents réseaux et voies de signalisation pour maintenir leurs propriétés.

6.2. … ou plutôt une définition fonctionnelle de la cellule souche ?

Aucun marqueur ou combinatoire de marqueurs ne permet d'identifier le caractère souche d'une cellule de façon similaire dans plusieurs tissus. Nous avons vu que les cellules souches sont définies par leurs capacités à s'auto-renouveler et à se différencier pour générer l'ensemble des cellules du tissu. Puisque les cellules souches semblent utiliser des expressions variables de leur génome pour assurer leurs fonctions, comme nous venons de le voir, il est important que cette définition « universelle » reste le critère par excellence d'identification des cellules souches.

Plus que son profil d'expression, sa façon de répondre à divers signaux pourrait définir une cellule souche. En effet, la cellule est soumise à des stress et des signaux variés et contradictoires en permanence. Différentes cellules réagissent différemment à des mêmes signaux. **La cellule souche pourrait être définie intrinsèquement par sa façon d'intégrer et de coordonner les signaux auxquels elle est soumise, et par conséquent par sa façon d'y répondre et d'adapter son destin cellulaire.** C'est une telle définition que je choisirai et que j'essaierai de développer tout au long de ce manuscrit.

Plusieurs études ont souligné l'utilisation spécifique de certains mécanismes cellulaires généraux au sein des cellules souches *versus* des cellules différenciées. Cette spécificité peut participer à la régulation des cellules souches et au maintien de leurs propriétés, et ainsi à leur définition. Ainsi, nous verrons au cours de ce manuscrit que les cellules souches peuvent utiliser de façon particulière la machinerie de réparation de l'ADN, les mécanismes du cycle cellulaire, ou encore le mode de division cellulaire, les distinguant par ces points de leur progénie plus différenciée. Au sein du système hématopoïétique, les rôles de quelques facteurs épigénétiques, tels *Bmi-1*, *Mll* ou la methyltransférase *Dnmt3*, suggèrent que des régulations épigénétiques pourraient contribuer à un nouveau niveau de contrôle et de définition des CSH (Park et al., 2003; Jude et al., 2007; Challen et al., 2012). Enfin, et pour introduire déjà quelques notions abordées plus tard dans le manuscrit, nos résultats et quelques données récentes dans la littérature suggèrent que la biologie des ribosomes, et notamment leur biogenèse et/ou leur composition pourraient servir de moyen de régulation des cellules souches.

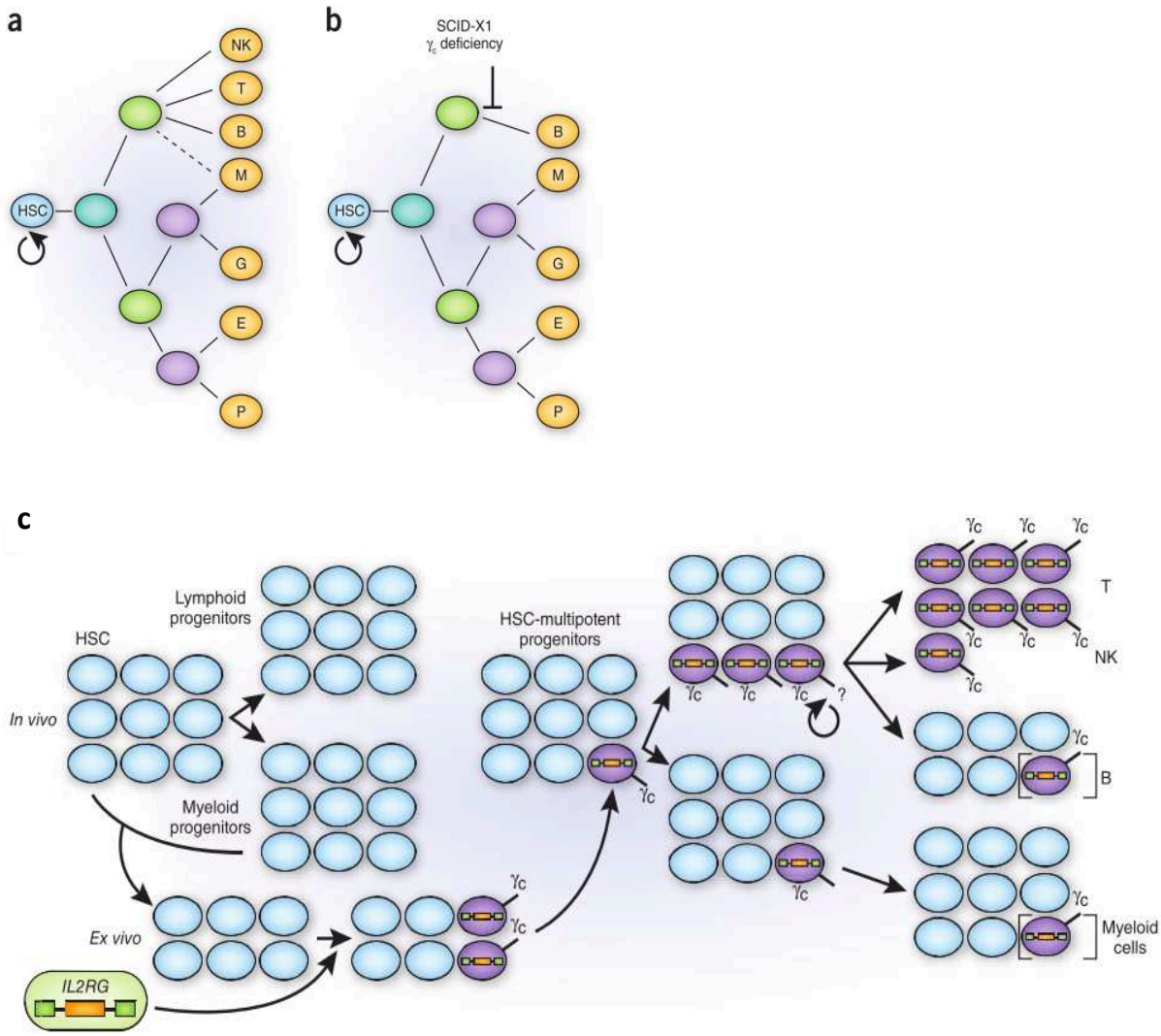


Figure 17. Principe de la thérapie génique pour le traitement de l'immunodéficience sévère liée à l'X

Le syndrome d'immunodéficience sévère liée à l'X se caractérise par une absence de cellules T et NK, due à des mutations dans le gène codant pour le récepteur-γ à l'interleukine 2 *IL2RG*, et par conséquent des défauts dans l'expression ou la fonction de la sous-unité γ_c du récepteur. **a**. Schéma simplifié de l'hématopoïèse normale. **b**. L'expression altérée de γ_c induit des défauts dans la génération des cellules T et NK. **c**. Schéma de la stratégie adoptée pour la thérapie génique : des cellules immatures sont transfectées avec un vecteur rétroviral contenant le gène *IL2RG*. Une fois réinjectées, les cellules transfectées contribuent à une petite fraction de l'hématopoïèse (cellules violettes), et génèrent des progéniteurs lymphoïdes capables de produire des cellules T, et dans une moindre mesure des cellules NK. L'insertion rétrovirale n'est plus détectée dans les cellules B et myéloïdes sur du long terme, mais se maintient dans les cellules T. Cela suggère que des progéniteurs T pourraient acquérir des propriétés d'auto-renouvellement pour persister sur du long terme.

d'après Fisher et al., 2010

7. Conclusion : les CSH, un modèle privilégié d'étude des cellules souches

Les avancées dans le domaine des CSH ont élevé ces cellules au rang de modèle d'étude des cellules souches chez la souris. L'étude des CSH a été favorisée tout d'abord par un certain nombre de propriétés qui ont facilité leur manipulation. De plus, les développements techniques, les approches par invalidation de gènes, et les études transcriptomiques à grande échelle, sur des petits nombres de cellules, voire des cellules uniques, ont contribué à de nombreuses avancées dans l'étude des CSH, et à des découvertes pertinentes pour la compréhension de la biologie des cellules souches.

La recherche sur les CSH a beaucoup été motivée par la volonté d'une application clinique. Les CSH ont été les premières cellules souches adultes à être isolées et utilisées en clinique. Elles sont aujourd'hui utilisées en routine, lors de greffes de cellules hématopoïétiques enrichies en CSH, pour des traitements de certaines leucémies ou de maladies auto-immunes (Weissman, 2000). La recherche sur les CSH a également accompagné les premiers essais de thérapies géniques. Nous pouvons citer notamment les travaux d'A.Fischer à l'hôpital Necker à Paris. En traitant des enfants atteints d'immunodéficience sévère dans les années 2000, il démontre formellement l'intérêt du concept de thérapie génique ; les résultats sont restés mitigés suite à des effets secondaires graves. Aujourd'hui, les résultats de traitements des immunodéficiences sévères liées à l'X par exemple sont très encourageants (Figure 17) (Fischer et al., 2010).

Des parallèles entre la composition et la régulation du tissu sain et du tissu cancéreux sont également aujourd'hui établis. Notons que plusieurs proto-oncogènes ou suppresseurs de tumeur contrôlent des aspects clés de la fonction des CSH, comme *Bmi1* ou *PTEN*, suggérant que des mécanismes similaires peuvent être utilisées par les CSH et les cellules cancéreuses (Park et al., 2003; Zhang et al., 2006; Yilmaz et al., 2006). En particulier, des facteurs de transcription régulant l'auto-renouvellement, comme *Tel/Etv6* ou *Stat5*, sont impliqués dans certaines leucémies, apportant des pistes d'explication moléculaire sur les capacités exceptionnelles d'auto-renouvellement des cellules cancéreuses (Hock et al., 2004b; Kato et al., 2005). Dès 1997, le système hématopoïétique a apporté la preuve de l'existence d'une hiérarchie au sein de leucémies myéloïdes, avec l'existence de cellules souches cancéreuses, capables de s'auto-renouveler et de propager la tumeur (Bonnet and Dick, 1997). L'étude fondamentale des cancers est très complexe. Sans entrer dans les détails, je soulignerai juste que le système hématopoïétique sert aujourd'hui de modèle pour aborder les défis actuels du domaine, parmi lesquels la nature des cellules initiatrices de cancer et des mécanismes moléculaires de la tumorigenèse, les interactions des cellules cancéreuses avec la niche et l'organisation hiérarchique d'une tumeur.

Enfin, le système hématopoïétique présente bien sûr des limites expérimentales, liées notamment au caractère fluide du tissu. Il est extrêmement délicat d'identifier avec certitude une CSH,

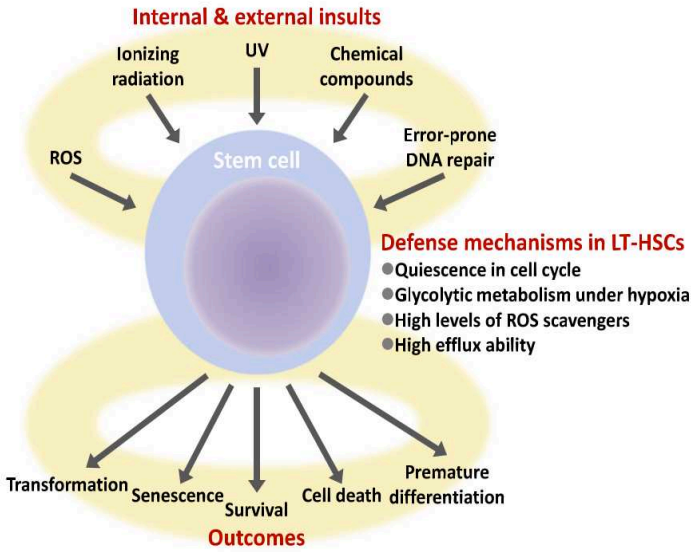


Figure 18. Différents mécanismes de défense et potentielles réponses au stress dans les CSH

La CSH est soumise en permanence à divers stress. Des mécanismes de défense ont été identifiés spécifiquement dans ces cellules : la quiescence, l'utilisation de la glycolyse, l'expression de défenses anti-oxydantes, et des capacités d'exclusion de certaines drogues. Suite à l'exposition au stress, la cellule peut répondre par un large choix de destins cellulaires, indiqués en bas de la figure.

d'après Suda et al., 2011

Cellular effect	Target genes
Cell-cycle arrest	p21
	14-3-3sigma
	Cdc25
DNA repair	DDIT4
	Gadd45
Apoptosis	Puma
	Noxa
	Slug
	Bid
	Bax
Stem cell quiescence	Gfi1
	Necdin

Tableau 2. Liste des gènes cibles qui participent à la réponse induite par p53

En réponse à des stress, plusieurs gènes cibles de p53 participent à la réponse et peuvent induire un arrêt du cycle, activer la machinerie de réparation de l'ADN, ou provoquer l'apoptose de la cellule. Dans les CSH, *p53* participe au maintien de la quiescence, *via* l'activation de *Gfi1* et de *Necdin*.

d'après Asai et al., 2011

d'analyser les divisions et de suivre la localisation de sa progénie. L'étude d'autres systèmes apporte des outils et aussi des informations complémentaires sur la biologie des cellules souches.

II. Régulation des CSH : des réponses spécifiques en situations de stress

Les cellules souches sont soumises en permanence à des stress de natures variées : des stress physiologiques liés au fonctionnement normal du tissu, par exemple à la réplication ou au métabolisme de l'oxygène, et des stress non physiologiques, parmi lesquels des lésions du tissu, des infections, des radiations ionisantes ou des rayonnements UV, ou encore des expositions à certains agents toxiques. Les cellules souches s'auto-renouvellent tout au long de la vie de l'individu, elles sont donc susceptibles d'accumuler des dommages au cours du temps. C'est pourquoi, je considérerai également le temps comme un facteur de stress. La cellule souche doit gérer ces signaux de stress, et peut répondre en maintenant son statut de cellule souche, ou à défaut, en se différenciant prématurément, ou en rentrant en sénescence ou en apoptose (Figure 18).

Selon la définition proposée dans la Partie 1 : I.6, la cellule souche peut être définie par sa façon d'intégrer l'ensemble de ces signaux de stress et de choisir des réponses spécifiques. La voie *p53* est un exemple très intéressant d'assimilation des stress subis par la cellule, et son rôle dans les CSH suggère une coordination des signaux de stress avec l'homéostasie des CSH, ces aspects seront développés dans le paragraphe Partie 1 : II.1. Nous verrons dans cette partie comment la cellule souche, et particulièrement la CSH, utilise spécifiquement des moyens de protection, que sont la quiescence, l'hypoxie, la protection des télomères et l'exclusion de certains composés toxiques (*cf.* Partie 1 : I.3.1.2). Nous verrons également comment suite à l'exposition à un stress, la CSH met en place des systèmes de défense, utilisant de façon caractéristique les machineries cellulaires que sont la réparation des dommages à l'ADN ou la gestion des dérivés toxiques de l'oxygène.

1. La voie *p53* : au carrefour de l'homéostasie et de la gestion du stress

p53 est un acteur majeur de la réponse au stress. Activé suite à des dommages à l'ADN, des stress oxydatifs, des défauts de division cellulaire, des perturbations du métabolisme, un stress ribosomique… *p53* apparaît comme un intégrateur d'un grand nombre des stress subis par la cellule. Lorsque la voie *p53* est activée, la protéine *p53* est alors stabilisée par des modifications post traductionnelles, et agit comme facteur de transcription sur un réseau de gènes cibles. Ces gènes cibles participent à la réponse, et peuvent induire un arrêt du cycle, la réparation des dommages à l'ADN,

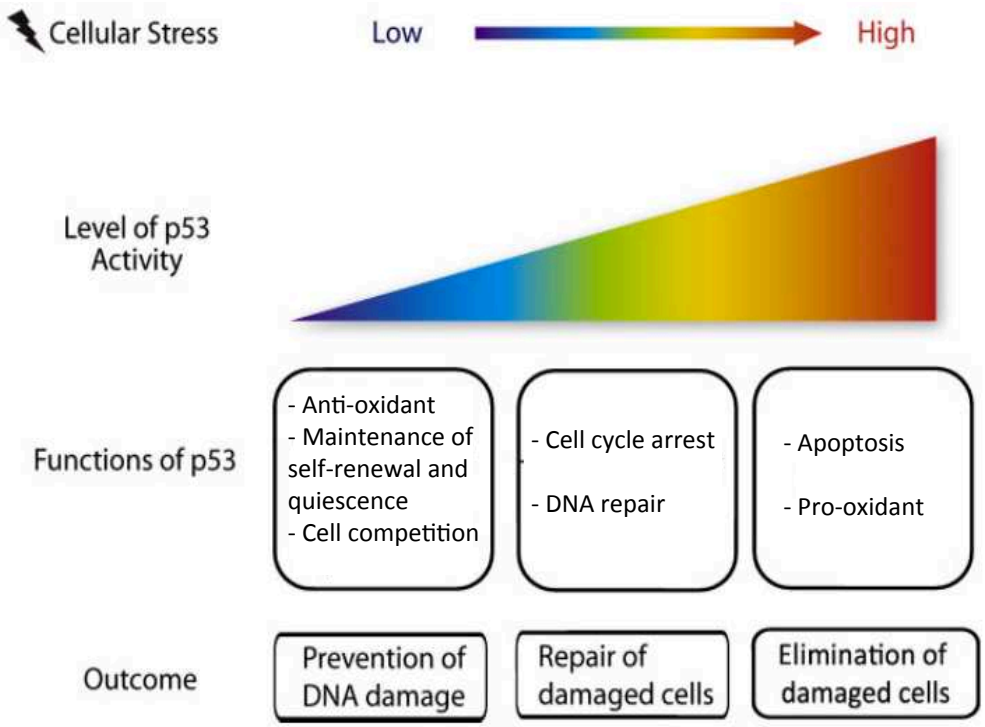


Figure 19. Fonctions multiples de p53 dans les CSH, en situation d'homéostasie et en situation de stress

p53 peut induire toute une variété de réponses cellulaires en fonction de la nature, de l'intensité et de la durée du stress. Quand il est exprimé à des niveaux physiologiques, en conditions d'homéostasie, p53 participe au maintien des propriétés des CSH, à savoir l'auto-renouvellement et la quiescence, régule la réponse anti-oxydante, et met en place une compétition cellulaire basée sur le niveau relatif d'expression de p53. Des stress plus importants augmentent le niveau de p53, qui assure l'arrêt du cycle et la mise en place de la machinerie de réparation de l'ADN. Enfin, si les niveaux de stress sont trop importants, p53 peut induire l'apoptose ou la sénescence, pour éliminer les cellules endommagées.

d'après Asai et al., 2011

l'apoptose ou la sénescence (Tableau 2). Lorsque les CSH sont soumises à des stress, de telles réponses activées par *p53* sont également mises en route (Figure 19, pour des niveaux de stress moyens à élevés). L'activité de *p53* permet ainsi une résistance accrue à certains stress et notamment à la tumorigenèse. Notons enfin que *p53* est capable d'induire des gènes pro-oxydants, nous en reparlerons (*cf.* Partie 1 : II.5.3.4). On sait aujourd'hui que *p53* participe aussi à la régulation des CSH dans des conditions homéostatiques, et joue notamment un rôle dans le maintien de leur quiescence et de leur auto-renouvellement (Figure 19). Enfin, suite à un faible niveau de stress, *p53* induit une compétition cellulaire au sein de la population des CSH et des progéniteurs. Ces propriétés seront détaillées ci-dessous.

p53 coordonne ainsi un grand nombre de signaux attestant du niveau de stress de la cellule, et induit un type de réponse spécifique, incluant des réponses au stress et le maintien des propriétés à l'homéostasie.

1.1. Rôle de *p53* dans l'auto-renouvellement des CSH

Plusieurs études indépendantes se sont penchées sur le rôle de *p53* dans l'auto-renouvellement des CSH. Elles ont montré que la perte de *p53* induit une augmentation du nombre de CSH LSK ou SLAM d'un facteur 2 environ (TeKippe et al., 2003; Chen et al., 2008b; Liu et al., 2009b). Une augmentation modeste de la capacité de recolonisation d'un hôte irradié (x2 par rapport au contrôle) suggère que *p53* régule négativement l'auto-renouvellement des CSH (TeKippe et al., 2003; Akala et al., 2008; Liu et al., 2009b). A l'inverse, une diminution progressive des cellules $p53^{-/-}$ dans des chimères compétitives, suite à des greffes de SLAM ou de LSK $p53^{-/-}$ est également observée (Chen et al., 2008b; Marusyk et al., 2010). Les cellules greffées (moelle totale, ou différentes fractions enrichies en CSH) et leur nombre, le nombre et la nature des cellules compétitrices ajoutées, les cinétiques de reconstitution, les populations observées dans les chimères (sang total, cellules lymphoïdes ou myéloïdes du sang) sont autant de paramètres qui introduisent des variabilités et des biais dans les conclusions de ces études. Si l'augmentation du nombre de CSH semble faire consensus, le rôle de *p53* sur leur auto-renouvellement n'est aujourd'hui pas clair.

Enfin, l'étude d'Akala montre qu'en l'absence de *p16*/*p19*, *p53* est requis pour limiter l'auto-renouvellement des progéniteurs (Akala et al., 2008). En effet, dans un fond $p53^{-/-}$ $p16^{-/-}$ $p19^{-/-}$, les progéniteurs immatures Lin^{-} $Sca\text{-}1^{+}$ $c\text{-}Kit^{+}$ $CD150^{-}$ $CD48^{-}$, mais pas les progéniteurs engagés (CMP-GMP) acquièrent des propriétés d'auto-renouvellement sur du long-terme, propriété normalement restreinte aux CSH. Ainsi, cette étude montre que, dans les progéniteurs immatures, *p53* interagit avec les voies *p16*/*p19* pour inhiber l'auto-renouvellement, et suggère que d'autres mécanismes limitent l'auto-renouvellement dans les cellules plus matures.

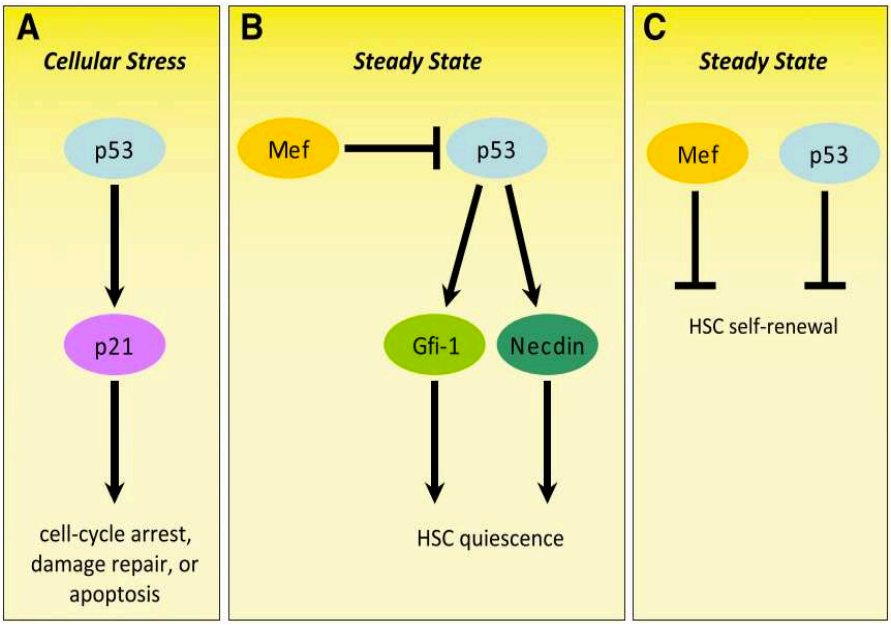


Figure 20. Rôles indépendants de *p53* dans la réponse au stress, la régulation de la quiescence et de l'auto-renouvellement des CSH

A. Suite à un stress, p53 induit une réponse qui, *via* p21, peut mener à l'arrêt du cycle, à la réparation des dommages à l'ADN, à la sénescence ou à l'apoptose. **B-C**. Les données obtenues par Liu et al. suggèrent que la quiescence et l'auto-renouvellement sont, au moins en partie, régulés indépendamment par MEF et p53. **B**. Concernant la quiescence, MEF réprime p53, qui normalement maintient la quiescence par l'expression de Gfi-1 et Necdin. **C**. Concernant l'auto-renouvellement ou la taille de la population des CSH, MEF et p53 ont des rôles indépendants, dont les intermédiaires ne sont pas connus.

d'après van Os et al., 2009

1.2. Rôle de *p53* dans la quiescence

Un rôle de *p53* dans la régulation de la quiescence des CSH pourrait expliquer en partie l'augmentation du nombre de CSH $p53^{-/-}$. En effet, Liu et al. ont montré que le nombre de CSH en G0 est réduit d'environ 2 fois dans les souris $p53^{-/-}$ (Liu et al., 2009b). Afin de détailler certains mécanismes moléculaires régulant la quiescence des CSH, cette équipe a utilisé la souris déficiente pour le facteur de transcription *MEF* (Lacorazza et al., 2006). Les souris $MEF^{-/-}$ présentent une augmentation du nombre de CSH, corrélée avec un plus fort auto-renouvellement et une quiescence accrue des CSH. En croisant ces souris avec des souris $p53^{-/-}$, ils montrent que l'auto-renouvellement des CSH $MEF^{-/-}$ est indépendant de *p53*. Par contre, *p53* est nécessaire à l'augmentation de la quiescence et à la protection contre des stress myélotoxiques des CSH $MEF^{-/-}$ (Liu et al., 2009b). Etonnamment, ils montrent que *p21* n'est pas impliqué dans le contrôle de la quiescence des CSH $MEF^{-/-}$; ils identifient deux nouvelles cibles directes de *p53* : *Gfi-1* et *Necdin*, impliquées dans le maintien de la quiescence des CSH. Cette étude met en évidence un certain découplage entre l'auto-renouvellement et la quiescence, suggérant que différentes voies de signalisation indépendantes entrent en jeu pour réguler les CSH $MEF^{-/-}$. Elle souligne aussi un nouveau rôle pour *p53* dans la quiescence des CSH $MEF^{-/-}$ (Figure 20). De façon intéressante, on peut noter que le rôle de *Gfi-1* dans la quiescence des CSH a déjà été montré dans deux études indépendantes : *Gfi-1* réprime la prolifération des CSH et est nécessaire à leur intégrité fonctionnelle (Zeng et al., 2004; Hock et al., 2004a) . Cette étude révèle bien un rôle de *p53* sur la quiescence des CSH, toutefois, les rôles de *p21*, *Gfi-1* et *Necdin* ont été approchés uniquement dans un fond $MEF^{-/-}$. Des expériences supplémentaires seront nécessaires pour détailler leurs rôles, ainsi que celui de *p53*, dans la quiescence des CSH, à l'homéostasie dans des souris sauvages.

1.3. Quelques exemples du rôle de *p53* dans d'autres cellules souches

Dans d'autres types de cellules souches, *p53* joue également un rôle régulateur de la quiescence et de l'auto-renouvellement. Dans les cellules souches neurales (CSN), *p53* maintient la quiescence et régule l'auto-renouvellement (Meletis et al., 2006). En effet, la perte de *p53* induit une augmentation de la prolifération *in vivo* et *ex vivo*. Cette augmentation de la prolifération est corrélée avec une augmentation du nombre de cellules capables de former des neurosphères *ex vivo* et avec un auto-renouvellement accru lors de passages successifs. *p53* régule également la quiescence et l'auto-renouvellement des cellules souches mammaires (CSMa) (Cicalese et al., 2009). *Ex vivo*, la perte de *p53* induit une augmentation des divisions, et particulièrement des divisions symétriques des CSMa. Le nombre de CSMa et leur auto-renouvellement au cours des passages des mammosphères augmentent. *In vivo*, les auteurs observent également une augmentation du nombre de CSMa dans les souris $p53^{-/-}$. En régulant la polarité des divisions des CSMa, *p53* pourrait exercer un rôle suppresseur de tumeur en inhibant les divisions symétriques et en contrôlant ainsi le nombre de CSMa dans

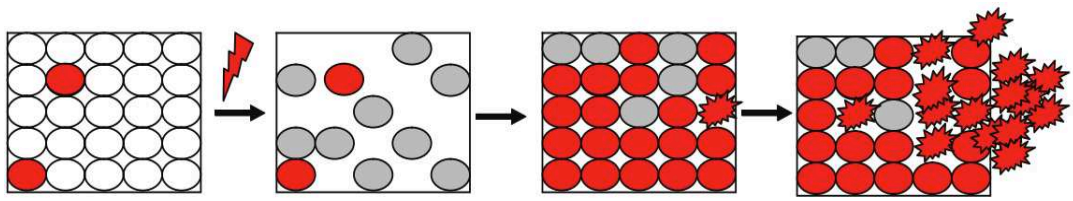


Figure 21. L'irradiation promeut la lymphomagenèse liée au génotype *p53*$^{-/-}$

La mutation d'un allèle de *p53* confère une résistance partielle aux effets des radiations ionisantes et une protection de la potentiel de clonogénicité à long terme. Les clones portant une mutation sur un allèle de *p53* (en rouge) sont ainsi sélectionnés. Cette sélection permet une augmentation de la population de cellules cibles pour une seconde mutation oncogénique (indiquée par la forme étoilée de la cellule), induisant la perte de l'activité de *p53*. Ainsi, cette compétition cellulaire basée sur le niveau d'activation de *p53* peut participer à la tumorigenèse.

d'après Marusyk et al., 2010

l'épithélium mammaire. Dans les cellules ES, une analyse récente à l'échelle du génome a montré que *p53* régule négativement l'auto-renouvellement des cellules ES en activant des gènes associés à la différenciation et en réprimant des gènes associés à la pluripotence et à l'auto-renouvellement (Li et al., 2012). L'ensemble de ces données suggère que l'inhibition de l'auto-renouvellement des cellules souches par *p53* pourrait être un mécanisme conservé dans plusieurs systèmes, qui pourrait être actif à l'homéostasie ou suite à un stress. Les mécanismes de cette régulation ne sont pas connus, il serait intéressant de savoir si un rôle de *p53* dans la polarité des divisions, comme il a été montré dans le cas des CSMa, pourrait être appliqué à d'autres cellules souches adultes.

1.4. Une compétition cellulaire au sein des CSH et progéniteurs arbitrée par *p53*

Deux études récentes mettent en évidence le rôle de *p53* dans une compétition cellulaire au sein de la population de CSH et de progéniteurs (Bondar and Medzhitov, 2010; Marusyk et al., 2010). En utilisant des approches élégantes et originales, ces études mettent en avant l'existence d'une compétition cellulaire favorisant les cellules les moins endommagées. Il ne s'agit pas ici d'un critère absolu d'absence de dommages, mais bien d'une compétition basée sur le niveau relatif de p53 entre les CSH et progéniteurs.

Cette compétition se met en place suite à un stress irradiant « moyen » (2.5 à 5 Gy), mais pas en conditions homéostatiques, suggérant que des mécanismes différents de ceux impliqués dans l'auto-renouvellement entrent en jeu (*cf.* Partie 1 : II.1.1). Par ailleurs, l'effet est nettement plus fort (enrichissement de 10 à 20 fois) que celui éventuellement observé à l'homéostasie dans les différents modèles *p53*. Suite à un stress irradiant donc, un mécanisme de compétition cellulaire sélectionne les cellules exprimant le plus faiblement *p53*. En utilisant des allèles dominant-négatifs pour *p53* (l'allèle modifié *R172H*, ou l'allèle *DDp53* codant pour le domaine multimérisé de *p53*), et l'allèle $p53^{-}$, les deux études montrent que la compétition dépend du niveau relatif d'expression de *p53* sein des CSH et progéniteurs. La compétition s'établit au bout de quelques semaines et se maintient sur du long-terme : la perte de *p53* protège ainsi les propriétés fonctionnelles des CSH. Bondar et al. montrent que les cellules « gagnantes » de cette compétition induisent un état de sénescence dans les autres cellules (Bondar and Medzhitov, 2010). Cette sélection pourrait participer aux processus de tumorigenèse : Marusyk et al. soulignent qu'il est important de considérer la sélection des cellules présentant déjà des lésions oncogéniques, ici des mutations dans le gène *p53*, et pas uniquement l'apparition de ces lésions suite à un stress carcinogène (Figure 21) (Marusyk et al., 2010).

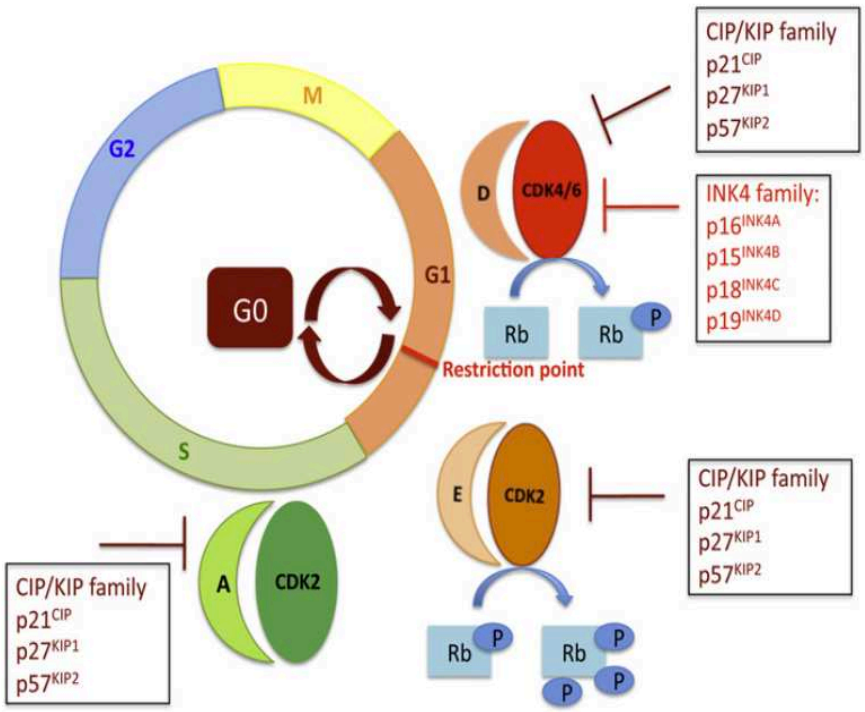


Figure 22. Fonction des inhibiteurs des kinases dépendantes du cycle

Durant la phase G1 précoce, l'activation du complexe cycline D-CDK4/6 induit la phosphorylation de *Rb*. Cette étape est négativement régulée par les membres de la famille INK4 et Cip/Kip. En phase G1 tardive, l'hyperphosphorylation de *Rb* par le complexe cycline E-CDK2 facilite la transition vers la phase S. Les membres de la famille Cip/Kip inhibent à la fois le complexe cycline E-CDK2 en phase G1 tardive, et le complexe cycline A-CDK2 au début de la phase S.

d'après Tesio et al., 2011

2. Entre quiescence et prolifération : plasticité des CSH face au stress

Au sein du système hématopoïétique, la quiescence est considérée comme une propriété intrinsèque des cellules souches. Particulièrement, les états quiescents de « dormance » ou « d'éveil » que nous avons évoqués tout à l'heure confèrent une plasticité et une adaptabilité au système hématopoïétique face à différents stress.

2.1. La quiescence est-elle nécessaire à l'auto-renouvellement ?

2.1.1. La perte de quiescence peut induire des défauts d'auto-renouvellement et la disparition des CSH

Des liens entre la quiescence et l'auto-renouvellement ont été décrits dans le cadre de l'étude de la souris déficiente pour le régulateur du cycle $p21^{CIP1/Waf1}$ -*p21*- (Figure 22) (Cheng, 2000). Depuis, les études de souris déficientes pour les régulateurs du cycle cellulaire *p27* et *p57* et la famille *Retinoblastoma*, le répresseur transcriptionnel *Gfi1*, le suppresseur de tumeur *PTEN*, les facteurs *FoxO*, l'inhibiteur de *mTOR Tsc1*, ou encore l'ubiquitine ligase *Fbw7* indiquent que la perte de quiescence s'accompagne de la perte des propriétés d'auto-renouvellement des CSH (Figure 23) (Zou et al., 2011; Matsumoto et al., 2011; Viatour et al., 2008; Hock et al., 2004a; Yilmaz et al., 2006; Zhang et al., 2006; Miyamoto et al., 2007; Tothova et al., 2007; Chen et al., 2008a; Thompson et al., 2008; Reavie et al., 2010). Notamment, les capacités de repopulation d'hôtes irradiés, en présence ou non de cellules compétitrices, sont fortement altérées, et la disparition des CSH peut subvenir en quelques semaines/mois. Ainsi, le maintien d'un équilibre entre la quiescence et l'auto-renouvellement serait nécessaire pour les CSH.

Ces défauts pourraient être simplement expliqués par une limitation intrinsèque du nombre de divisions d'une CSH. Cependant, la diminution de la part de CSH en G0 dans ces modèles est de l'ordre de 2, l'augmentation de CSH qui incorporent du BrdU pendant une période déterminée est de l'ordre de 2-4. Il semble peu plausible que cette augmentation modeste du nombre de cellules en cycle soit à l'origine de l'épuisement de la population et des défauts d'auto-renouvellement des CSH.

En triant des CSH spécifiquement en G0, G1 ou S/G2/M, l'équipe d'E.Passégué a montré que les capacités des CSH à recoloniser un hôte irradié diminuent dramatiquement dès que la CSH sort de quiescence (Passegué et al., 2005). Des cultures *ex vivo* suggèrent que les capacités de prolifération et de différenciation ne sont pas altérées, et que ces CSH ne sont pas plus sensibles à l'apoptose. Ainsi, des mécanismes moléculaires intrinsèques liés à la régulation du cycle cellulaire pourraient affecter l'auto-renouvellement des CSH. En parallèle, il est possible d'imaginer que dans les souris présentant de tels défauts de quiescence, les CSH en G1 ou S/G2/M présentent une propension plus forte à se différencier, ce qui pourrait expliquer la disparition des CSH dans certains mutants.

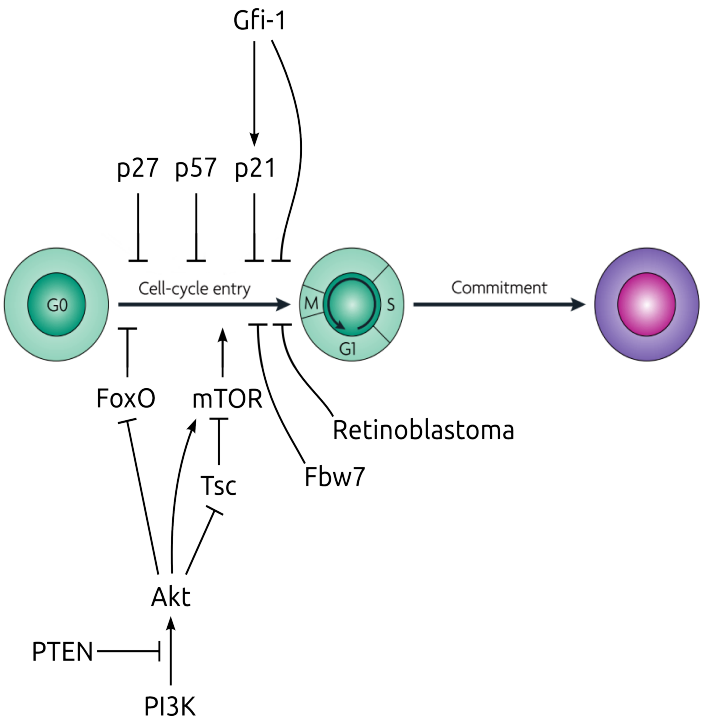


Figure 23. La sortie de quiescence induit la perte de l'auto-renouvellement des CSH

Un certain nombre de modifications génétiques affectent la quiescence des CSH. Ici sont présentés quelques molécules et voies de signalisation affectant la quiescence aux dépens de l'auto-renouvellement. Les inhibiteurs des cyclines dépendantes du cycle *p21*, *p27* et *p57* restreignent la prolifération des CSH et participent au maintien de leur fonction. *Gfi1* régule également la quiescence des CSH, il est suggéré que cette régulation pourrait faire intervenir *p21*. Les membres de la famille du *Retinoblastoma*, à savoir *Rb*, *p107* et *p130* ainsi que l'ubiquitine ligase *Fbw7* participent également au maintien de la quiescence des CSH. Enfin, la voie de signalisation *PI3K/Akt* régule également l'entrée en cycle, et les rôles de *PTEN*, des facteurs *FoxO* et de *mTOR* ont été étudiées.

d'après Orford et Scadden, 2008

2.1.2. Une prolifération accrue des CSH sans défauts d'auto-renouvellement ?

La quiescence comme propriété requise pour l'auto-renouvellement des CSH était presque devenue un dogme dans le domaine. De façon surprenante, quelques études suggèrent aujourd'hui qu'une prolifération accrue n'est pas toujours associée à la perte de fonction des CSH.

L'étude du régulateur du cycle $p18^{Ink4C}$ *-p18-* a été surprenante. *p18* est un inhibiteur du cycle dépendant spécifiquement des cyclines D-CDK4/6 (Figure 22). Les CSH $p18^{-/-}$ sont plus nombreuses et prolifèrent davantage que les CSH contrôles. Cependant, à l'inverse des CSH $p21^{-/-}$, les CSH $p18^{-/-}$ présentent des capacités d'auto-renouvellement accrues, lors de transplantations compétitives, lors de transplantations en séries, et lors de tests fonctionnels *ex vivo* (Yuan et al., 2004; Yu et al., 2006). Depuis, des phénotypes similaires ont été observés avec la mutation des ubiquitines ligases *c-Cbl* et *Itch*, et du facteur de transcription *Egr1* (ou *krox-24*) (Rathinam et al., 2008, 2011; Min et al., 2008). Ces mutations induisent effectivement une sortie de quiescence des CSH ; et pourtant, les CSH $c\text{-}Cbl^{-/-}$, $Itch^{-/-}$, $Egr1^{-/-}$, ou $p18^{-/-}$ peuvent s'auto-renouveler, recoloniser un hôte irradié, au cours de transplantations successives, dans des conditions de dilution limite ou de compétition. De plus, les CSH $Itch^{-/-}$ de souris âgées de 20 semaines ne sont pas plus affectées que celles d'une souris $Itch^{-/-}$ de 4 semaines (Rathinam et al., 2011). Une augmentation du nombre de CSH et de leur auto-renouvellement, et une meilleure résistance au stress peuvent même être observées. Notons que les proportions de cellules en cycle sont comparables à celles des mutants présentés précédemment. S'il est possible d'imaginer que des défauts d'auto-renouvellement existent et ne soient pas détectés dans ces études, l'ensemble des expériences réalisées suggèrent cependant fortement que ces CSH présentent une sortie de quiescence, sans que cela n'affecte leur capacité d'auto-renouvellement. Ces données intéressent fortement la recherche clinique. En effet, la possibilité d'induire la prolifération des CSH sans altérer leurs propriétés est séduisante, autant pour des stimulations *in vivo* des CSH chez certains patients que pour des cultures dédiées à la modification de CSH puis réimplantation dans le patient lors de thérapies géniques. Des recherches dans ce sens sont actuellement en cours.

Ces observations semblent contradictoires avec les résultats d'E.Passégué présentés plus haut, selon lesquels les CSH en S/G2/M présentent des défauts de recolonisation lors des tests de greffes (Passegué et al., 2005). Si une entrée en cycle accrue des CSH explique effectivement les défauts de recolonisation des mutants *p21*, *p27*, *p57*, *Gfi1*, *PTEN*, *FoxO*, *Tsc1* et *Fbw7*, il est surprenant que ces défauts ne soient pas reproduits dans les CSH $c\text{-}Cbl^{-/-}$, $Itch^{-/-}$, $Egr1^{-/-}$, ou $p18^{-/-}$. Il est alors possible que des mécanismes complémentaires soient mis en place dans ces mutants pour assurer l'auto-renouvellement des cellules en cycle.

L'étude des CSH $p18^{-/-}$ peut apporter des pistes d'explications sur l'impact de la régulation du cycle cellulaire sur l'auto-renouvellement. En effet, *p18* contrôle le début de la phase G1, *via* l'inhibition du complexe cycline D-CDK4/6. Or il est proposé que la phase G1 précoce soit une période du cycle où les CSH sont soumises à des signaux de différenciation, de sénescence ou

Category	Effect	Name of quiescent regulators
Extrinsic regulators	Positive regulators	Bone-lining osteoblastic cells and stem cell factor/C-Kit signaling, Tie2/Ang-1 signaling as well as TPO/MPL signaling
		Hypoxic environment
		Other matrix components: N-cadherins, integrins, osteopontin
		Ca^{2+} ions
		Transforming growth factor–β
		Wnt signaling pathway
	Negative regulators	Hedgehog (Hh) signaling pathway
Intrinsic regulators	Positive regulators	Transcription factors: Gfi-1, Pbx1, p53, Scl, Irf2, TXNIP, Nurr1, GATA-2
		Cyclin-dependent kinase inhibitors: p21, p57
		Others: Cdc42, Fbw7, pTEN, PML, TSC1, ATM, FoxOs, STAT5, Rb, Lkb1, Mi-2b, and Wnt5
	Negative regulators	MEF/EFL4
		Lnk
		c-Myc

Tableau 3. Régulateurs de la quiescence des CSH

d'après Li, 2011

d'apoptose (Orford and Scadden, 2008). Ainsi, les CSH *p18*$^{-/-}$, qui présentent une phase G1 précoce plus courte, seraient moins exposées à ces signaux, permettant ainsi un maintien de leur caractère souche : la durée de la phase G1 précoce peut ainsi participer à l'équilibre entre la différenciation et l'auto-renouvellement. En parallèle de cette observation, les cellules ES maintiennent une forte prolifération associée avec un auto-renouvellement potentiellement infini en culture. Il est tout à fait intéressant de remarquer qu'au sein des cellules ES, l'activation constitutive du complexe cycline E/CDK2 est associée à l'absence de phase G1 précoce. De façon intéressante, on peut noter que la délétion de *p57* induit une légère augmentation de *p18*, pouvant participer au phénotype inverse, à savoir un allongement de la phase G1 précoce, et donc de la période de sensibilité aux signaux de différenciation ou d'apoptose, se traduisant *in fine* par une perte de l'auto-renouvellement dans les CSH *p57*$^{-/-}$ (Matsumoto et al., 2011). Le niveau de transcrit de *p18* n'est pas modifié dans les CSH *c-Cbl*$^{-/-}$, indiquant également que d'autres mécanismes entrent en jeu. Par ailleurs, on peut noter, même si ce n'est pas surprenant, que les autres membres de la famille INK4, inhibiteurs des complexes cycline D-CDK4/6, ont des rôles différents dans la régulation de la quiescence et de l'auto-renouvellement des CSH. *p16*^{Ink4A} *-p16-* est associée avec la sénescence des CSH, et *p19*$^{Arf/Ink4D}$ *-p19-* participe à l'induction de l'apoptose (Park et al., 2003). Des CSH *p16*$^{-/-}$ ne présentent pas de défauts de quiescence ou d'auto-renouvellement lors de transplantations en série (Janzen et al., 2006). D'autres membres de la famille INK4A ont donc des rôles non redondants dans la régulation des CSH.

Les travaux présentés plus hauts ont analysé les propriétés de populations hautement purifiées en CSH, sans analyser spécifiquement les CSH dormantes. La caractérisation des propriétés de cycle et d'auto-renouvellement de ces CSH dormantes dans les différents mutants pourrait apporter des informations intéressantes. Cependant, ces manipulations sont lourdes techniquement : en particulier, il faut 130 jours de chasse après un marquage de l'ADN ou de la chromatine pour obtenir une population purifiée à 90% de CSH dormantes (van der Wath et al., 2009).

2.2. Régulation de la quiescence, quelques éléments

Le maintien des CSH nécessite un équilibre entre la quiescence et la prolifération, régulé par des facteurs extrinsèques et intrinsèques. Depuis quelques années, de nombreuses molécules et voies de signalisation ont été identifiées comme indispensables pour la régulation de la quiescence. Comprendre comment la quiescence des CSH est régulée est bien sûr intéressant pour comprendre la physiologie de ces CSH.

2.2.1. Une régulation complexe de la quiescence

Le contrôle de l'équilibre entre la quiescence et la prolifération est finement régulé, à la fois par des signalisations intrinsèques, et par l'interaction avec la niche, *via* les interactions cellulaires et les interactions avec la matrice extra-cellulaire. De nombreux modèles génétiques établis chez la

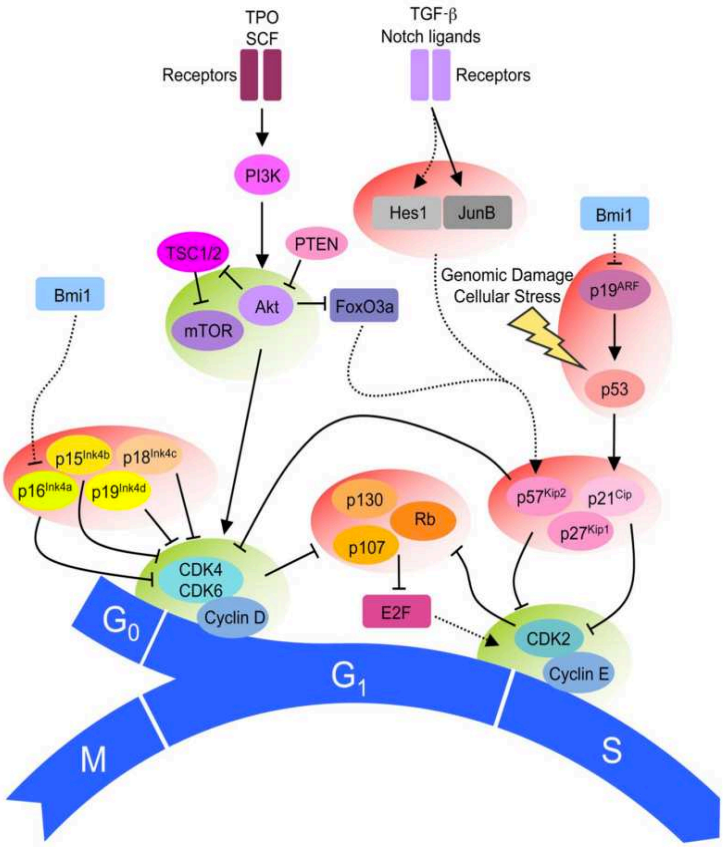


Figure 24. Régulation de l'entrée en cycle des CSH

Le passage des CSH quiescentes de la phase G0 à la phase G1 est régulé par une activité compétitive entre des mécanismes régulant positivement et d'autres régulant négativement les complexes cyclines-CDK. La voie *PI3K/Akt/mTOR*, activée en réponse à de nombreux signaux extrinsèques, est considérée comme un activateur central de l'entrée en cycle des CSH, *via* l'activation du complexe cycline D-CDK4/6. Cette voie est finement régulée, notamment par *PTEN* et *Tsc*. Les membres de la famille INK4 inhibent l'activité du complexe cycline D-CDK4/6, et les inhibiteurs de la famille CIP/KIP inhibent l'activité de la CDK4. La progression de la phase G1 à la phase S est régulée par le complexe cycline E-CDK2, lui même régulé par les membres des familles CIP/KIP et Rb. Les membres de la famille CIP/KIP sont contrôlés par des facteurs de transcription comme *Hes1*, *JunB*, et *FoxO3a*. Le cycle des CSH est aussi régulé par *p53*, soit en réponse à des dommages à l'ADN, soit suite à l'activation de *p19*. Les flèches pleines indiquent les régulations directes par activation ou inhibitions ; les flèches en pointillé indiquent les régulations transcriptionnelles.

d'après Pietras et al., 2011

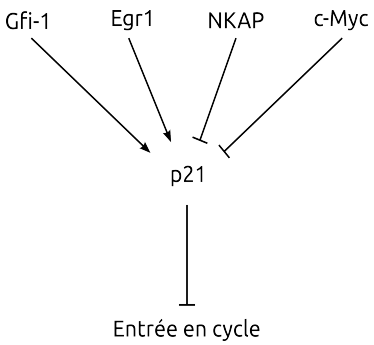


Figure 25. *p21*, intégrateur de signalisations régulant la quiescence des CSH

Modèle proposé pour la régulation de *p21* au sein des CSH. Les facteurs de transcription *Gfi-1*, *Egr1*, *NKAP* et *c-Myc* pourraient réguler *p21* dans les CSH, participant au contrôle de leur quiescence.

d'après Pietras et al., 2011

souris ont permis d'identifier des régulateurs du cycle cellulaire des CSH (pour revue, voir (Pietras et al., 2011). Il est intéressant de noter que les régulateurs de la quiescence peuvent être des régulateurs directs du cycle cellulaire (*p21*, *p57*…), des facteurs de transcription (*p53*, *MEF*…), des voies de signalisation moléculaires (la voie *PI3K/Akt*…), des voies développementales (Hedgehog, Wnt), des molécules d'adhésion (N-cadherine, ostéopontine…), des modificateurs post-transcriptionnels (*Fbw7*…) ou encore le caractère hypoxique de l'environnement (*cf.* Partie 1 : II.5.2) (Tableau 3). Ces multiples informations sont intégrées au sein de la CSH pour réguler sa quiescence. La Figure 24 détaille certains des mécanismes connus régulant la quiescence des CSH, je m'attarderai ici uniquement sur le rôle de *p21*.

p21 est un membre de la famille CIP/KIP des inhibiteurs des kinases dépendantes du cycle cellulaire (Figure 22). *p21* est une cible directe de *p53* activée suite à différents stress, et induisant l'arrêt du cycle. Le rôle de *p21* dans le maintien de la quiescence a été identifié grâce à l'étude de la souris $p21^{-/-}$ comme nous l'avons vu précédemment (Cheng, 2000). La délétion de *p21* induit une entrée en cycle corrélée avec des défauts d'auto-renouvellement et une sensibilité accrue à un stress myélotoxique. De façon similaire, la perte de *p21* induit une augmentation de la prolifération et des défauts d'auto-renouvellement des cellules souches neurales (Kippin et al., 2005). L'expression de *p21* a été trouvée modifiée dans plusieurs modèles génétiques affectant la quiescence des CSH (Figure 25). Ainsi, l'expression de *p21* est diminuée dans des CSH $Egr1^{-/-}$ et $Gfi1^{-/-}$ et augmentée dans les CSH $NKAP^{-/-}$ (Min et al., 2008; Hock et al., 2004a; Pajerowski et al., 2010). Ces changements dans l'expression de *p21* corrèlent avec une modification de l'entrée en cycle des CSH : les CSH $Egr1^{-/-}$ et $Gfi1^{-/-}$ entrent davantage en cycle, alors que les CSH $NKAP^{-/-}$ prolifèrent moins que des CSH contrôles. Des expériences de ChIP en cellules 293T ont révélé que NKAP était capable de se lier au promoteur de *p21*, réprimant ainsi son expression de façon indépendante de *p53*. Il est tentant de spéculer que *p21* explique au moins en partie les phénotypes sur la quiescence des CSH $Egr1^{-/-}$, $Gfi1^{-/-}$, $NKAP^{-/-}$. L'étude de ces mutants dans un fond génétique $p21^{-/-}$ permettra de valider ou d'infirmer cette hypothèse. Par ailleurs, il a été montré que le facteur de transcription *c-Myc* régulait négativement l'expression de *p21* dans des lignées de cellules hématopoïétiques (Wu et al., 2003). On sait que *c-Myc* est exprimé faiblement dans les CSH, son expression augmente dans les progéniteurs immatures (Wilson et al., 2004). Ainsi, l'expression de *c-Myc* pourrait favoriser la prolifération des progéniteurs *via* l'inhibition de *p21*. A nouveau, ici, des expériences supplémentaires aideront à appréhender la régulation de *p21* par *c-Myc in vivo* dans les CSH et les progéniteurs. Malgré le caractère préliminaire de certaines de ces données, on peut penser que *p21* joue un rôle d'intégrateur de signaux au sein des CSH en interagissant avec d'autres facteurs, pour réguler l'équilibre entre la quiescence et la prolifération.

2.2.2. Une régulation active de la quiescence

Lorsqu'on s'intéresse à la régulation de la quiescence des CSH, on peut s'étonner que la grande majorité des molécules et voies de signalisation identifiées jusqu'à aujourd'hui sont des régulateurs positifs de la quiescence (Tableau 3). L'équipe d'I.Weissman a comparé les analyses transcriptomiques de CSH homéostatiques, avec des CSH ayant subi un traitement qui induit leur mobilisation, avec des progéniteurs immatures, et avec des CSH leucémiques (Forsberg et al., 2010). Les auteurs ont identifié particulièrement un réseau de gènes et de voies de signalisation activés dans les CSH quiescentes et réprimés dans les CSH non quiescentes ou les progéniteurs. Ces données mettent en évidence l'existence d'une importante signalisation régulant positivement la quiescence des CSH et inhibant leur prolifération, et suggèrent que la différenciation pourrait être le destin par défaut des CSH.

L'étude des protéines Polycomb soutient ce modèle. En effet, les délétions de *Bmi1* ou de *Mel18* sont associées avec des défauts d'auto-renouvellement des CSH (Park et al., 2003; Kajiume et al., 2004). Il est proposé que les protéines Polycomb participent au maintien de l'auto-renouvellement en réprimant des gènes impliqués dans la spécification des lignages ou la mort cellulaire (Akala and Clarke, 2006). Ainsi, ces études suggèrent également que la différenciation pourrait être la voie par défaut des CSH, et qu'une régulation active est requise pour le maintien de leur fonction, principalement de leur auto-renouvellement dans le cas des Polycomb.

2.2.3. Une régulation spécifique de la quiescence

Il est intéressant de noter que parmi les régulateurs du cycle cellulaire dans les CSH, plusieurs ne régulent pas, ou ont un effet opposé sur la régulation du cycle d'autres cellules hématopoïétiques. Les quelques exemples présentés ci-dessous illustrent ce propos. *Gfi1* est un répresseur transcriptionnel, connu comme oncogène dans les cellules lymphoïdes. En effet, le locus *Gfi1* est un site fréquent d'intégration rétrovirale participant au développement de tumeurs lymphoïdes chez la souris. De plus, *Gfi1* agit comme activateur de la prolifération dans les cellules T, et effectivement, les cellules du thymus des souris $Gfi1^{-/-}$ présentent une diminution de la prolifération (Hock et al., 2004a). De façon étonnante, il a été montré que dans les CSH, *Gfi1* restreignait la prolifération des CSH et était nécessaire au maintien de leurs fonctions. L'étude de la mutation conditionnelle de *Mll* dans le système hématopoïétique apporte des données similaires. Membre d'un complexe de régulation épigénétique, *Mll* régule la prolifération des cellules hématopoïétiques (Jude et al., 2007). Les progéniteurs myéloérythroïdes $Mll^{-/-}$ présentent une diminution de la prolifération *in vitro*, alors que les CSH $Mll^{-/-}$ entrent en cycle. Enfin, la délétion des facteurs *FoxO1*, *FoxO3* et *FoxO4* ou du facteur *FoxO3a* seul induit des défauts de la régulation du cycle cellulaire des CSH, alors que la prolifération des progéniteurs myéloïdes n'est pas affectée (Tothova et al., 2007; Miyamoto et al., 2007).

Ces exemples parmi d'autres illustrent le fait que la régulation du cycle cellulaire est différente en fonction des lignages et du stade de différenciation des cellules hématopoïétiques. La quiescence étant une propriété importante des CSH et non des progéniteurs, ce résultat n'est peut être pas surprenant, néanmoins, ces études permettent de mettre le doigt sur des régulations spécifiques du cycle cellulaire dans les CSH.

2.2.4. Potentielles applications de ces connaissances sur la régulation de la quiescence

Comprendre la régulation de la quiescence des CSH peut apporter des éléments sur la physiopathologie de nombreuses maladies. En effet, plusieurs facteurs régulateurs intrinsèques de la quiescence des CSH ont été trouvés associés à des leucémies (Li, 2011). Des fusions entre les facteurs *FoxO* et le régulateur *Mll* sont par exemple associées avec des leucémies myéloïdes aigues (Tothova et al., 2007). De plus, l'étude de la régulation de la quiescence des CSH étonne par la présence de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs, parmi lesquels *PTEN*, l'ubiquitine ligase *Fbw7*, *Tsc* et les membres de la famille *Rb*. Il a été observé que la délétion de certains gènes régulant la quiescence induit une augmentation transitoire de la population de CSH. Il est possible que cette population accrue soit une cible plus importante pour des mutations oncogéniques participant au développement des leucémies.

2.3. La quiescence, moyen de protection contre différents stress ?

Pourquoi les CSH sont-elles quiescentes ? Depuis longtemps, il a été proposé que la quiescence pourrait être un moyen de protection contre différents stress, permettant de protéger la CSH tout au long de la vie de l'individu. De toute évidence, une situation de quiescence permet de s'affranchir du stress lié à la réplication. Nous verrons que la propriété de quiescence peut alors être à double tranchant, puisqu'elle ne permet pas une réponse fidèle face aux lésions survenant dans les CSH (*cf.* Partie 1 : II.4.2). Lorsqu'elle est associée à un état métaboliquement inactif, comme c'est le cas pour les CSH quiescentes et encore plus pour les CSH dormantes, la quiescence est aussi corrélée avec un niveau de stress oxydatif réduit, important pour le maintien des propriétés des CSH (*cf.* Partie 1 : II.5.3). Enfin, les cellules quiescentes sont également plus résistantes à des agents cytotoxiques, comme des rayonnements ultraviolets ou des radiations ionisantes, ainsi qu'à des agents chimiques, dont les conséquences affectent principalement les cellules en phase S ou M du cycle cellulaire (Suda et al., 2011). Ainsi, il semble que la quiescence participe de plusieurs manières au maintien des CSH et de leur intégrité génétique.

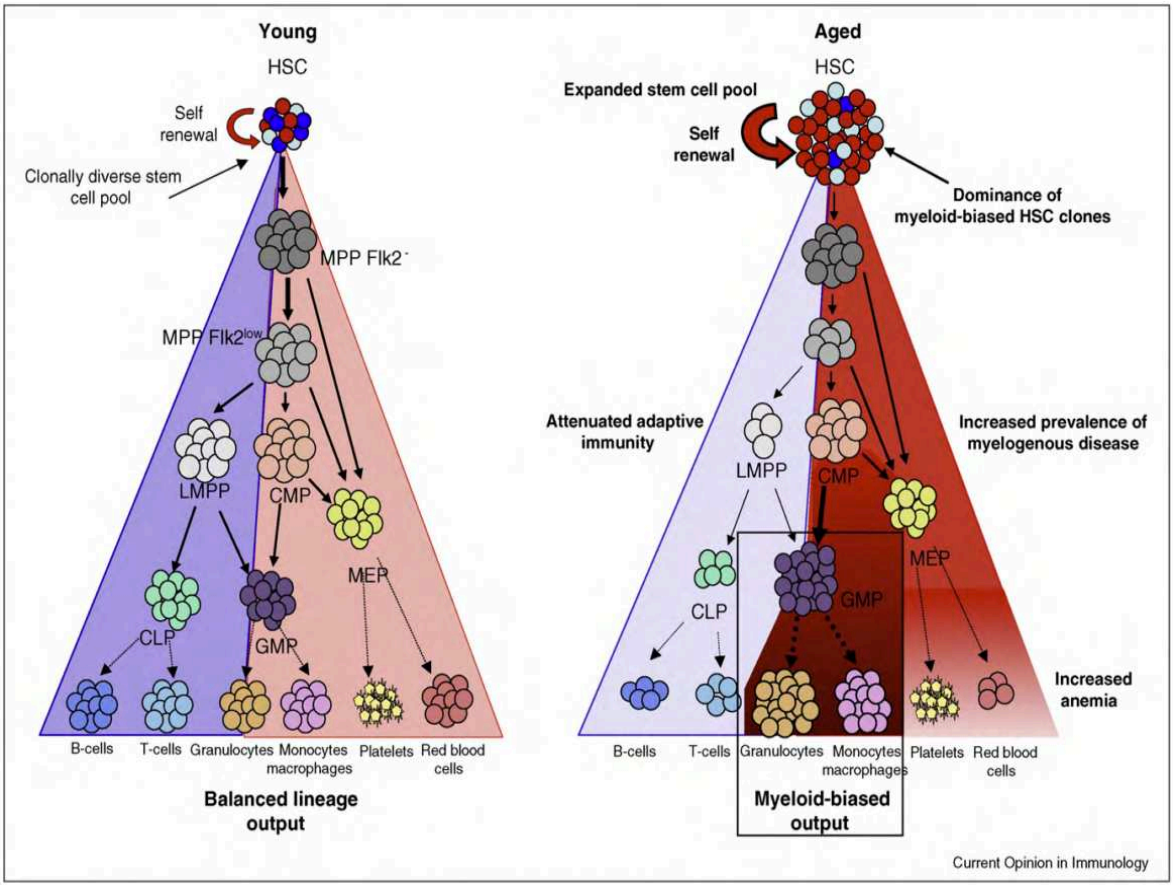


Figure 26. Modèle du vieillissement du système hématopoïétique

A gauche est représentée une vue simplifiée du système hématopoïétique d'un individu jeune. Les impacts du vieillissement sur le système sont présentés à droite. L'augmentation du nombre de CSH s'accompagne d'une sélection de CSH au potentiel biaisé vers le lignage myéloïde et à l'auto-renouvellement réduit. Ces données cellulaires peuvent expliquer les phénotypes macroscopiques observés, à savoir des défauts de l'immunité adaptative, un risque accru de leucémies myéloïdes et des anémies.

d'après Beerman et al., 2010

3. Le vieillissement au sein du système hématopoïétique

3.1. Définitions

Inéluctablement, l'organisme et chaque cellule qui le compose sont soumis au temps. Quand on s'intéresse au vieillissement, il est nécessaire de prendre en compte ce facteur pour deux raisons. La première raison est que les dommages et les stress subis par une cellule peuvent s'accumuler avec le temps et modifier ses propriétés. En effet, au niveau cellulaire, on peut voir le vieillissement comme la résultante des dommages auxquels la cellule a été soumise. Les causes du vieillissement au niveau moléculaire, en particulier les dommages à l'ADN et le stress oxydatif, seront abordées dans des parties suivantes. La seconde raison de prendre en compte le temps est que la durée de vie nécessite une organisation qui permette le maintien des tissus sur du long terme. Ainsi, au niveau du tissu, le vieillissement peut être défini comme la diminution de la capacité à maintenir l'homéostasie, ou à répondre à un stress pour rétablir une situation d'homéostasie. Comme les cellules souches sont responsables du maintien de l'homéostasie des tissus, il a été postulé que la déplétion des cellules souches ou la diminution de leur activité pouvait contribuer au vieillissement.

Au sein du système hématopoïétique murin, les deux caractéristiques les plus marquantes du vieillissement que je vais détailler ici sont d'une part une augmentation du nombre de CSH accompagnée d'une diminution du potentiel de recolonisation de ces CSH, et d'autre part, un biais de différenciation vers le lignage myéloïde (Figure 26). Il est intéressant de remarquer que ces caractéristiques sont cohérentes avec les phénotypes macroscopiques observés au cours du vieillissement chez l'homme : une diminution du système immunitaire adaptatif et une forte incidence des leucémies myéloïdes. Les différentes études utilisent des souris d'âge variable ; pour simplifier, j'appellerai souris « jeunes » des souris de quelques mois et souris « âgées » des souris de 12-24 mois.

3.2. L'augmentation du nombre de CSH, une caractéristique bien documentée du vieillissement

Dans une moelle âgée comme dans une moelle jeune, les cellules hématopoïétiques possédant des propriétés de recolonisation se trouvent parmi les cellules LSK $CD34^-$ $Flk2^-$, indiquant que les marqueurs de surface, ou tout du moins ceux-là, ne sont pas altérés avec l'âge (Rossi et al., 2005). Ainsi, plusieurs équipes ont utilisé différentes combinatoires de marqueurs pour quantifier les CSH : au cours du vieillissement, on observe une augmentation -allant d'un facteur 5 à 17- du nombre de CSH exprimant des marqueurs phénotypiques connus (Morrison et al., 1996b; Sudo et al., 2000; Rossi et al., 2005; Dykstra et al., 2011). De façon intéressante, des variabilités sur la fréquence des CSH ou leur prolifération ont été observées, en fonction des lignées de souris utilisées (de Haan et al., 1997).

Une remarque importante s'impose ici : les tests fonctionnels peuvent mettre en évidence la capacité de recolonisation de la moelle totale, ou d'une CSH individuelle. Etant donné l'augmentation

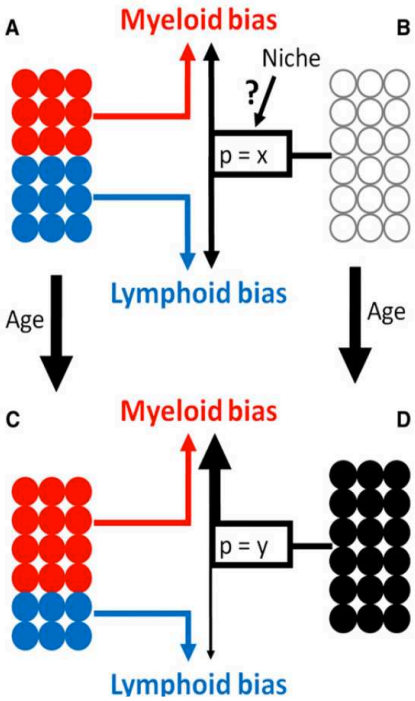


Figure 27. Deux modèles pour expliquer le biais de différenciation au cours du vieillissement

B. La différenciation des CSH peut être stochastique et liée à des signaux extrinsèques. **D**. Au cours du vieillissement, des changements homogènes de l'ensemble de la population induiront un biais vers la différenciation myéloïde. **A**. Le modèle alternatif est de considérer deux sous-populations de CSH (rouge et bleue) avec des potentiels de différenciation intrinsèquement biaisés. **C**. Au cours du vieillissement, une sélection clonale des CSH à fort potentiel myéloïde pourra expliquer le phénotype observé.

d'après Schroeder, 2010

du nombre de CSH, ces résultats peuvent différer. En effet, au cours du vieillissement, il a été montré que l'activité de recolonisation de la moelle totale augmente (de Haan et al., 1997; Sudo et al., 2000), alors que ce potentiel par CSH définie phénotypiquement par l'expression de marqueurs diminue (Rossi et al., 2005; Morrison et al., 1996b; Dykstra et al., 2011; Beerman et al., 2010). On peut donc conclure que les CSH individuellement sont affectées par le vieillissement, mais l'homéostasie de la moelle osseuse est maintenue, et rares sont les cas de déplétion hématopoïétique drastique au cours du vieillissement non pathologique, chez l'homme ou chez la souris (Woolthuis et al., 2011).

Afin de savoir si l'augmentation du nombre de CSH est une caractéristique intrinsèque de la moelle âgée, l'équipe de I.Weissman a transplanté de le moelle totale jeune ou âgée dans un hôte jeune, et montre que l'augmentation du nombre des CSH âgées est une caractéristique transplantable et donc principalement intrinsèque aux cellules âgées (Rossi et al., 2005). Cependant, le phénotype observé 4 mois après transplantation est moins fort dans ces chimères que dans les souris âgées (facteur d'augmentation de 1.9 *versus* 6 respectivement). Ce type d'expérience ne permet pas tout à fait d'exclure un rôle potentiel de l'environnement, auquel les CSH sont soumises sur du long-terme.

Deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer cette augmentation. La première est que le contrôle de la population de CSH peut se montrer défectueux avec l'âge. Le nombre de CSH est en partie contrôlé par la niche, et notamment par le nombre d'ostéoblastes dans la niche (Zhang et al., 2003; Calvi et al., 2003). A noter que cette hypothèse n'explique pas le caractère intrinsèque du contrôle du nombre de CSH développé plus haut. La seconde hypothèse est qu'au contraire, le système hématopoïétique est sensible à la diminution du potentiel d'auto-renouvellement individuel des CSH, et un rétro-contrôle pourrait se mettre en place pour compenser cette perte d'efficacité par cellule en augmentant le nombre des CSH.

3.3. Un potentiel de différenciation tourné vers le lignage myéloïde, modèle de sélection clonale ?

Les études sur le vieillissement du système hématopoïétique ont mis en évidence depuis longtemps des défauts de lymphopoïèse, alors que la myélopoïèse est maintenue voire accrue chez la souris âgée (Sudo et al., 2000; Rossi et al., 2005). Ce déséquilibre a été attribué à un biais de différenciation des CSH. Sudo et al. décrivent la présence chez la souris âgée de CSH avec un fort potentiel myéloïde, mais dépourvues de potentiel de différenciation vers le lignage lymphoïde (Rossi et al., 2005). Il a été suggéré que le vieillissement des CSH au niveau cellulaire pouvait se manifester par une atteinte progressive de chaque CSH dans son potentiel de différenciation, une cellule âgée ayant moins de propension à s'engager dans le lignage lymphoïde (Figure 27.B et D). Cependant, le modèle admis aujourd'hui est un modèle de sélection clonale, détaillé ici. Le biais dans la différenciation observé au cours du vieillissement peut s'expliquer en tenant compte de l'hétérogénéité des CSH (*cf.* Partie 1 : I.5.3). En effet, des études récentes suggèrent que l'expansion sélective des

CSH biaisées vers le lignage myéloïde est une des bases cellulaires du vieillissement hématopoïétique (Challen et al., 2010; Beerman et al., 2010). Dans ce modèle, les propriétés individuelles des différents sous-clones de CSH ne sont pas modifiées avec l'âge, mais leurs proportions relatives peuvent expliquer les phénotypes observés (Figure 27.A et C). Les deux modèles (défauts intrinsèques dans chaque CSH ou sélection clonale) ne sont pas tout à fait exclusifs, et il est justifié de considérer le modèle clonal avec aussi une altération progressive de la capacité de recolonisation des CSH avec l'âge.

Une analyse transcriptomique de CSH jeunes *versus* des CSH âgées révèle effectivement l'extinction de l'expression d'un programme de gènes associés à la spécification lymphoïde, au profit de gènes associés à la myélopoïèse (Rossi et al., 2005). De plus, des CSH transplantées plusieurs fois de suite gardent leur spécificité de différenciation (Challen et al., 2010; Beerman et al., 2010), suggérant l'existence d'un programme intrinsèque aux CSH. Pourtant, ces résultats ne peuvent pas exclure un rôle de l'environnement. La communication entre les CSH et le milieu environnant, et particulièrement la réponse des CSH aux cytokines présentes dans le milieu, pourraient en effet expliquer la sélection clonale observée au sein de la population de CSH en fonction de leurs potentiels de différenciation. En effet, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que le TGF-β1 stimule la prolifération des CSH biaisées vers le lignage myéloïde, alors qu'il inhibe les CSH biaisées vers le lignage lymphoïde (Challen et al., 2010). Ce résultat permet d'imaginer des mécanismes moléculaires expliquant la sélection clonale observée. La source du TGF-β1 n'a pas été clairement identifiée, mais il est possible que la concentration de cette cytokine varie avec l'âge.

Les études sur le vieillissement du système hématopoïétique ont mis en évidence des défauts intrinsèques des CSH, et une sélection clonale des CSH biaisées vers le lignage myéloïde au cours de la vie de l'individu. Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces changements au sein de la CSH ne sont pas bien connus. Des effets extrinsèques sont probablement également impliqués, je soulignerai uniquement ici qu'il est proposé que les CSH âgées adhèrent moins bien à leur niche que les CSH jeunes (Köhler et al., 2009). L'accumulation des dommages à l'ADN non réparés, l'accumulation de mutations suite à des cassures réparées non fidèlement (*cf.* Partie 1 : II.4), ou l'accumulation de dommages induits par le stress oxydatif (*cf.* Partie 1 : II.5) peuvent être autant de mécanismes qui participent au déclin des CSH. Ces aspects sont abordés dans les paragraphes suivants.

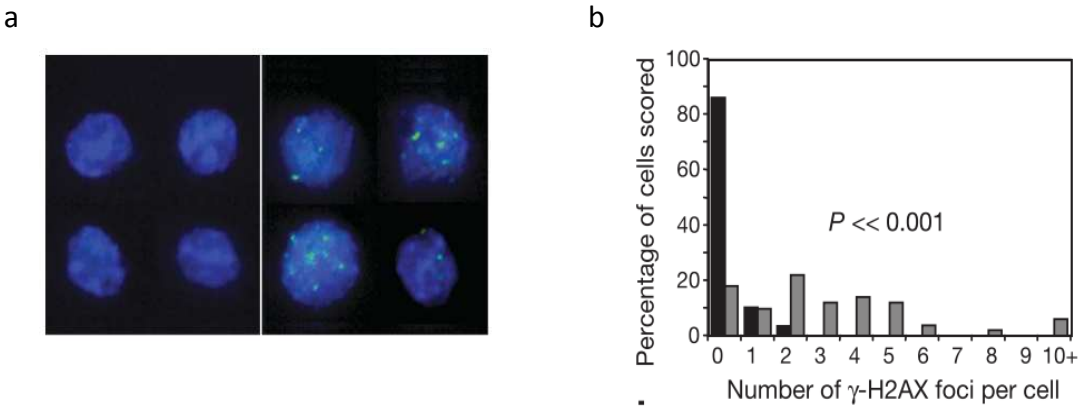


Figure 28. Accumulation de dommages dans les CSH avec l'âge

a. Des CSH de souris âgées de 10 semaines (à gauche) ou de 122 semaines (à droite) sont marquées au γ-H2AX. **b**. La distribution du nombre de foci γ-H2AX par CSH est indiquée dans les CSH des souris âgées de 10 semaines (histogramme noir) et dans les CSH des souris âgées de 122 semaines (histogramme gris).

d'après Rossi et al., 2007

4. La gestion des dommages à l'ADN

4.1. L'accumulation de dommages à l'ADN physiologiques : une atteinte spécifique des cellules souches au cours du temps

Revenons à présent aux défauts moléculaires qui participent au vieillissement au niveau de la cellule, et particulièrement à la cellule souche, garante du maintien du tissu sur du long terme. Dans cette partie, je vais m'intéresser aux dommages à l'ADN physiologiques, et à leurs effets sur les cellules souches au cours du temps. Les liaisons sucre-phosphate de l'ADN sont fréquemment affectées, provoquant des cassures double ou simple brin de l'ADN, et induisant l'activation des voies de réponse aux dommages à l'ADN. Cette réponse implique des senseurs des lésions, des médiateurs de l'information et des effecteurs permettant la gestion appropriée des dommages, *i.e.* la réparation du dommage, et/ou la neutralisation de la cellule par apoptose ou sénescence. Comme nous l'avons mentionné tout à l'heure, *p53* est un médiateur essentiel de cette réponse.

Des cassures double brin de l'ADN s'accumulent avec l'âge chez la souris et chez l'homme. Chez la souris, des foci γ-H2AX s'accumulent avec l'âge dans plusieurs organes et colocalisent avec des protéines de réparation des lésions de l'ADN comme RAD50 (Sedelnikova et al., 2004). Au cours du vieillissement, l'accumulation de lésions suggère la persistance de cassures double brin non réparées. De même, dans le système hématopoïétique, des foci γ-H2AX s'accumulent avec l'âge dans les CSH et les progéniteurs immatures (MPP) (Figure 28) (Rossi et al., 2007). Pourtant, ces foci ne sont pas visibles dans les progéniteurs plus engagés en prolifération (CLP, CMP), suggérant que ces cellules sont capables de réparer les cassures ou d'éliminer les cellules trop endommagées. Enfin, chez l'homme, une étude récente a mis en évidence pour la première fois l'accumulation de dommages à l'ADN dans les CSH et progéniteurs au cours du vieillissement (Rübe et al., 2011). Ces données suggèrent que l'accumulation des dommages à l'ADN dans les cellules souches pourrait être une composante principale du vieillissement.

4.1.1. Prendre en compte le temps qui passe -1- : les mécanismes de réparation de l'ADN sont essentiels dans les cellules souches

Les CSH expriment spécifiquement certains gènes impliqués dans des voies de réparation de l'ADN, pouvant suggérer des mécanismes particuliers de réparation de l'ADN dans ces cellules (Ramalho-Santos et al., 2002; Ivanova et al., 2002). Afin de tester la nécessité de ces mécanismes dans les cellules souches et pour savoir si l'accumulation des dommages est néfaste pour le maintien des cellules souches sur du long terme, de nombreuses équipes ont inactivé certains mécanismes de réparation de l'ADN et ont analysé les phénotypes induits.

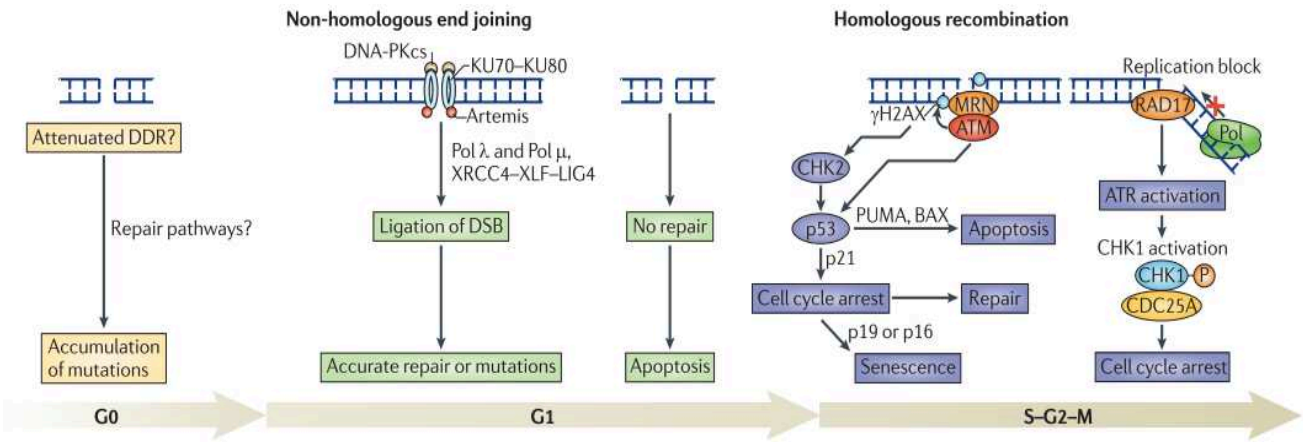


Figure 29. Voies de réparation des cassures double brin au cours du cycle cellulaire

Deux principales voies de réponse peuvent gérer les cassures double brin de l'ADN. Au cours de la phase G1, la voie NHEJ (pour Non Homologous End-Joining) prédomine, car ce mécanisme n'utilise pas de matrice d'ADN homologue. Brièvement, l'hétérodimère Ku70/Ku80 se fixe sur la cassure double-brin et forme un complexe avec des protéines kinases DNA-PK_{cs}. Ce complexe interagit avec plusieurs enzymes dont l'ADN ligase IV qui assure la ligation de l'ADN. Le NHEJ est enclin à générer de nouvelles mutations (délétions, insertions, mésappariements et translocations). Au cours des phases S/G2/M, la cellule utilise préférentiellement la recombinaison homologue. Les cassures sont reconnues par le complexe MRE11-RAD50-NBS1, qui recrute la kinase *ATM*. ATM phosphoryle alors le variant d'histone H2AX, pour marquer le site de la cassure. L'activation en aval de la kinase CHK2 et de p53 mène à un arrêt du cycle. Des blocages lors de la réplication activent la kinase ATR, et consécutivement Chk1, menant également à un arrêt du cycle. Enfin, les mécanismes de réparation dans des cellules quiescentes sont peu compris.

d'après Mandal et al., 2011

4.1.1.1. Des modèles de souris déficientes pour des mécanismes de réparation de l'ADN

Les cassures double brin de l'ADN sont gérées principalement par la recombinaison homologue et par la voie NHEJ (pour Non-Homologous DNA End-Joining) (Figure 29). Des défauts de fonctionnement de chacune de ces voies induisent des défauts de maintien des CSH. La recombinaison homologue peut être activée dans des cellules en S/G2/M. Les cassures sont reconnues par le complexe MRE11-RAD50-NBS1, qui recrute la kinase ATM. L'activation d'ATM permet la stabilisation de p53 et un arrêt du cycle. La délétion de la protéine ATM induit de graves défauts fonctionnels dans les CSH (Ito et al., 2004, 2006). En complément, la protéine RAD50 est également importante pour le maintien des CSH, de façon dépendante d'ATM (Bender et al., 2002; Morales et al., 2005). Le NHEJ est un mécanisme de réparation des cassures double-brin qui n'utilise pas de matrice d'ADN homologue ; il est donc utilisé dans les cellules quiescentes. Brièvement, l'hétérodimère Ku70/Ku80 se fixe sur la cassure double-brin et forme un complexe avec des protéines kinase DNA-PK_{cs}. Ce complexe interagit avec l'ADN ligase IV qui assure la ligation de l'ADN. Des modèles de souris déficientes pour les protéines Ku80, ou exprimant un allèle hypomorphe de l'ADN ligase IV $Lig4^{Y288C}$ ont été étudiés (Rossi et al., 2007; Nijnik et al., 2007). Des défauts fonctionnels des CSH sont mis en évidence par des expériences de transplantations compétitives. Par ailleurs, Nijnik et al. montrent que des cassures double-brin sont visibles et s'accumulent davantage dans les LSK $Lig4^{Y288C}$ que dans des LSK sauvages (Nijnik et al., 2007).

Les voies de réparation des mésappariements ou « Mismatch Repair » et la réparation par excision de nucléotides peuvent également participer à la gestion de certains dommages, en particulier suite à des réparations non fidèles. Des modèles de souris déficientes pour ces voies de réparation présentent des défauts d'auto-renouvellement des CSH, suggérant ainsi que les CSH nécessitent également ces modes de réponse aux dommages à l'ADN (Reese et al., 2003; Rossi et al., 2007).

4.1.1.2. L'anémie de Fanconi :

L'anémie de Fanconi est une maladie génétique, caractérisée par une grande hétérogénéité clinique, avec des symptômes tels qu'une aplasie médullaire sévère, des anomalies cutanées et développementales (pour revue, voir (Soulier, 2011)). Cette hétérogénéité clinique est accompagnée d'une hétérogénéité génétique, puisque 15 gènes *FANC* ont été identifiés chez des patients, ils participent à la voie de signalisation dite « FA ». Cette voie joue un rôle critique dans le maintien de l'intégrité du génome, en participant à la gestion des lésions qui bloquent la réplication de l'ADN. Récemment, un modèle de souris $FANCD2^{-/-}$ a mis en évidence des défauts des CSH déficientes pour la voie de réparation FA (Parmar et al., 2010; Zhang et al., 2010). Les souris $FANCD2^{-/-}$ présentent une déplétion progressive des CSH, probablement suite à des défauts de quiescence. Les CSH $FANCD2^{-/-}$ ont un auto-renouvellement réduit *in vitro* et *in vivo*. De plus, l'enzyme *USP1*, importante pour la régulation de la voie FA de par son rôle dans la désubiquitinylation de *FANCD2* est également requise pour le maintien des CSH (Parmar et al., 2010). Ces modèles indiquent que des déficiences

dans la régulation de la voie FA peuvent expliquer les défauts hématopoïétiques observés chez les patients. En plus des défauts hématopoïétiques, on peut noter que les patients atteints d'anémie de Fanconi présentent aussi des défauts cutanés et développementaux, pouvant suggérer une atteinte particulière des cellules à fort taux de renouvellement.

4.1.1.3. Conclusion

L'ensemble de ces études souligne l'importance des processus de réparation de l'ADN et donc du maintien de l'intégrité du génome pour la conservation des propriétés des cellules souches. De façon importante, de nombreux défauts observés dans les CSH déficientes pour ces mécanismes s'accentuent avec l'âge. Il est généralement admis que l'accumulation des dommages avec l'âge participe à un risque accru de cancer ; on peut par ailleurs mettre en relation cette accumulation avec le déclin progressif des cellules souches au cours du temps.

4.1.2. Prendre en compte le temps qui passe -2- : le complexe télomérase, gardien du maintien des télomères dans les cellules souches

4.1.2.1. Le maintien des télomères participe à l'intégrité du génome

Chaque division cellulaire induit un raccourcissement des télomères, séquences répétées aux extrémités des chromosomes. Lorsque le télomère devient trop court, son rôle protecteur ne serait plus assuré, et la cellule entre en apoptose ou en sénescence. Il est généralement admis que les télomères des cellules souches et donc leur intégrité génomique sont protégés activement par le complexe ribonucléoprotéique de la télomérase. L'enzyme transcriptase inverse de la télomérase est codée par le gène *Tert*, et assure la transcription de la séquence répétée des télomères à l'extrémité des chromosomes, à partir de la matrice contenue sur l'ARN *Terc*. Effectivement, dans le tissu hématopoïétique, la télomérase est active spécifiquement dans les CSH chez la souris (Morrison et al., 1996a). Il a également été montré que certaines cellules souches intestinales exprimaient l'enzyme transcriptase inverse de la télomérase, utilisée aujourd'hui comme marqueur de ces cellules (Montgomery et al., 2011).

On considère souvent le mécanisme d'érosion des télomères comme une horloge biologique, limitant le nombre de divisions d'une cellule. Les CSH, qui sont quiescentes, se divisent peu ; on observe pourtant une érosion des télomères avec l'âge chez l'homme, ou chez la souris, et au cours de transplantations successives (Vaziri et al., 1994; Allsopp et al., 2003). Enfin, il est intéressant de noter que les télomères chez la souris sont huit fois plus longs que chez l'homme, suggérant que des défauts de l'activité télomérase pourraient affecter différentiellement les individus de ces deux espèces. Ainsi, des questions sur le rôle et l'efficacité de la télomérase dans les CSH chez l'homme et chez la souris ont été posées.

4.1.2.2. Des modèles de souris pour l'étude du rôle de la télomérase dans les CSH

Le raccourcissement des télomères chez la souris n'est pas dû à une diminution de l'activité de la télomérase, celle-ci se maintenant au cours des transplantations (Allsopp et al., 2003). Une érosion progressive des télomères malgré la présence de la télomérase pourrait être associée à la sollicitation importante des CSH ; d'autres mécanismes participant à l'atteinte des télomères ou à leur maintien peuvent également être envisagés.

Des souris *Terc*$^{-/-}$ et *Tert*$^{-/-}$ ont été étudiées. Etonnamment, ces souris ne présentent pas de défauts visibles, suggérant que la perte des télomères n'est pas critique au cours de la vie de la souris à l'homéostasie (Rudolph et al., 1999; Allsopp et al., 2003). Cependant, des phénotypes apparaissent lorsque ces souris sont croisées entre elles sur plusieurs générations. Des souris *Terc*$^{-/-}$ de 6ème génération présentent des défauts d'homéostasie de plusieurs tissus et un manque d'efficacité de réponse à des stress variés (Rudolph et al., 1999). Au niveau du système hématopoïétique, des défauts d'auto-renouvellement sont observés dans les CSH *Terc*$^{-/-}$ dès la 3ème génération, et également dans les CSH *Terc*$^{-/-}$ ou *Tert*$^{-/-}$ soumises à des transplantations successives (Rossi et al., 2007; Allsopp et al., 2003). Le rôle limitant de la télomérase chez la souris se manifeste donc uniquement suite à des sollicitations accrues des CSH. Ces modèles murins ont permis d'observer que la perte du potentiel d'auto-renouvellement était associée à l'érosion des télomères, suggérant l'importance des télomères dans le maintien des propriétés des CSH (Rossi et al., 2007; Allsopp et al., 2003). Le déclin progressif des CSH au cours de la vie de l'individu pourrait être lié en partie à la réduction de la taille de leurs télomères. Cependant, si et par quels mécanismes moléculaires la longueur des télomères régule les CSH n'est pas compris aujourd'hui.

Enfin, l'équipe de M.Blasco a développé une souris exprimant trois doses de télomérase, dite « super-mice ». Cette souris vit plus longtemps et « plus en forme », suggérant qu'une augmentation de l'activité télomérase pourrait avoir un effet positif sur le vieillissement (M.Blasco, communication au colloque du club des Belles Souris, 2012). Au vu des résultats précédents, il serait intéressant d'évaluer l'auto-renouvellement des CSH de ces souris au cours du vieillissement ou lors de transplantations successives.

4.1.2.3. Des maladies liées à des défauts de l'activité télomérase

Le rôle de l'activité télomérase est également mis en évidence par l'étude de pathologies humaines qui y sont associées.

La dyskératose congénitale est une maladie rare se caractérisant par des atteintes cutanées, des défauts de développement et une atteinte médullaire, et notamment une diminution des progéniteurs, qui peut être fatale (pour revue, voir (Hoareau-aveilla et al., 2008)). Plusieurs modes de transmission ont été identifiés, et des mutations dans les gènes codant pour la transcriptase inverse de la télomérase *hTERT* ou dans l'ARN composant de la télomérase *hTERC*, ainsi que dans les gènes codant pour la *dyskérine* ou *Nop10* ont été identifiées. La protéine NOP10 pourrait jouer un rôle dans l'assemblage

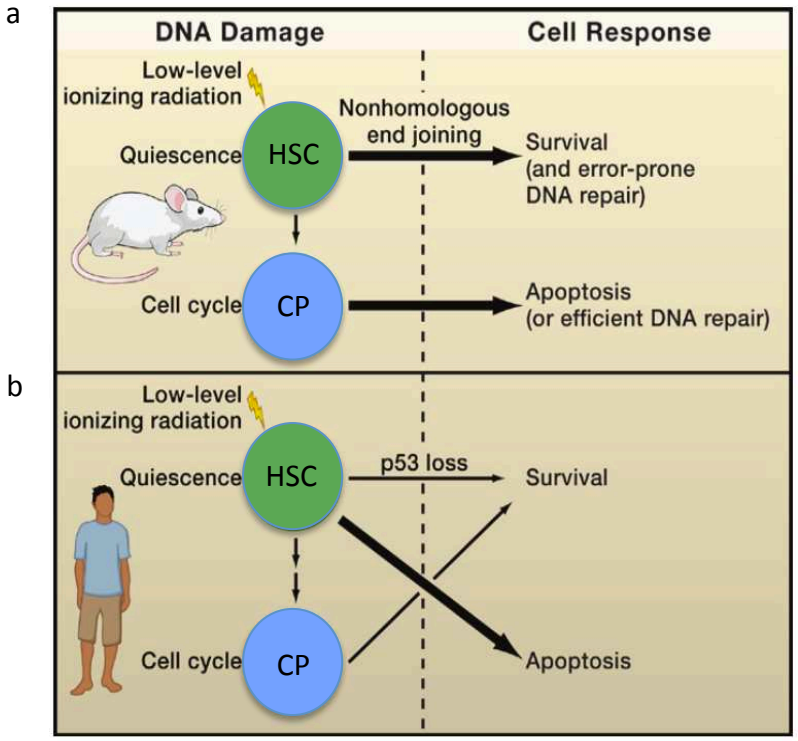


Figure 30. Comparaison des réponses des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques chez l'homme et chez la souris

a. Les CSH murines survivent aux dommages à l'ADN créés par une faible dose d'irradiation. Elles mettent en place efficacement la voie de réparation NHEJ, prompte à générer des erreurs. Contrairement aux CSH, les progéniteurs myéloïdes (CP pour Common Progenitors) utilisent plutôt des mécanismes de réparation fidèles, comme la recombinaison homologue, mais sont sensibles à l'apoptose suite à ces dommages à l'ADN. **b**. Chez l'homme, les CSH résistent moins et entrent en apoptose suite à des dommages, alors que les progéniteurs sont moins affectés. L'apoptose induite dans les CSH est dépendante de *p53*, car la délétion de *p53* protège efficacement les CSH de l'apoptose.

d'après Lane et Scadden, 2010

ou la stabilisation du complexe de la télomérase ; la dyskérine intervient dans le complexe de la télomérase. L'hypothèse que la déficience de l'activité télomérase est responsable des phénotypes observés dans cette maladie apparaît pertinente, mais reste encore à démontrer formellement. La corrélation observée entre la taille des télomères et la sévérité du phénotype clinique tend à consolider ces prédictions (Alter et al., 2007). La dyskérine participe aussi à des modifications post transcriptionnelles de l'ARNr, c'est pourquoi la dyskératose congénitale liée à cette mutation est également classée au sein des ribosomopathies, sujet abordé dans la seconde partie de cette introduction (*cf.* Partie 2 : 3.2.1).

Il est maintenant établi que la télomérase est un acteur clé de l'oncogenèse. En effet, des défauts du maintien des télomères sont associés à une instabilité génomique, qui pourrait contribuer à l'initiation et à la progression de tumeurs. A l'inverse, l'activation de la télomérase dans les cellules cancéreuses est requise pour le maintien et la croissance à long-terme (pour revue, voir (Brunori and Gilson, 2005)). Les rôles suppresseur de tumeur et oncogène de la télomérase font actuellement l'objet d'intenses recherches.

4.2. Une gestion des dommages à l'ADN spécifique dans les cellules souches suite à des stress aigus

Nous avons vu que les CSH sont particulièrement sensibles à l'accumulation au cours du temps des dommages à l'ADN physiologiques consécutive à des défauts dans les voies de réparation ou à une inactivation de la télomérase. Récemment, des données ont été publiées sur les capacités de réponses dans les cellules souches suite à des stress aigus. Suite à une irradiation, des lésions de l'ADN sont effectivement créées au sein des cellules souches aussi bien que dans les cellules différenciées (Inomata et al., 2009; Mohrin et al., 2010; Sotiropoulou et al., 2010). Les cellules souches ne sont donc pas protégées de ces lésions ni par des caractéristiques intrinsèques ni par leur environnement. Cependant, comme nous allons le voir, elles mettent en place des mécanismes particuliers de réponse à ces dommages. Ces réponses peuvent être spécifiques des cellules souches au sein d'un tissu, et peuvent différer d'un tissu à l'autre ; elles peuvent définir la cellule souche en participant au maintien de ses propriétés.

4.2.1. La survie régulée des cellules souches

L'équipe d'E.Passégué a analysé la réponse des CSH et des progéniteurs chez la souris suite à une faible dose d'irradiation (2Gy) (Mohrin et al., 2010). De façon surprenante, les CSH sont plus résistantes à l'apoptose que les progéniteurs myéloïdes (Figure 30.a). En absence de la protéine *ATM*, toutes ces populations présentent une sensibilité équivalente, suggérant que la protéine *ATM* est impliquée dans cette réponse différentielle. Cette étude montre que l'induction de la réponse aux dommages *via ATM* et *p53* induit un arrêt du cycle, une expression forte du gène anti-apoptotique *Bcl-*

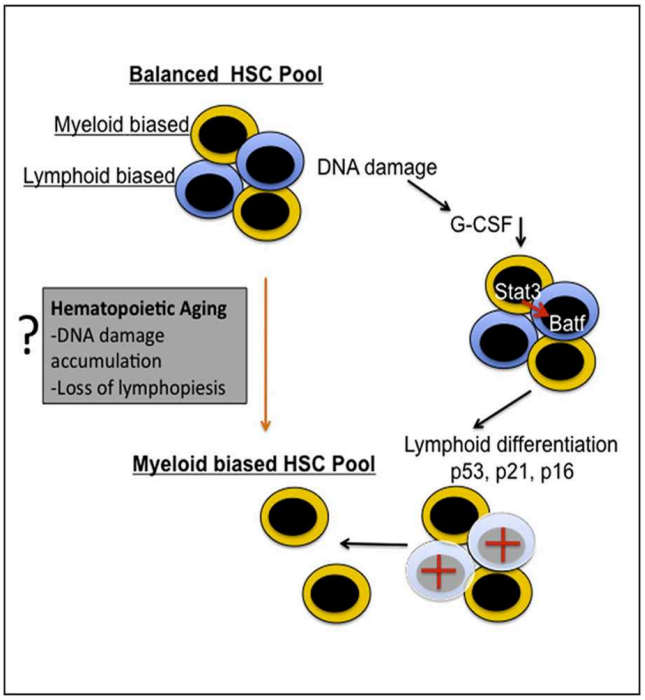


Figure 31. Modèle de différenciation des CSH en réponse à une irradiation

Suite à des dommages à l'ADN, *Batf* est induit par des voies dépendantes de *G-CSF* et *Stat3*. Un point de contrôle est alors activé et induit *p53* et les régulateurs *p16* et *p21*, et provoque la différenciation lymphoïde des CSH, et prioritairement la différenciation des CSH biaisées vers le lignage lymphoïde. Ce mécanisme de différenciation peut illustrer comment l'accumulation de dommages aboutit à des défauts de lymphopoïèse suite à la disparition des CSH biaisées vers le lignage lymphoïde.

d'après Wang et al., 2012

2, et une réparation des dommages par la voie NHEJ. Il faut noter de plus que même après activation, *in vitro* ou *in vivo*, les CSH restent plus résistantes à l'apoptose que les progéniteurs, suggérant que des mécanismes intrinsèques autres que la quiescence participent à la protection des CSH.

Afin d'observer la réponse induite par une irradiation dans des cellules hématopoïétiques humaines, des CSH et des progéniteurs ont été triés à partir de sang de cordon (Milyavsky et al., 2010). Les CSH humaines meurent par apoptose davantage que les progéniteurs, et elles réparent moins vite les lésions double brin. Cette sensibilité est liée à une forte activation de la voie *p53* dans les CSH et une forte expression de *ASPP1*, un régulateur moléculaire de l'apoptose induite par *p53* (Figure 30.b). Ainsi, chez l'homme, les CSH sont plus soumises à l'apoptose, et la réparation des lésions est retardée. Contrairement à cela, les CSH murines sont plus résistantes à l'apoptose, et mettent en place efficacement le NHEJ pour réparer les lésions. Ces résultats sont très divergents, et peuvent avoir plusieurs causes. Au delà des différences expérimentales liées aux modèles, il est pertinent de remarquer que les cellules de cordon et les cellules de moelle osseuse n'ont pas le même âge, et leur localisation anatomique est différente. Des études approfondies aideront à comprendre si les réponses aux dommages à l'ADN sont influencées par l'âge et/ou par des signaux extrinsèques provenant de la niche.

La même année, C.Blanpain et son équipe ont analysé la résistance des cellules souches du follicule pileux suite à une irradiation (Sotiropoulou et al., 2010). Les réponses induites dans ces cellules souches sont comparables à celles induites dans les CSH chez la souris : le résultat est une résistance accrue à l'apoptose. Cette résistance est obtenue grâce à une expression forte de *Bcl-2* et une activation uniquement transitoire de *p53*, alors que la réponse *p53* est induite plus durablement dans les autres cellules épidermiques. Notons que ces cellules souches, quiescentes, activent la voie NHEJ, comme les CSH.

4.2.2. La différenciation, comme réponse aux dommages à l'ADN

Suite à des dommages, la différenciation est aussi une réponse utilisée par les cellules souches. Au sein du système hématopoïétique, une étude vient de montrer qu'en réponse à une irradiation ou à des raccourcissements des télomères, un point de contrôle, dépendant du facteur de transcription *Batf*, est activé (Figure 31) (Wang et al., 2012). Une élégante utilisation d'un rapporteur sous contrôle du promoteur *IL7-R* indique que les CSH tendent alors à se différencier vers le lignage lymphoïde, et perdent leur capacité de recoloniser tous les lignages sur du long-terme. Ces données rappellent un des phénotypes observés au cours du vieillissement, à savoir la diminution du potentiel de différenciation vers le lignage lymphoïde (*cf.* Partie 1 : II.3). Au vu de ces résultats, on peut supposer qu'au cours du vieillissement, tout comme suite à une irradiation, une différenciation lymphoïde touche prioritairement les CSH biaisées vers le lignage lymphoïde, provoquant la disparition progressive de ces CSH, et aboutissant par la suite à des défauts de différenciation lymphoïde au profit de la différenciation myéloïde.

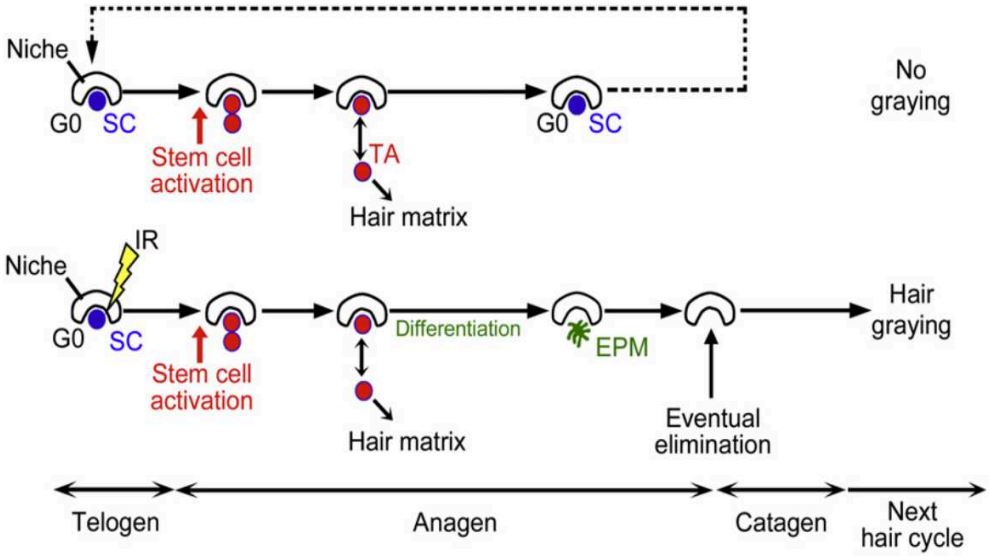


Figure 32. Modèle de différenciation des cellules souches mélanocytaires suite à un stress génotoxique

Les cellules souches mélanocytaires sont maintenues dans un état immature au cours des cycles dans des conditions physiologiques (voir en haut). Suite à des stress génotoxiques irréversibles, la cellule souche mélanocytaire se différencie de façon ectopique en mélanocyte pigmenté (EPM), éliminé au cours de la phase anagène tardive. De tels défauts d'auto-renouvellement induisent le blanchissement du poil lors des cycles suivants. SC : Stem Cell ; TA : Transit Amplifying

d'après Inomata et al., 2009

Par ailleurs, après une irradiation de 5Gy, une différenciation prématurée des cellules souches mélanocytaires est induite au sein de leur niche, provoquant un blanchiment du poil (Figure 32) (Inomata et al., 2009). Un phénotype similaire est observé suite à des traitements par des réactifs génotoxiques (peroxyde d'hydrogène, Mytomicine C, busulfan) et dans la souris $XPD^{R722W/R722W}$ déficiente pour la réparation de l'ADN par excision de nucléotides, suggérant que la différenciation des mélanoblastes pourrait être un mécanisme général de maintien de l'intégrité des cellules souches mélanocytaires suite à divers dommages.

Les cellules ES présentent également une propension à se différencier suite à des dommages à l'ADN. Une exposition aux UV ou un traitement à l'adriamycine induit la différenciation des ES, de façon dépendante de *p53*. En effet, *p53* peut se lier directement sur le promoteur de Nanog, gène clé de l'auto-renouvellement, et réprimer son expression (Lin et al., 2005). De plus, suite à des dommages à l'ADN, *p53* est stabilisé et permet l'activation de gènes associés à la différenciation, et la répression des gènes associés à l'auto-renouvellement dans les cellules ES (Li et al., 2012). On peut considérer que *p53* participe au maintien de la stabilité génétique en induisant la différenciation des cellules ES en d'autres types cellulaires susceptibles de subir un arrêt du cycle dépendant de *p53* et éventuellement l'apoptose, deux processus qui ne sont pas efficaces dans les ES indifférenciées.

4.2.3. Des réponses des cellules souches contribuant à la physiologie du tissu

Dans les cellules quiescentes, les cassures double brin sont prises en charge par la voie NHEJ. Préalablement activée à un fort niveau basal en conditions d'homéostasie, la voie NHEJ est présentée comme une réponse à double tranchant : elle permet une réponse rapide et une survie à court terme des CSH et des cellules souches du follicule pileux chez la souris, néanmoins, ce mode de réparation est peu fidèle et est enclin à apporter des modifications génomiques (Sotiropoulou et al., 2010; Mohrin et al., 2010). Ainsi, la survie des cellules souches peut se faire aux dépens du maintien de l'intégrité du génome.

Ces études ont apporté des informations sur la réponse des cellules souches principalement suite à une irradiation γ (ou suite au traitement par divers agents génotoxiques pour les mélanoblastes). En particulier, dans le système hématopoïétique, la résistance à l'apoptose des CSH est observée suite à une irradiation de 2Gy, et une irradiation de 4Gy active le point de contrôle de différenciation lymphoïde des CSH (Mohrin et al., 2010; Wang et al., 2012). Ces réponses ne sont pas forcément exclusives, il sera intéressant d'élargir ces études à différents types et doses de stress afin d'analyser les réponses de plusieurs types de cellules souches. Les réponses induites par ces dommages peuvent différer en termes de voies de réparation impliquées. Les CSH et les cellules souches du follicule pileux utilisent le NHEJ suite à une irradiation. Les souris déficientes pour la réparation par excision de nucléotides ou la réparation des mésappariements présentent des défauts du maintien des CSH et des cellules souches mélanocytaires, suggérant que les cellules souches utilisent également ces voies pour réparer les lésions de l'ADN, dans un contexte de stress physiologique (*cf.* Partie 1 : II.4.1.1.1 ;

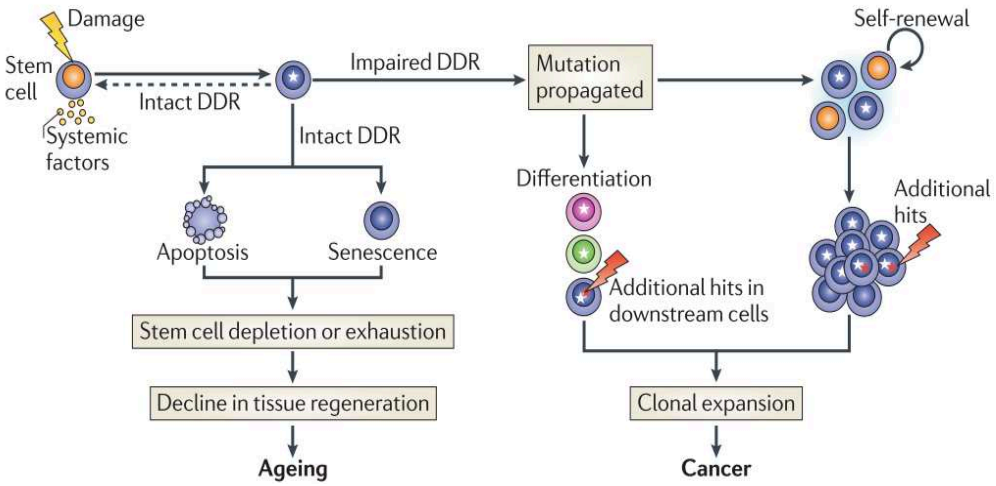


Figure 33. Impact des dommages à l'ADN sur les cellules souches, et implication dans les processus de vieillissement et de tumorigenèse

Les dommages à l'ADN dans les cellules souches induisent l'activation de la machinerie de réparation des dommages. Si celle-ci est efficace, les dommages sont réparés, ou la cellule endommagée est supprimée par apoptose ou sénescence. Une élimination prédominante des cellules au cours de la vie de l'individu mènera à une déplétion des cellules souches et à des processus de vieillissement. Si des dommages ne sont pas repérés, ou sont mal réparés, des mutations s'accumuleront. Des mutations conférant un avantage sélectif au sein de la population des cellules souches ou des progéniteurs pourront être amplifiées par des mécanismes d'expansion clonale, donnant naissance à de plus larges populations susceptibles de subir des événements oncogéniques supplémentaires, et finalement aboutissant à des processus de tumorigenèse. Les dommages à l'ADN sont représentés par une étoile dans le noyau.

d'après Mandal et al., 2011

Partie 1 : II.4.2.2). Enfin, l'état cellulaire induit -différenciation, apoptose ou sénescence- semble également être dépendant du type de dommage, de la dose appliquée, et de la nature des cellules souches analysées.

La réponse des cellules souches aux dommages à l'ADN et notamment le seuil de sensibilité à l'apoptose contribuent à la physiologie du tissu. Ainsi, un seuil bas réduit le risque d'accumuler des mutations, mais affecte la régénération du tissu. Au contraire, une forte résistance à l'apoptose permet de maintenir le tissu, mais augmente les risques de mutagenèse. L'induction de la sénescence ou de la différenciation peut permettre sur du court terme de maintenir l'architecture et le fonctionnement du tissu, tout en ôtant le potentiel d'auto-renouvellement à la cellule endommagée. Ces différentes réponses doivent permettre d'assurer un juste équilibre entre le vieillissement et le risque de cancer, entre le maintien à tout prix de l'intégrité du génome et le maintien à tout prix des cellules souches (Figure 33) (pour revue, voir (Mandal et al., 2011)).

5. L'oxygène et les CSH : adaptation à l'environnement hypoxique et gestion du stress oxydatif

Comme nous allons le voir, les CSH sont particulièrement sensibles au stress oxydatif. Afin de s'en protéger, deux stratégies peuvent être considérées. La première est de placer les CSH dans un environnement hypoxique et d'y maintenir une faible activité métabolique, afin de limiter la génération de ROS. La seconde est de doter les CSH de réponses anti-oxydantes spécifiques et efficaces pour lutter contre la toxicité induite par les ROS néanmoins présents. Ces deux stratégies semblent être à l'œuvre au sein du système hématopoïétique.

5.1. Les ROS et le stress oxydant

L'oxygène a permis aux cellules eucaryotes de développer un métabolisme efficace grâce à la respiration mitochondriale. Néanmoins, en présence de rayonnements, de métaux ou de certaines enzymes, l'oxygène peut subir des réactions en cascade, participant à la génération d'espèces réactives de l'oxygène appelées ROS -pour Reactive Oxygen Species- (Figure 34). En particulier, la chaîne respiratoire mitochondriale est susceptible de libérer des ROS.

On parle parfois du double jeu des ROS. En effet, d'une part, les ROS ont des rôles physiologiques non négligeables dans la croissance, le développement ou l'inflammation. Seuls quelques exemples du rôle des ROS spécifiquement dans les CSH seront abordés (*cf.* Partie 1 : II.5.4). D'autre part, le caractère très réactif des ROS leur confère des propriétés toxiques pour la cellule au niveau des membranes, des protéines ou de l'ADN, par la génération de lésions oxydatives (Figure 34).

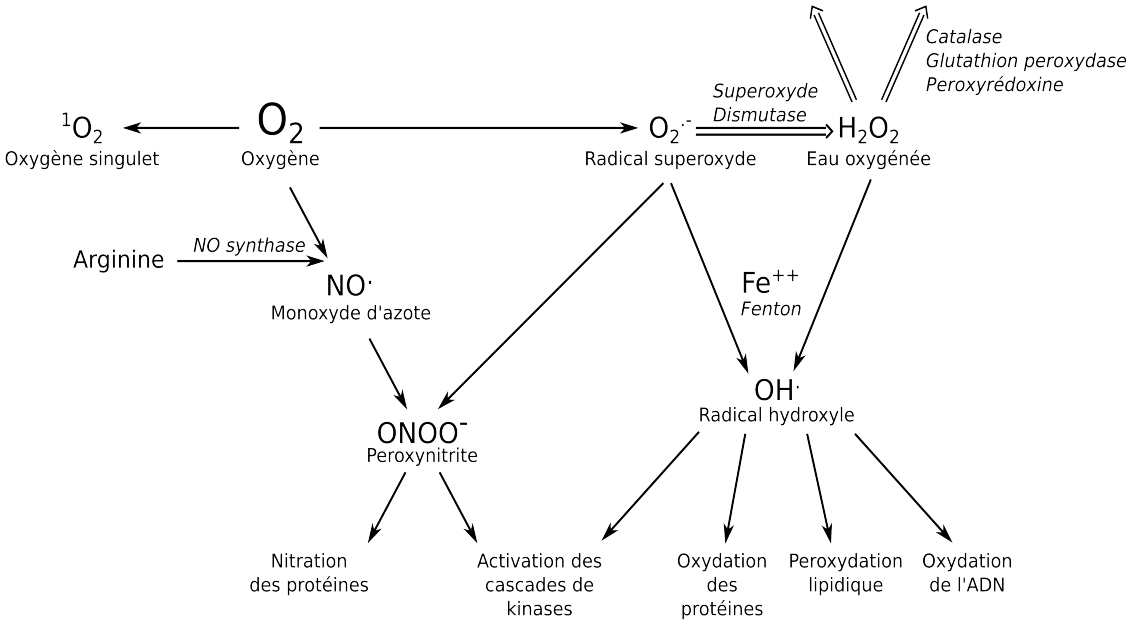


Figure 34. Les espèces dérivées de l'oxygène

L'oxygène est capable de capter un électron pour donner le radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$. Ce radical est le substrat des superoxydes dismutases qui peuvent le transformer en eau oxygénée H_2O_2. En présence de métaux, l'eau oxygénée peut subir une réaction de Fenton et former un radical hydroxyle $^{\cdot}OH$ hautement réactif. L'eau oxygénée peut également être détoxifiée par des enzymes anti-oxydantes (catalase, glutathion peroxydase, peroxydoxine). Sous l'influence de rayonnements UV, l'oxygène peut être transformé en oxygène singulet $^1O_2$ .Le métabolisme de l'oxygène croise celui de l'azote car le radical superoxyde peut interagir avec le monoxyde d'azote pour former le peroxynitrite $ONOO^-$, composé toxique. Le peroxynitrite et le radical hydroxyle peuvent créer des dommages directement sur des composants cellulaires (en bas). Les doubles flèches représentent les étapes détoxifiantes, les enzymes impliquées dans les réactions sont notées à côté des flèches.

d'après Barouki, 2006 ; Naka et al., 2008

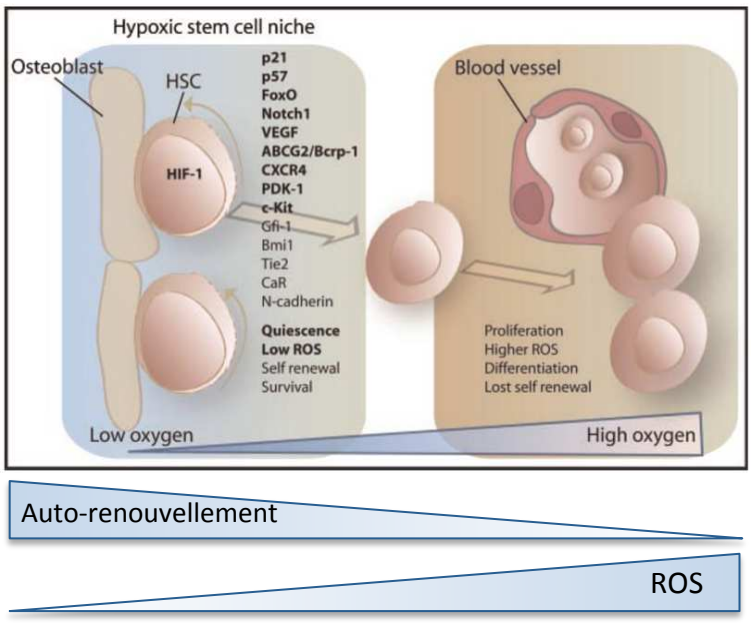


Figure 35. Les CSH quiescentes sont localisées dans la niche endostéale hypoxique

L'hypoxie régule le maintien de l'auto-renouvellement et la quiescence des CSH. Les gènes en gras sont régulés par l'hypoxie, pour certains *via* le facteur HIF-1α.

d'après Eliasson et Jönsson, 2010

De façon naturelle, la cellule lutte contre les ROS avec des systèmes de défenses anti-oxydantes. La cellule se protège avec des enzymes -superoxydes dismutases, catalase ou glutathion peroxydase-, qui permettent la dégradation de certains des ROS (Figure 34, doubles flèches pour les réactions de détoxification). Le piégeage des ions métalliques constitue également une protection de la cellule. Certaines protéines, comme la ferritine permettent ainsi le transport ou la séquestration de ces ions. Des petites molécules agissent aussi comme des anti-oxydants cellulaires exogènes. Il s'agit de la vitamine E, de la vitamine C et des caroténoïdes apportés par exemple par l'alimentation.

On parle de stress oxydant en présence d'un déséquilibre entre les espèces oxydantes et les défenses anti-oxydantes d'une cellule ou d'un compartiment cellulaire. Lorsque les ROS commencent à s'accumuler, dans un premier temps, la cellule peut assurer la détoxification grâce à des défenses anti-oxydantes. En présence d'une grande quantité de ROS, des dommages seront néanmoins créés, pouvant entraîner l'activation de réponses cellulaires, éventuellement l'apoptose ou la sénescence, et participant au vieillissement ou à des phénomènes pathologiques.

5.2. L'environnement hypoxique des CSH

La localisation des CSH au sein d'un environnement hypoxique -pauvre en oxygène- peut être considérée comme un moyen de protéger les CSH des ROS. Plus qu'une simple protection, un tel environnement est aussi essentiel pour la régulation et le maintien des CSH, comme nous allons le voir.

5.2.1. Localisation des CSH au sein de la niche hypoxique

Alors que l'air inhalé contient 21% d'oxygène, celui-ci diminue au fur et à mesure du parcours de l'air à travers les poumons, le sang et lors de la distribution dans les organes (Mohyeldin et al., 2010). Des modèles mathématiques ont suggéré que la concentration en oxygène est inférieure à 1% dans la niche endostéale ; un gradient d'O_2 pourrait exister dans la moelle osseuse entre l'endosteum et les régions plus vascularisées (Chow et al., 2001). Comme attendu, les CSH localisées dans la niche endostéale sont hypoxiques, et sont donc marquées au pimonidazole, marqueur hypoxique (Figure 35) (Kubota et al., 2008).

Il est proposé que les cellules souches neurales et mésenchymateuses soient également localisées dans des environnements hypoxiques, respectivement la zone subventriculaire et les tissus adipeux, suggérant que l'hypoxie pourrait être une propriété partagée par plusieurs types de cellules souches (Mohyeldin et al., 2010).

5.2.2. Les CSH adaptent leur métabolisme à leur environnement hypoxique : le rôle clé de *Hif-1α*

La signalisation induite par l'hypoxie dans les CSH est similaire à celle observée dans un grand nombre de cellules. En particulier, un régulateur transcriptionnel majeur de cette réponse est

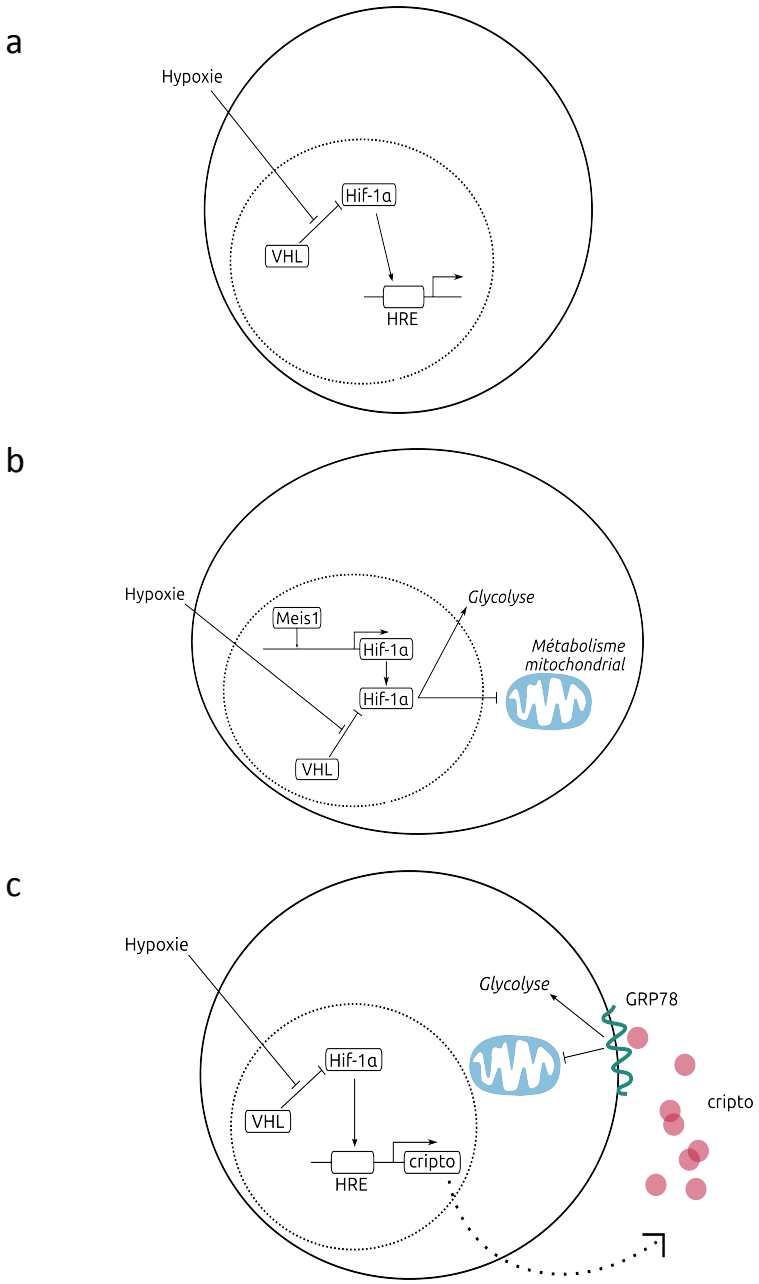


Figure 36. Rôle de *Hif-1α* dans la réponse métabolique de la cellule à l'hypoxie

a. HIF-1α, stabilisée en conditions hypoxiques, agit comme facteur de transcription en reconnaissant des séquences de réponse à l'hypoxie (HRE). **b**. HIF-1α régule la glycolyse aux dépens de l'activité mitochondriale. Le facteur de transcription *Meis1* participe à la régulation du métabolisme, *via* l'activité transcriptionnelle de HIF-1α. **c**. Par une signalisation autocrine et paracrine, le ligand Cripto se lie au récepteur GRP78 et régule le métabolisme des CSH.

d'après Simsek et al., 2010 ; Miharada et al., 2011

Hif-1. HIF-1 est une protéine hétérodimérique constituée d'une sous-unité HIF-1α régulée en fonction de l'oxygène présent et d'une sous-unité HIF-1β constitutivement exprimée (pour revue, voir (Kaelin and Ratcliffe, 2008)). En conditions normoxiques, un domaine de dégradation de HIF-1α dépendant de l'oxygène (ODD) est hydroxylé et reconnu par l'E3-ubiquitine ligase VHL, ce qui induit la dégradation de HIF-1α. Les hydroxylases concernées sont inactivées en conditions hypoxiques, permettant la stabilisation de HIF-1α. L'hétérodimère ainsi stabilisé reconnaît des séquences « éléments de réponse à l'hypoxie » situées dans les promoteurs de ses gènes cibles et régule ainsi transcriptionnellement une centaine de gènes impliqués dans divers processus cellulaires, tels que le cycle cellulaire, la survie, la différenciation, l'autophagie (Figure 36.a).

L'adaptation du métabolisme des CSH est une conséquence directe de leur localisation dans un environnement hypoxique. Cependant, elle requiert également une régulation active, assurée en partie par HIF-1α (Simsek et al., 2010). Récemment, Simsek et al. ont montré par cytométrie de flux que les CSH avaient une activité mitochondriale très faible. En effet, les CSH utilisent préférentiellement la glycolyse au lieu de la phosphorylation oxydative pour générer de l'ATP. On peut noter que le facteur de transcription *Meis1* participe à la régulation du métabolisme, *via* l'activation transcriptionnelle de HIF-1α (Figure 36.b). Ces résultats sont confirmés par des analyses à un niveau plus moléculaire : HIF-1α contrôle le métabolisme cellulaire *via* le ligand Cripto et le récepteur GRP78 exprimé à la surface des CSH hypoxiques (Figure 36.c) (Miharada et al., 2011). Pour une mole de glucose digérée, la glycolyse permet la production de 2 moles d'ATP contre 36 par la respiration oxydative mitochondriale. Ainsi, si la glycolyse est anaérobique et génère peu de ROS, elle est très peu efficace. Ce métabolisme peut participer au maintien d'une faible activité métabolique au sein des CSH.

5.2.3. Rôle de l'hypoxie dans la régulation des CSH

Des analyses de culture ont montré que l'hypoxie permettait le maintien des fonctions des CSH. Ainsi, les capacités d'auto-renouvellement et la quiescence des CSH humaines, ainsi que le phénotype SP des CSH murines sont maintenus en conditions hypoxiques (Danet et al., 2003; Hermitte et al., 2006; Krishnamurthy et al., 2004). De plus, *in vivo*, les cellules situées dans les zones les plus hypoxiques présentent un plus fort taux d'auto-renouvellement, confirmant les données obtenues en culture sur le rôle joué par l'hypoxie dans le maintien des propriétés des CSH (Parmar et al., 2007).

Plusieurs données permettent de souligner le rôle de *Hif-1α*, dans le maintien des CSH en conditions hypoxiques. En effet, les cultures *ex vivo* de CSH humaines en conditions hypoxiques ont mis en évidence une stabilisation d'HIF-1α (Danet et al., 2003). De plus, HIF-1α induit le phénotype SP, *via* l'activation du transporteur Bcrp (Krishnamurthy et al., 2004). Enfin, *in vivo*, les CSH en conditions hypoxiques expriment fortement HIF-1α (Simsek et al., 2010; Takubo et al., 2010). La

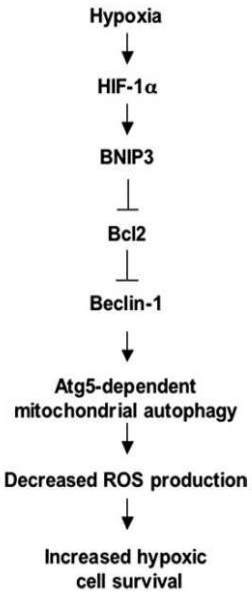


Figure 37. Modèle du rôle de l'hypoxie dans la régulation de l'autophagie mitochondriale

Voie moléculaire régulant l'autophagie des mitochondries, les niveaux de ROS et la survie des fibroblastes embryonnaires de souris en culture, soumis à une hypoxie prolongée. Dans les cellules soumises à une hypoxie prolongée, l'autophagie des mitochondries assure le maintien d'un niveau bas de ROS et permet la survie des cellules. Ce processus nécessite l'activation de la protéine BNIP3, de façon dépendante de HIF-1α.

d'après Zhang et al., 2008

délétion conditionnelle de *Hif-1α* dans le système hématopoïétique induit de graves défauts fonctionnels des CSH : les CSH *Hif-1α*$^{-/-}$ sortent de quiescence et prolifèrent, elles sont plus sensibles à des stress myélotoxiques et au vieillissement, et perdent leur capacité de recolonisation lors de transplantations en série (Takubo et al., 2010). Ainsi est mis en évidence le rôle clé de *Hif-1α* dans la régulation induite par l'hypoxie de la quiescence et de la résistance au stress des CSH. Il faut noter qu'une fine régulation de *Hif-1α* est requise au sein des CSH : une stabilisation anormalement forte de *Hif-1α* dans les CSH *VHL*$^{-/-}$ provoque des défauts de capacités de transplantation, une accumulation de ROS induisant un état de sénescence et d'apoptose (Takubo et al., 2010).

Si le rôle d'HIF-1α est bien documenté dans la réponse à l'hypoxie, peu de données existent sur la signalisation en aval d'HIF-1α. Notamment, de nouvelles recherches aideront à comprendre quels gènes cibles d'HIF-1α sont requis pour le maintien des CSH. Quelques données présentées ici apportent des données moléculaires sur le rôle de l'hypoxie dans la régulation de l'autophagie. L'autophagie est une voie de catabolisme caractérisée par la formation d'une vésicule à double membrane, qui enveloppe des composants cytoplasmiques et les envoie vers la voie de dégradation lysosomale (pour revue, voir (Klionsky, 2007)). L'autophagie peut être induite au cours du développement, en conditions d'homéostasie ou par le manque de nutriments, afin de recycler des macromolécules. Une étude réalisée sur des fibroblastes embryonnaires de souris met en évidence le rôle de l'hypoxie dans l'induction de l'autophagie des mitochondries (Zhang et al., 2008). Dans des cellules soumises à une hypoxie prolongée, l'autophagie des mitochondries est une réponse métabolique nécessaire pour éviter l'accumulation des ROS et la mort cellulaire. Un lien moléculaire direct entre *Hif-1α* et l'autophagie a été mis en évidence, *via* la régulation transcriptionnelle des gènes *Beclin-1* et *Atg5* (Figure 37) (Zhang et al., 2008). En parallèle, il est également proposé que la niche hypoxique promeuve l'autophagie dans les CSH pour maintenir leur intégrité sur du long-terme. La délétion d'*Atg7* dans les cellules hématopoïétiques perturbe l'autophagie et induit la perte des CSH fonctionnelles, une sévère myéloprolifération et la mort des souris en quelques semaines (Mortensen et al., 2011). Les mitochondries et les ROS s'accumulent dans les CSH, provoquant leur entrée en prolifération et leur mort par apoptose. Cette étude montre que l'autophagie joue un rôle essentiel dans les CSH. Il serait particulièrement intéressant de savoir si l'hypoxie régule l'autophagie dans les CSH *in vivo*, notamment par l'induction de *Hif-1α*, et d'évaluer si des voies similaires à celles observées dans les fibroblastes embryonnaires rentrent en jeu.

5.3. Régulation des ROS -1- : les effets néfastes des ROS sur la fonction des CSH

5.3.1. Une protection efficace dans les CSH pour maintenir un niveau faible de ROS

Les CSH sont particulièrement sensibles à une augmentation de ROS. Alors qu'un traitement oxydant (BSO, pour L-Butathionine-sulfoximine) induit efficacement une augmentation des ROS dans

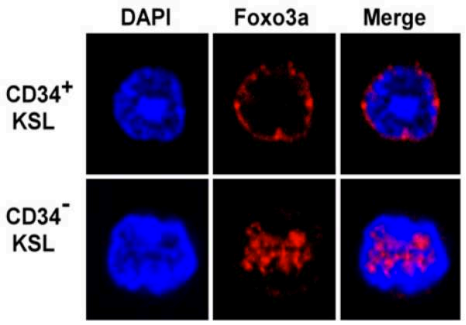


Figure 38. Localisation subcellulaire de *FoxO3a* par immunofluorescence

Des cellules LSK $CD34^+$ et LSK $CD34^-$ sont isolées et marquées au DAPI et avec un anticorps dirigé contre *FoxO3a*. Seule la forme nucléaire est active, lorsque les facteurs FoxO sont phosphorylés, ils sont dirigés vers le cytoplasme et dégradés.

d'après Miyamoto et al., 2007

les CSH, les cellules immatures et les cellules différenciées, les propriétés des CSH sont davantage altérées, suggérant l'importance de la régulation des ROS dans les CSH (Ito et al., 2006).

Les CSH ont un niveau de ROS très faible, estimé 100 fois inférieur à celui des progéniteurs myéloïdes (Tothova et al., 2007). Cela peut s'expliquer par l'activité métabolique intense des progéniteurs et leur localisation dans des zones de la moelle vascularisées. De plus, les cellules différenciées pouvant utiliser les ROS dans diverses stratégies immunitaires, il est raisonnable de penser que la différenciation des CSH s'accompagne d'une augmentation physiologique du niveau de ROS. Afin de trouver des éléments de compréhension de la régulation des ROS au sein du système hématopoïétique, des analyses transcriptomiques ont été réalisées sur des CSH et des progéniteurs myéloïdes (Tothova et al., 2007). Elles mettent en évidence l'existence de programmes transcriptionnels distincts dans ces deux populations. Une réponse anti-oxydante est spécifiquement activée dans les CSH par les facteurs *FoxO*, alors qu'un programme indépendant de *FoxO* régule cette réponse dans les progéniteurs. Les facteurs de transcription *FoxO* sont présents dans le noyau où ils participent à la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la différenciation, du métabolisme et du stress oxydatif (pour revue, voir (Tothova and Gilliland, 2007)) ; leur phosphorylation par AKT induit leur expulsion du noyau et leur dégradation. L'accumulation de FoxO3a dans le noyau des CSH, ainsi que son apparition dans le cytoplasme de progéniteurs immatures LSK $CD34^{+}$, synonyme de son inactivation, soutient effectivement ce modèle (Figure 38) (Miyamoto et al., 2007). De plus, la délétion des facteurs *FoxO* induit une diminution de l'expression d'enzymes anti-oxydantes, telles que les superoxydes dismutases ou la catalase, dans les CSH (Tothova et al., 2007; Miyamoto et al., 2007; Yalcin et al., 2008). Réciproquement, la surexpression de *FoxO3* par transduction rétrovirale dans des cellules hématopoïétiques immatures induit l'expression de la superoxyde dismutase et de la catalase (Yalcin et al., 2008), suggérant que les facteurs *FoxO* régulent la réponse anti-oxydante de la cellule.

Par ailleurs, des acteurs de la réponse anti-oxydante ont été retrouvés dans des analyses des gènes exprimés enrichis dans les CSH (Ramalho-Santos et al., 2002). Ces résultats suggèrent que les CSH sont protégées d'une façon particulière et efficace contre les ROS, ce qui permet le maintien d'un niveau bas de ROS.

5.3.2. Contrôle de la quiescence par les ROS

L'association entre le faible niveau de ROS et la quiescence est bien documentée dans plusieurs études de perte et de gain de fonction, et par la localisation des CSH quiescentes dans la niche hypoxique. Deux exemples présentés ici détaillent le rôle des ROS dans la régulation de la quiescence des CSH.

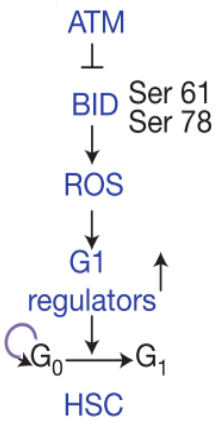


Figure 39. Rôle de la voie ATM-BID dans le maintien de la quiescence des CSH

La phosphorylation de BID par ATM sur les sérines 61 et 78 et son inactivation consécutive sont requises pour le maintien de la quiescence des CSH. Lorsqu'elle n'est pas phosphorylée, la protéine BID s'accumule dans les mitochondries, et participe à la génération d'un fort niveau de ROS, régulateurs négatifs de la quiescence.

d'après Maryanovitch et al., 2012

5.3.2.1. Rôle d'ATM, et de la voie ATM-BID dans la régulation de la quiescence des CSH, via le contrôle des ROS

ATM est un facteur-clé du maintien de l'intégrité génétique, qui agit en réponse à des dommages à l'ADN, à une instabilité télomérique ou à un stress oxydatif. En induisant les systèmes anti-oxydants de la cellule, ATM permet d'inhiber le stress oxydatif. Ce rôle est essentiel dans les CSH (Ito et al., 2004, 2006). La perte d'*ATM* induit une diminution des cellules quiescentes au sein des LSK. Un traitement anti-oxydant (NAC, pour N-acetyl-L-cysteine) permet de retrouver une fréquence de cellules en G0 comparable à celle des souris contrôles, indiquant que les ROS participent à la perte de quiescence des CSH. En parallèle, M.Maryanovitch a utilisé une souris exprimant une forme non phosphorylable de BID, cible d'*ATM* activée suite à des dommages à l'ADN (Maryanovich et al., 2012). Les CSH BID^{AA} présentent une augmentation de la prolifération et une déplétion consécutive des CSH, dues à un niveau anormalement élevé de ROS (Figure 39). Par ailleurs, les souris BID^{AA} présentent une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN. De façon élégante, Maryanovitch et al. montrent que la capacité de réguler le stress oxydatif par la phosphorylation de BID est liée au rôle de BID dans la réponse aux dommages à l'ADN. Ainsi, un traitement anti-oxydant apporte à la souris BID^{AA} une résistance à l'irradiation et permet le maintien des CSH BID^{AA} fonctionnelles, indiquant que la protection contre l'irradiation apportée par la phosphorylation de BID dépend du contrôle des ROS. En régulant de façon dépendante à la fois le stress oxydatif et les dommages à l'ADN, la voie ATM-BID sert de point de contrôle critique pour le maintien des CSH, de leur quiescence et de leur intégrité génomique.

5.3.2.2. La voie PI3K/Akt, régulateur de la quiescence des CSH, par le contrôle des ROS

La voie *PI3K*/*Akt* est une voie de signalisation centrale pour plusieurs processus biologiques, comme le métabolisme de l'insuline, la synthèse protéique, la prolifération ou l'apoptose. La voie *PI3K*/*Akt* peut être activée dans les CSH quiescentes par des facteurs de croissance. La protéine PI3K est alors recrutée, et permet le recrutement d'AKT à la membrane plasmique. Cette localisation corrèle avec son activation par phosphorylation. AKT peut alors agir sur ces cibles : dégrader les facteurs de transcription FoxO ou activer mTOR (Naka and Hirao, 2011; Kharas et al., 2010). Inactiver ou surexprimer la voie *PI3K*/*Akt* a révélé un rôle clé de cette voie dans la régulation de la quiescence et dans le maintien d'un faible niveau de ROS dans les CSH chez la souris.

PTEN est un suppresseur de tumeur, qui régule négativement la voie *PI3K*/*Akt*. La délétion de *PTEN* induit une entrée en cycle des CSH, corrélée avec des défauts d'auto-renouvellement (Yilmaz et al., 2006; Zhang et al., 2006). Un phénotype similaire est également observé dans des souris exprimant une forme myristoylée d'AKT, constitutivement active (Kharas et al., 2010). Au contraire, l'expression d'une forme de la kinase PI3K avec une activité réduite, ou la délétion des deux isoformes *Akt1* et *Akt2* présentes dans les cellules hématopoïétiques provoque une augmentation de la quiescence et une diminution de la capacité de prolifération des CSH fœtales transplantées dans des

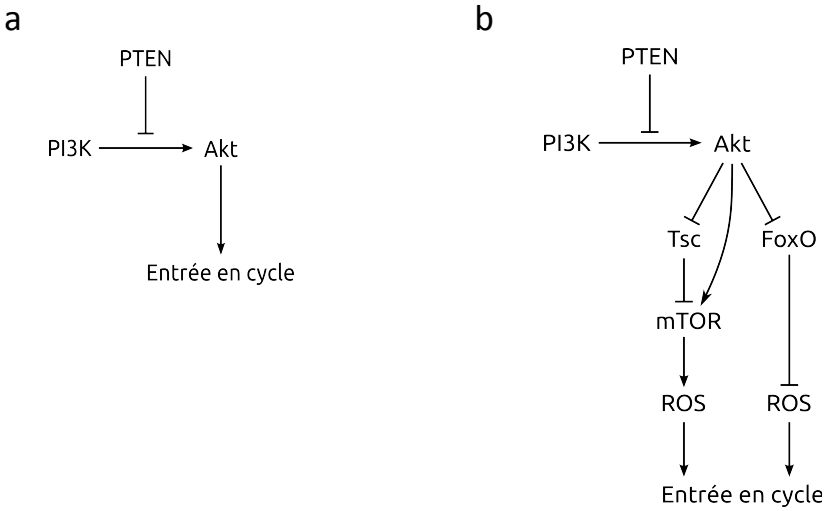


Figure 40. Rôle de la voie *PI3K*/*Akt* dans la régulation de la quiescence des CSH

a. *PTEN* réprime l'entrée en cycle des CSH en inhibant la voie *PI3K*/*Akt*. **b**. Les effecteurs de la voie *PI3K*/*Akt*, à savoir *mTOR* et les facteurs *FoxO*, peuvent jouer un rôle dans le maintien de la quiescence des CSH. *Akt* peut activer *mTOR* soit directement en phosphorylant la sous-unité mTORC1, soit indirectement en inhibant *Tsc1*, membre du complexe inhibiteur de *mTOR*.

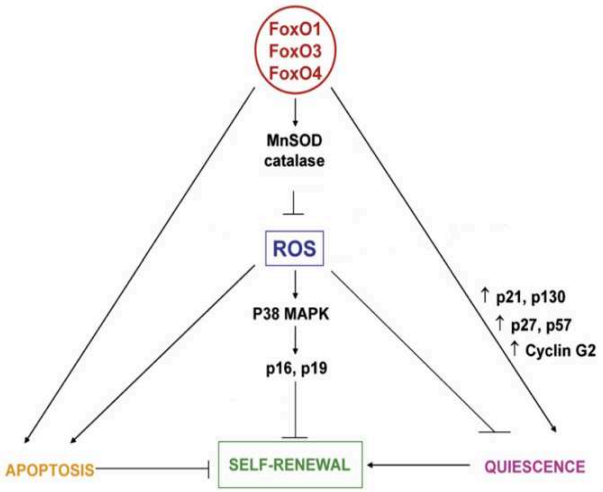


Figure 41. Modèle proposé pour la fonction des facteurs *FoxO* dans le maintien de l'intégrité des CSH

Les facteurs FoxO régulent la quiescence, promeuvent la survie et la résistance au stress oxydatif, permettant ainsi le maintien de l'auto-renouvellement des CSH. La quiescence est régulée par les facteurs FoxO à la fois de façon directe en modifiant l'expression des régulateurs du cycle cellulaire (flèche à droite), et de façon indirecte en inhibant la formation de ROS par la régulation des enzymes anti-oxydantes superoxyde dismutase (MnSOD) et catalase.

d'après Tothova et al., 2007

souris irradiées (Haneline et al., 2006; Juntilla et al., 2010). Ces résultats cohérents indiquent que *PTEN* restreint normalement l'entrée en cycle des CSH en inhibant la voie *PI3K*/*Akt* (Figure 40.a). Par quels effecteurs cette signalisation a-t-elle donc lieu ? Plusieurs études détaillées ci-dessous suggèrent que les cibles *mTOR* et/ou *FoxO* pourraient assurer la régulation du cycle induite par la voie *PI3K*/*Akt* (Figure 40.b).

mTOR est une cible de AKT. La voie *mTOR* est une voie de régulation majeure de la croissance cellulaire, du métabolisme et de la survie. Deux résultats permettent de penser que cette voie participe à la régulation de la quiescence des CSH. La délétion du suppresseur de tumeur *Tsc1*, membre d'un complexe inhibiteur de *mTOR*, aboutit à un phénotype similaire à celui observé dans les souris *PTEN*$^{-/-}$, à savoir une entrée en cycle des CSH, corrélée avec une diminution du potentiel d'auto-renouvellement (Chen et al., 2008a; Gan et al., 2008). L'activation de *mTOR* s'accompagne d'une augmentation des ROS dans les CSH. Le traitement anti-oxydant au NAC permet de rétablir les fonctions des CSH *Tsc1*$^{-/-}$ *in vivo*, suggérant que *Tsc1* maintient la fonction des CSH en réprimant la production de ROS. Par ailleurs, traiter les souris *PTEN*$^{-/-}$ avec la rapamycine, un inhibiteur de *mTOR* assure le rétablissement de la quiescence des CSH (Yilmaz et al., 2006). Néanmoins, il faut noter qu'en plus de son rôle d'inhibition de *mTOR*, la rapamycine peut, *via* l'inhibition de la sous-unité mTORC2 dans les cellules hématopoïétiques, induire l'inactivation d'AKT, corrélée avec une augmentation de l'activité des facteurs *FoxO* (Sarbassov et al., 2006; Zeng et al., 2007). Ainsi, l'hypothèse que les facteurs *FoxO* participent à la suppression du phénotype observée dans les CSH *PTEN*$^{-/-}$ est également envisagée, ce qui est appuyé par d'autres études, détaillées ci-dessous.

La délétion du facteur *FoxO3a* constitutive, ou la triple délétion conditionnelle des facteurs *FoxO1/3/4* dans le système hématopoïétique induit une entrée en cycle des CSH, corrélée avec des changements de l'expression de régulateurs clés du cycle cellulaire, incluant la cible des facteurs *FoxO p27*, et des cyclines (Miyamoto et al., 2007; Yalcin et al., 2008; Tothova et al., 2007). Ces défauts fonctionnels corrèlent avec une augmentation des ROS, et un traitement anti-oxydant au NAC permet de maintenir la quiescence des CSH *FoxO1/3/4*$^{-/-}$ (Figure 41). Ainsi, le programme anti-oxydant activé par les facteurs *FoxO* est essentiel pour le maintien de la quiescence des CSH.

5.3.3. L'auto-renouvellement des CSH est associé avec un niveau bas de ROS

Le niveau bas de ROS observé dans les CSH est indispensable pour leur auto-renouvellement. En effet, comme attendu, les CSH ROS^{low} présentent les caractéristiques des CSH *bona fide* : en particulier, elles ont des propriétés d'auto-renouvellement plus importantes, *in vitro* et *in vivo*, que les CSH ROS^{high}, indiquant une association entre l'auto-renouvellement et le faible niveau de ROS (Figure 35) (Jang and Sharkis, 2007).

Dans nombre de modèles murins, la perte d'auto-renouvellement des CSH a été attribuée à une accumulation de ROS. En particulier, la perte de quiescence des CSH des modèles présentés dans

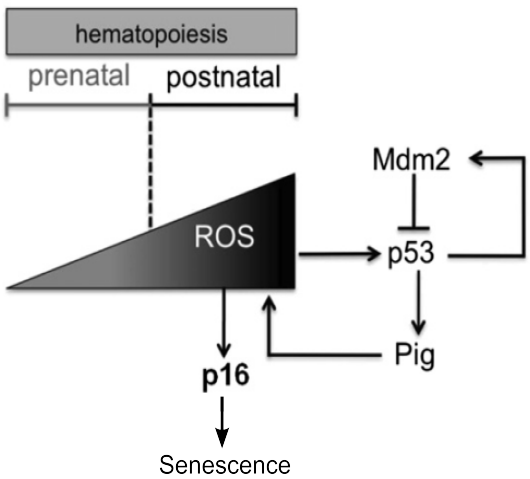


Figure 42. Modèle de l'activation des ROS par p53 au cours de l'hématopoïèse post-natale

Mdm2 est nécessaire pour la survie des progéniteurs et des CSH par son rôle dans la limitation de l'activité pro-oxydante de p53. L'induction par p53 des gènes « Pig » aboutit à la formation de ROS, l'activation successive de *p16* et d'un état de sénescence.

d'après Abbas et al., 2010

le paragraphe précédent est associée avec une perte d'auto-renouvellement due à l'augmentation des ROS (Ito et al., 2006; Tothova et al., 2007; Miyamoto et al., 2007; Chen et al., 2008a)).

Enfin, des transplantations successives de CSH humaines chez la souris induisent une accumulation de ROS dans les CSH (Yahata et al., 2011). Cette accumulation est aussi visible dans les CSH humaines de patients âgés ou ayant subi une transplantation, suggérant que le stress lié à la transplantation et le vieillissement induisent une augmentation des ROS. Cette accumulation de ROS induit des dommages à l'ADN et des défauts d'auto-renouvellement, qui peuvent être partiellement évités par des traitements anti-oxydants.

5.3.4. Les ROS peuvent induire un état de sénescence

Quelques marqueurs définissent la sénescence, parmi lesquels l'induction de *p16* et la détection d'une activité β-galactosidase associée à la sénescence. Cependant, la sénescence reste un état peu détaillé d'un point de vue moléculaire. La définition fonctionnelle de la sénescence, à savoir un état défectueux de la cellule, sans présence d'apoptose, est finalement plus précise, même si pas évidente à appréhender *in vivo*. Il est peut être pertinent de considérer un continuum entre l'état fonctionnel de CSH et la sénescence, avec une perte de fonction progressive des CSH, comme ce qui est observé au cours du vieillissement. Est-ce que la sénescence aboutit *in fine* à la mort ou à la disparition des CSH ou est-ce que ces CSH sénescentes peuvent rester dans le tissu n'est pas bien compris aujourd'hui.

Dans le système hématopoïétique, plusieurs études suggèrent que l'accumulation de ROS pourrait être liée à l'induction d'un état de sénescence. C'est le cas pour les CSH $ATM^{-/-}$ et pour les CSH humaines transplantées successivement plusieurs fois dans des souris (Ito et al., 2004; Yahata et al., 2011). Par ailleurs, un rôle pro-oxydant inducteur de sénescence a été identifié pour p53 dans le système hématopoïétique. En effet, les cibles de *p53* peuvent avoir des effets anti- ou pro-oxydants. *p53* pourrait servir de senseur de l'intensité du stress (Sablina et al., 2005). Ainsi, dans des cellules non stressées, ou soumises à un stress physiologique, le faible niveau de *p53* pourrait induire une réponse anti-oxydante protectrice ; alors qu'une forte activation de *p53* induirait une réponse pro-oxydante corrélée avec l'induction de l'apoptose. Le rôle de *p53* dans la régulation des ROS dans les cellules hématopoïétiques a été analysé dans une souris déficiente pour *Mdm2* et exprimant deux allèles hypomorphes de *p53* (Abbas et al., 2010). La souris $Mdm2^{-/-}$ $p53^{515C/515C}$ meurt peu après la naissance suite à des atteintes hématopoïétiques. L'activation constitutive de la forme hypomorphe de *p53* dans les cellules hématopoïétiques aboutit à l'induction de ROS, *via* l'activation des gènes *Pig*, pour « *p53*-induced genes » (Figure 42). L'accumulation des ROS induit l'arrêt du cycle, un état de sénescence et finalement l'apoptose. Il serait intéressant de compléter cette étude par l'analyse du rôle de *p53* sur l'induction de ROS dans une moelle adulte à l'homéostasie ou en stress, et de comparer les réponses induites par *p53* dans les CSH ou dans des progéniteurs.

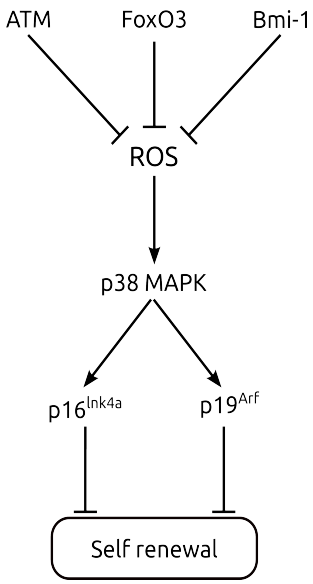


Figure 43. Proposition d'un mode d'action des ROS dans la régulation des CSH

ATM, *FoxO3* et *Bmi-1* ont été identifiés comme des facteurs importants pour l'inhibition des ROS dans les CSH. Une accumulation de ROS induit la phosphorylation de la *p38MAPK*, qui à son tour, induit la transcription du locus *Ink4a*/*Arf*. Ces inhibiteurs du cycle affectent l'auto-renouvellement des CSH.

5.3.5. D'où viennent les ROS et que font les ROS ? Aspects moléculaires de ces modèles associés à un fort niveau de ROS…

5.3.5.1. La machinerie mitochondriale, responsable de la production de ROS

La voie Tsc/mTOR participe au contrôle du métabolisme mitochondrial : en l'absence de *Tsc*, les CSH présentent une augmentation de la quantité d'ADN mitochondrial et une augmentation des transcrits des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative (Chen et al., 2008a). Cette activité aberrante induit une élévation de 7 fois du niveau de ROS dans les CSH. La protéine BID également est impliquée dans cette régulation. Au sein des CSH BID^{AA} ou $ATM^{-/-}$, la protéine BID est localisée dans la mitochondrie, et est responsable de la production anormale de ROS (Maryanovich et al., 2012). Cela suggère qu'ATM est chargée d'inhiber la production de ROS par BID, en le phosphorylant pour empêcher sa localisation dans les mitochondries.

Ainsi, les ROS proviendraient d'une mise en activité aberrante des mitochondries au sein des CSH dans les modèles présentés ci-dessus. Diverses voies de signalisation permettent une fine régulation de l'activité mitochondriale, et il est juste de penser que ces voies peuvent également être impliquées dans la génération de ROS, nécessaires lors de l'activation physiologique des CSH (*cf.* Partie 1 : II.5.4).

5.3.5.2. Des modes d'action des ROS peu connus

La p38MAPK a été trouvée préférentiellement activée dans les CSH ROS^{high}, et pourrait participer à la perte d'auto-renouvellement et à la déplétion progressive des CSH (Jang and Sharkis, 2007). De façon intéressante, l'induction de la p38MAPK suite à une augmentation du niveau de ROS a été également observée dans le modèle $Atm^{-/-}$ et $FoxO3a^{-/-}$ (Figure 41) (Ito et al., 2006; Miyamoto et al., 2007). La p38MAPK est phosphorylée spécifiquement dans les cellules immatures $Atm^{-/-}$ et $FoxO3^{-/-}$, et son inhibition permet de retrouver un auto-renouvellement plus fort *in vitro* et même *in vivo*.

Il est reporté que la p38MAPK participe à l'induction de *p16* (Ito, 2006, Nature). Remarquons que ATM et le répresseur Polycomb Bmi-1 maintiennent l'auto-renouvellement des CSH en inhibant les inhibiteurs de cycle p16 et p19 (Ito et al., 2004, 2006; Maryanovich et al., 2012; Liu et al., 2009a; Park et al., 2003). Les CSH $ATM^{-/-}$ et $Bmi\text{-}1^{-/-}$ présentent une forte augmentation de l'expression de p16 et p19 due à l'induction des ROS. Les ROS pourraient donc contrôler le locus *Ink4a/Arf*, suggérant ainsi des mécanismes moléculaires de régulation du maintien des CSH.

Ainsi, la p38MAPK et le locus *Ink4a/Arf* sont des candidats intéressants pour comprendre le mode d'actions des ROS (Figure 43). Néanmoins, peu de données permettent d'expliquer comment les ROS activent ces voies. Il est envisageable de penser que des dommages créés par les ROS pourraient induire ces réponses, cependant, comment une réponse spécifique aux ROS est induite n'est pas connu. Par ailleurs, savoir si l'induction d'un stress oxydatif passe forcément par p38MAPK et/ou

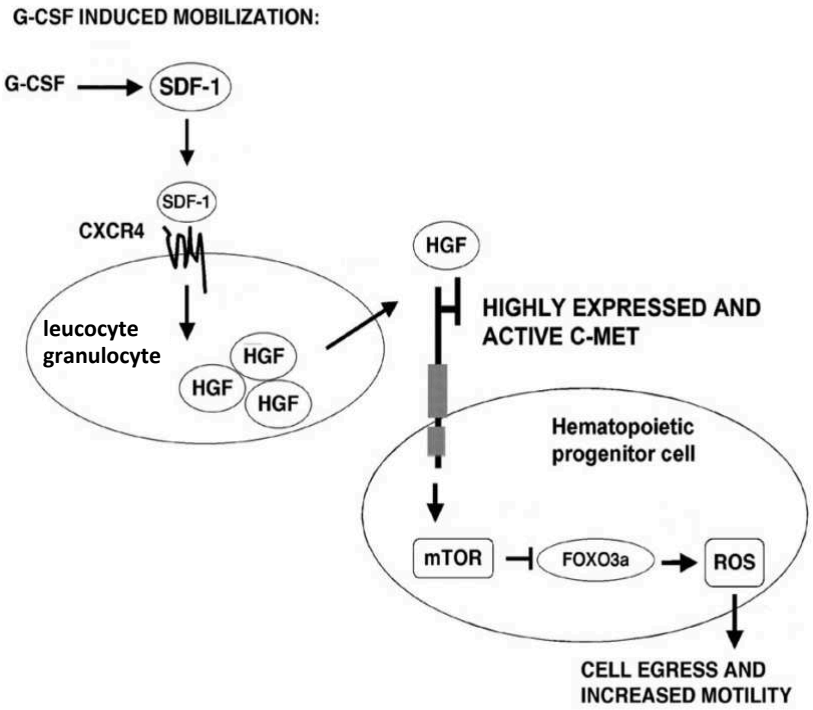


Figure 44. L'activation de *c-Met* permet la mobilisation des CSH grâce à l'induction de ROS

Le G-CSF induit l'activation transitoire de *SDF-1* ; et l'activation de CXCR4/SDF-1 induit la production d'HGF dans les leucocytes et les granulocytes de la moelle osseuse. HGF est sécrété et se lie au récepteur *c-Met* sur les CSH. L'activation de *c-Met* active la voie *mTOR*, qui réprime le facteur *FoxO3*, permettant l'induction de ROS. Cette cascade de signalisation provoque la mobilisation des CSH et leur sortie de la niche.

d'après Tesio et al., 2011

Ink4a/Arf est une question pertinente, abordée pour l'instant uniquement dans certains modèles particuliers.

5.4. Régulation des ROS -2- : le rôle physiologique des ROS pour les CSH

Les ROS ont des rôles physiologiques dans les cellules. Deux exemples soulignent ici leur importance dans les CSH.

Comme nous l'avons vu plus haut, la délétion constitutive de *Akt1/2* provoque des défauts de prolifération et de différenciation des CSH fœtales (Juntilla et al., 2010). Ce phénotype s'accompagne de défauts d'auto-renouvellement au cours de greffes compétitives et de transplantations successives. Les auteurs suggèrent que la diminution du niveau de ROS mesuré dans les CSH pourrait être responsable de ces défauts : en effet, l'induction de ROS par un traitement oxydant (BSO) à faible dose permet que les CSH $Akt1^{-/-}$ $Akt2^{-/-}$ entrent en prolifération et se différencient *ex vivo*. Ainsi, cette étude souligne la nécessité physiologique des ROS dans la cellule : AKT pourrait maintenir un niveau minimum de ROS, nécessaire à l'entrée en cycle et à la différenciation des CSH.

Par ailleurs, en réponse à des signaux de stress, les CSH peuvent être mobilisées dans le sang. L'induction au G-CSF induit ainsi l'activation de c-Met à la surface des cellules hématopoïétiques, et cette activation est nécessaire pour la mobilisation des cellules (Figure 44) (Tesio et al., 2011). Des analyses au niveau moléculaire révèlent que c-Met régule la production de ROS, *via* la signalisation *mTOR* et *FoxO3*. Ainsi, la production de ROS, induite par c-Met dans les CSH et les progéniteurs est requise pour une mobilisation efficace de ces cellules suite à une stimulation au G-CSF.

5.5. Conclusion : Maintien d'un niveau critique de ROS dans les CSH, ni trop fort, ni trop faible

Plusieurs modèles génétiques permettent d'appréhender la fonction des CSH avec un niveau anormalement haut de ROS (*cf.* Partie 1 : II.5.3). Les ROS peuvent induire un état de sénescence, ou la mort cellulaire. Les études présentées ci-dessus soulignent une fréquente sortie de quiescence de ces CSH, associée à une perte des propriétés d'auto-renouvellement et souvent à une déplétion de la population de CSH.

Si la production de ROS provient principalement d'une mise en activité mitochondriale, les voies par lesquelles les ROS restreignent l'auto-renouvellement sont peu connues (*cf.* Partie 1 : II.5.3.5). L'activation de la *p38MAPK* et l'induction de *p16* ont été retrouvées associées à un fort niveau de ROS dans plusieurs études, cependant des données moléculaires manquent encore pour expliquer le lien entre les ROS et l'auto-renouvellement.

Enfin, il est intéressant de remarquer qu'un niveau non nul de ROS est nécessaire pour la prolifération, la différenciation ou la mobilisation des CSH (*cf.* Partie 1 : II.5.4). Alors que l'auto-renouvellement et la quiescence requièrent un niveau pas trop fort de ROS, une légère augmentation

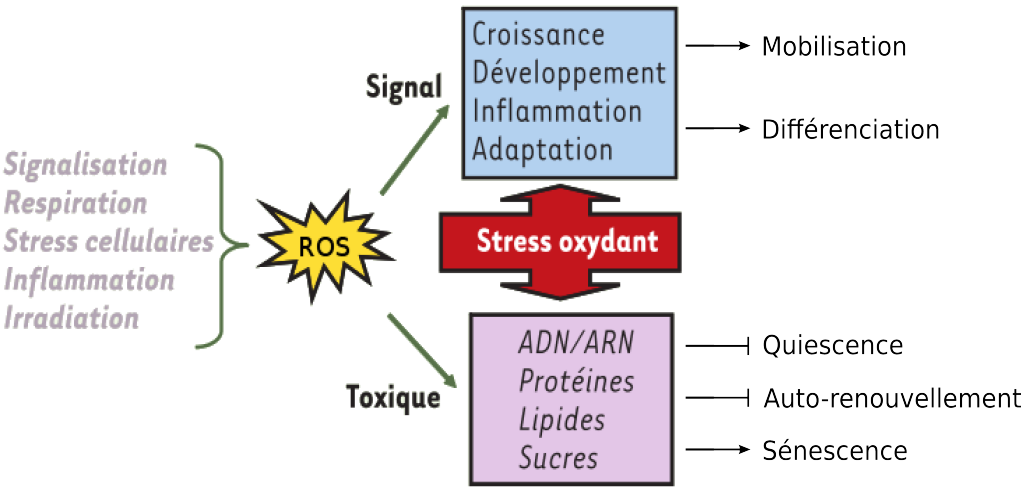


Figure 45. Pléiotropie contradictoire des ROS

Nous avons vu dans cette partie quelques exemples de rôles physiologiques des ROS (pour la mobilisation et la différenciation des CSH), et des conséquences de la toxicité de ceux-ci.

d'après Barouki, 2006

des ROS pourrait servir de signal pour l'activation des CSH. Finalement, une régulation fine du niveau de ROS dans les CSH pourrait être un moyen de maintenir l'hématopoïèse en conditions homéostatiques, et également de préserver la population de CSH quiescentes requises pour l'homéostasie à long terme, et pour la réponse en cas de stress (Figure 45).

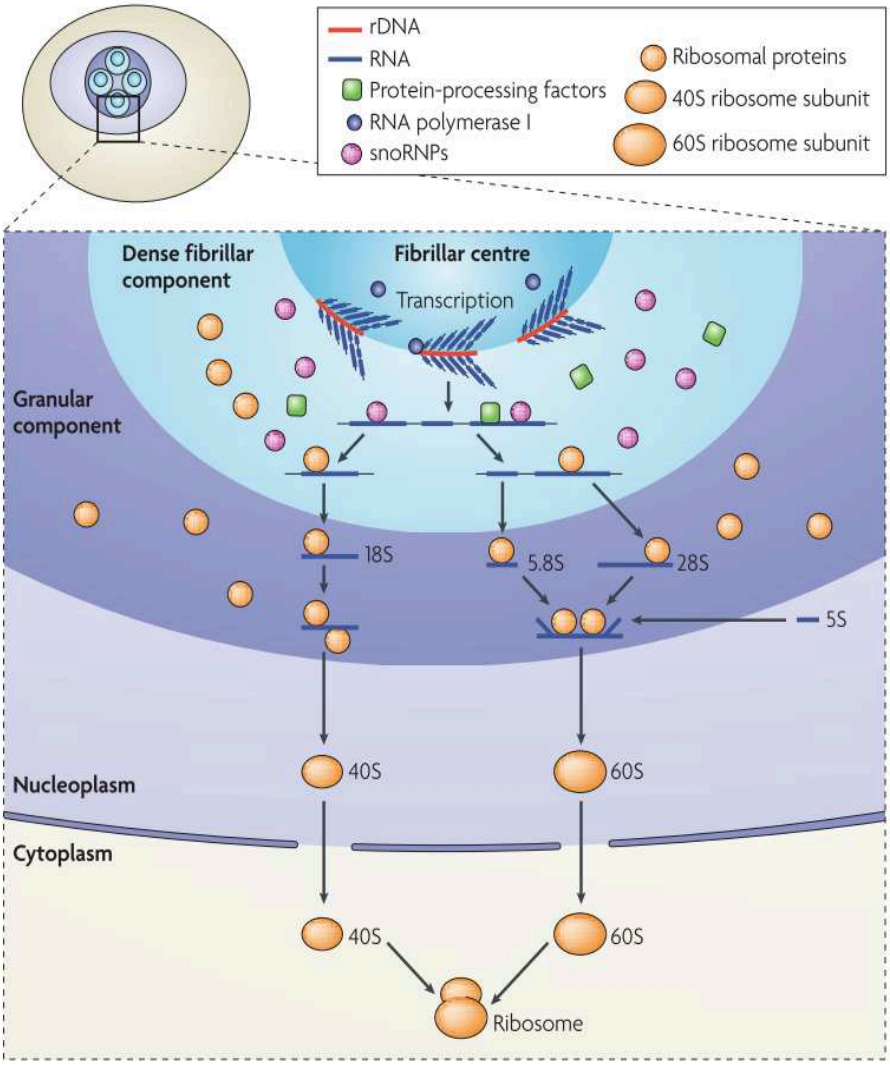


Figure 46. Modèle d'assemblage des ribosomes

La transcription de l'ADNr par l'ARN polymérase I a lieu dans le centre fibrillaire du nucléole, à la frontière avec la zone fibrillaire dense. L'ARN pré-ribosomique est clivé et modifié par des complexes ribonucléoprotéiques dans la zone fibrillaire dense. L'incorporation des ARNr au sein des particules ribonucléoprotéiques a lieu principalement dans la zone granulaire. L'ARNr 5S est alors assemblé avec les ARNr 5.8S et 28S pour former la particule pré-60S ; alors que le 18S est assemblé au sein des particules pré-40S. Les particules pré-40S et pré-60S subissent ensuite d'autres étapes de maturation et sont exportées dans le nucléoplasme, puis dans le cytoplasme des cellules, où elles peuvent former des ribosomes fonctionnels.

d'après Boisvert et al., 2007

Partie 2 : Un rôle régulateur pour la biogenèse des ribosomes

La biogenèse des ribosomes est un processus complexe faisant intervenir de nombreux facteurs (Figure 46). Chez les mammifères, les cellules contiennent plusieurs centaines de copies des gènes codant pour les ARNr. Ces gènes sont organisés en clusters sur des régions chromosomiques regroupées dans l'ADN nucléolaire. L'ARNr 47S est transcrit dans le nucléole par l'ARN Polymérase I, des étapes de clivage et de maturation permettent la génération des ARNr matures 18S, 28S et 5.8S à partir de ce précurseur. L'ARNr 5S quant à lui est transcrit par l'ARN polymérase III dans le nucléoplasme avant d'être importé dans le nucléole (pour revue voir (Kressler et al., 2010)). Les ARNr sont assemblés avec des protéines et des petits ARN au sein de particules pré-ribosomiques dans les nucléoles, ils subissent des clivages et des modifications post-transcriptionnelles, parmi lesquelles des conversions des uridines en pseudo-uridines et la méthylation de certains nucléotides. Au cours de la biogenèse des ribosomes, sont incorporées les 79 protéines ribosomiques (RP), composants du ribosome mature. De nombreux facteurs non ribosomiques, parmi lesquels des nucléases, des hélicases, des enzymes consommatrices d'énergie, des protéines chaperonnes et des petits ARN participent aussi à ce processus. Une coordination spatiale et temporelle est requise pour assurer le bon fonctionnement de la biogenèse des ribosomes.

Quelques chiffres peuvent donner ici une idée de l'ampleur de la biogenèse des ribosomes (Mayer and Grummt, 2006). Une cellule HeLa en prolifération produit environ 7500 ribosomes par minute. Etant données la complexité de la biogenèse de ribosomes et la quantité extraordinaire de ribosomes requis par une cellule qui prolifère, ce processus requiert beaucoup d'énergie. Chez la levure, la synthèse de l'ARNr représente 60% de l'activité transcriptionnelle totale, et la synthèse des ARNm codant pour les RP représente 60% de la transcription par l'ARN polymérase II. Il est alors évident qu'afin de gérer au mieux ses ressources, la cellule doit contrôler la biogenèse de ses ribosomes et adapter sa croissance et sa prolifération en fonction des ressources disponibles.

Nous verrons comment la biogenèse des ribosomes assure un couplage de la régulation du cycle et du métabolisme au niveau cellulaire. De plus, des données suggèrent que les ribosomes pourraient être hétérogènes, à plusieurs niveaux, et que cette hétérogénéité pourrait se traduire par une hétérogénéité fonctionnelle au niveau de l'expression génique. Enfin, il faut savoir que la biogenèse des ribosomes a été principalement décrite chez la levure (pour revue, voir (Fromont-racine et al., 2003)). Certains mécanismes et facteurs sont conservés dans le règne eucaryote ; cependant, des divergences ont pu apparaître au cours de l'évolution, et la régulation de la biogenèse des ribosomes dans un organisme pluri-cellulaire pourrait présenter un niveau de complexité supplémentaire. Nous verrons dans la dernière partie qu'à l'échelle de l'organisme, la biogenèse des ribosomes participe à

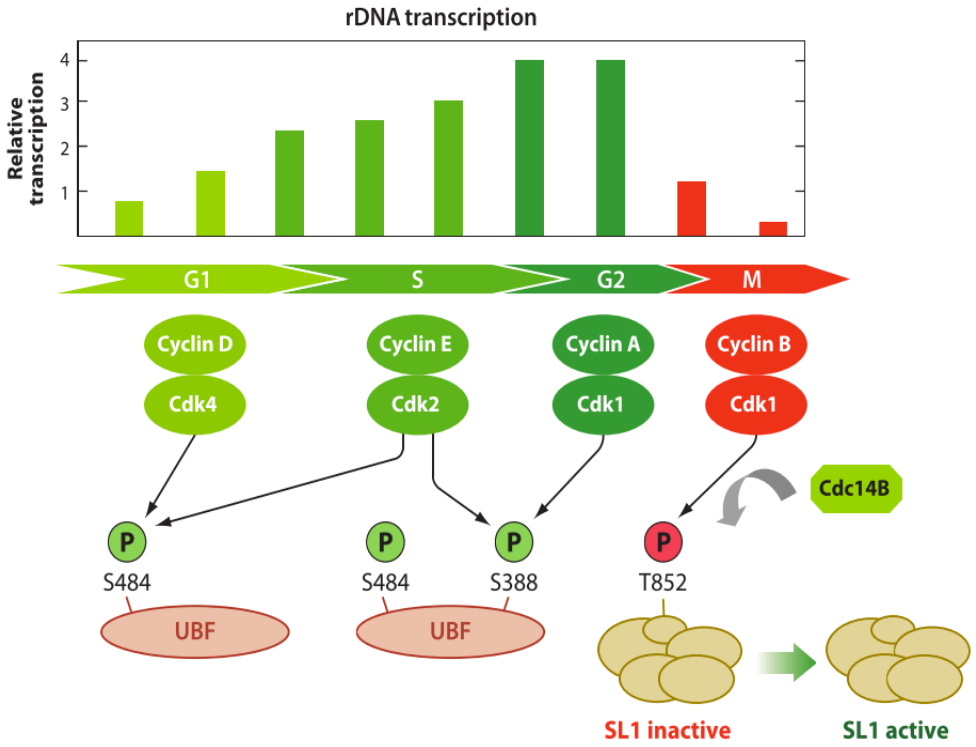


Figure 47. Régulation de l'activité transcriptionnelle de l'ARN polymérase I au cours du cycle cellulaire

Le facteur UBF est activé pendant l'interphase par la phosphorylation de la sérine 484 par le complexe CDK4/cycline D et de la sérine 388 par le complexe CDK2/ cycline E et A. Au début de la mitose, la phosphorylation du facteur TAF110 sur la thréonine 852 par le complexe CDK1/cycline B inactive le complexe TIF-IB/SL1, qui n'interagit plus avec UBF, inhibant ainsi l'activité de l'ARN polymérase I. A la fin de la mitose, la phosphatase Cdc14B est activée, elle déphosphoryle et réactive TIF-IB/SL1. Les phosphorylations activatrices sont notées en vert, celles inhibitrices en rouge.

d'après Drygin et al., 2010

des régulations au cours du développement. Je m'intéresserai enfin aux pathologies humaines associées à des dysfonctionnements de la biogenèse des ribosomes.

1. Régulation coordonnée du cycle cellulaire et de la biogenèse des ribosomes

1.1. Couplage entre les ribosomes et la régulation du cycle cellulaire

La prolifération cellulaire est intimement liée à la biogenèse des ribosomes, dont dépendent les mécanismes fondamentaux de réplication, transcription et traduction. Cependant, les arguments expérimentaux démontrant un lien direct entre la biogenèse des ribosomes et le contrôle de la prolifération ne sont pas évidents. On peut se demander notamment si c'est la prolifération des cellules qui induit l'activation de la synthèse des ribosomes, ou si, à l'inverse, une synthèse accrue des ribosomes peut activer la prolifération.

1.1.1. Contrôles réciproques de la biogenèse des ribosomes et du cycle cellulaire

L'activation transcriptionnelle de l'ARN polymérase I nécessite le recrutement au niveau de la région promotrice de l'ADNr d'un complexe comprenant le facteur UBF (pour Upstream Binding Factor), le complexe TIF-IA et le complexe SL1 ou TIF-IB chez l'homme ou chez la souris respectivement (contenant TBP et les 5 facteurs TAF associés à TBP). L'activation de l'ARN polymérase I, et donc la biogenèse des ribosomes, est régulée au cours du cycle cellulaire. Dans les cellules quiescentes, UBF est hypophosphorylé ; sa phosphorylation sur de multiples sites est requise pour initier la formation du complexe de transcription et permettre l'entrée des cellules en G1 (Voit et al., 1995). Au cours du cycle, la transcription de l'ADNr est maximale pendant les phases S et G2, elle diminue au cours de la mitose, et est réactivée pendant la phase G1. Un profil particulier de phosphorylations et d'acétylations d'UBF, et différents facteurs sont associés à cette régulation cyclique (Figure 47) (Drygin et al., 2010).

Par ailleurs, la quantité de ribosomes peut limiter l'entrée en cycle. En effet, une cellule qui prolifère augmente progressivement la quantité de ses constituants cellulaires avant la division, afin d'assurer une taille appropriée pour les cellules filles. Des données indiquent que la quantité de ribosomes présents dans la cellule contrôle la transition entre les phases G1 et S, soulignant qu'une biogenèse des ribosomes efficace est requise pour la prolifération cellulaire (Volarevic, 2000; Derenzini et al., 2005). Depuis quelques années, il est également bien documenté que des défauts de biogenèse des ribosomes peuvent induire un arrêt du cycle et la mort cellulaire : il s'agit du stress ribosomique, détaillé plus tard (*cf.* Partie 2 : 1.1.3).

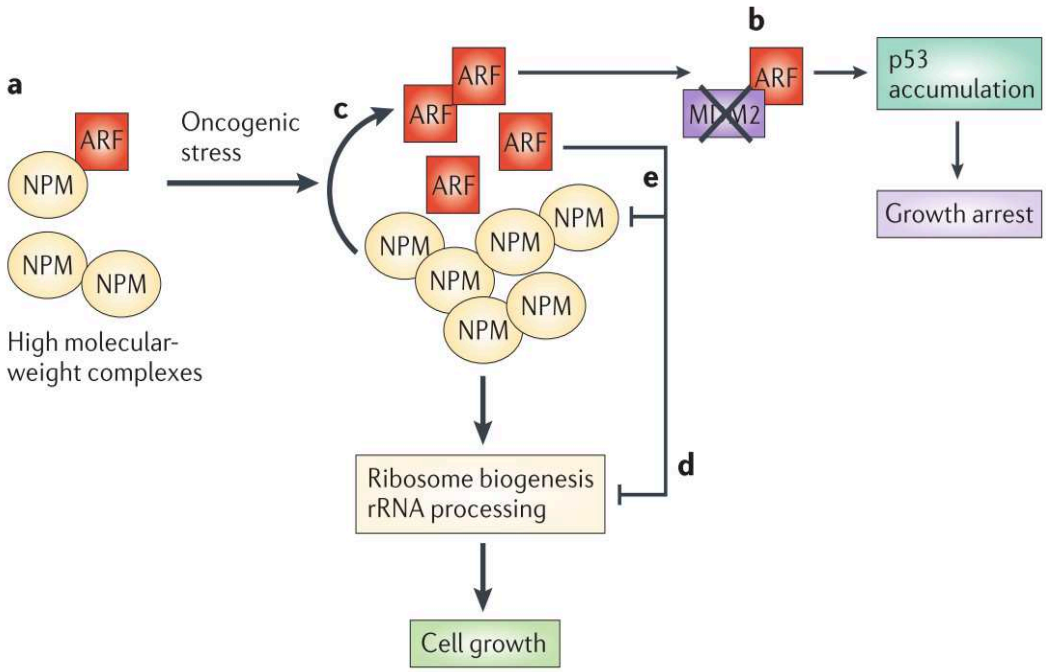


Figure 48. NPM et ARF contrôlent la croissance cellulaire et la prolifération par la régulation réciproque de leur stabilité et/ou activité

a. NPM et ARF peuvent s'associer dans le nucléole au sein de complexes de haut poids moléculaires. **b**. *Arf* peut être activé suite à un stress oncogénique et induire la voie Arf/Mdm2/p53, entraînant la stabilisation de p53 et un arrêt du cycle. **c**. Des niveaux élevés de NPM facilitent l'accumulation et la stabilisation de ARF. ARF régule négativement la biogénèse des ribosomes : **d**. en inhibant la transcription de l'ARNr, **e**. et en déstabilisant la nucléophosmine (NPM).

d'après Grisendi et al., 2006

1.1.2. *Arf* : rôle dans la régulation du cycle cellulaire et de la biogenèse des ribosomes

J'ai choisi de m'intéresser ici à *Arf*, un exemple de protéine impliquée à la fois dans la régulation du cycle cellulaire et de la biogenèse des ribosomes. La protéine ARF ($p14^{Arf}$ chez l'homme et $p19^{Arf}$ chez la souris) est codée par un épissage alternatif du locus *Ink4a*/*Arf*. Les souris déficientes pour *Arf* présentent des sensibilités à certaines tumeurs ; le rôle de suppresseur de tumeur de *Arf* a été détaillé dans une revue récente (Ozenne et al., 2010).

Notons tout d'abord que *Arf* est impliqué dans la voie de stress oncogénique Arf/Mdm2/p53. L'E3 ubiquitine ligase MDM2 régule négativement p53, en séquestrant la protéine et donc en empêchant son activité de facteur de transcription, et en facilitant sa dégradation par son ubiquitination. Des stimuli potentiellement oncogéniques, tels l'expression de c-Myc ou d'une forme mutée de *Ras*, entraînent la transcription de *Arf*. La protéine ARF se fixe alors sur MDM2, l'inhibe et ainsi permet la stabilisation de p53 (Figure 48b) (Sherr, 2006). L'activation de p53 induit alors l'arrêt du cycle. De façon étonnante, l'absence de *Mdm2* et de *p53* n'empêche pas les effets de *Arf* sur la progression du cycle cellulaire ; suggérant que *Arf* peut contrôler la prolifération par des voies indépendantes de *p53* (Weber, 2000). Les fonctions de *Arf* indépendantes de *p53* sont sujettes à discussion ; cependant, certains résultats suggèrent que *Arf* peut intervenir directement dans le contrôle de la biogenèse des ribosomes (Sherr, 2006).

Dans des cellules humaines, ARF peut être recruté sur le promoteur de l'ADNr (Ayrault et al., 2004). De plus, ARF interagit avec le facteur de transcription UBF, inhibe sa phosphorylation sur les sérines 484 et 388, et régule ainsi négativement la transcription de l'ARNr 47S (Ayrault et al., 2006). Plus récemment, il a été montré que ARF pouvait s'associer avec le facteur de transcription TTF-1 de l'ARN polymérase I, et réprimer son activité transcriptionnelle, chez l'homme et chez la souris (Lessard et al., 2010). Par ailleurs, dans un système cellulaire murin, l'induction de *Arf* entraîne aussi des défauts de maturation des ARNr, indépendamment de leur transcription (Sugimoto et al., 2003). Il se trouve que ARF peut interagir avec la Nucléophosmine (NPM ou B23) au sein d'un complexe nucléolaire de haut poids moléculaire (Figure 48a) (Bertwistle et al., 2004). Or, l'endonucléase NPM est requise pour le clivage de l'ARNr au niveau de l'ITS-2, permettant ainsi la conversion du précurseur 32S en ARNr 28S et 5.8S. Les interactions entre ARF et NPM sont complexes ; elles font intervenir des activations/inhibitions réciproques et des régulations de la localisation subcellulaire ; elles ne sont pas complètement élucidées à ce jour (Sherr, 2006). En particulier, il est proposé qu'au sein de particules pré-ribosomiques, la déstabilisation de NPM par ARF pourrait ralentir voire inhiber la maturation des ARNr (Figure 48c-e) (Itahana et al., 2003).

Le suppresseur de tumeur *Arf* participe donc à la régulation du cycle cellulaire directement par l'induction de la voie p53, et indirectement par un contrôle négatif de la voie de biogenèse des ribosomes. Il n'est pas encore clairement compris comment l'ensemble des rôles de *Arf* sont régulés : y a-t-il une coopération pour une meilleure efficacité du processus de suppression tumorale ? Est-ce

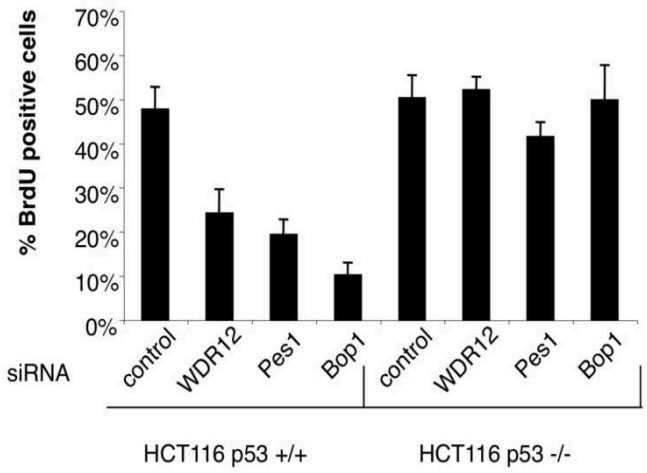


Figure 49. La délétion des membres du complexe PeBoW induit un arrêt du cycle dépendant de p53

Des cellules HCT116 *p53*$^{+/+}$ ou *p53*$^{-/-}$ sont transfectées avec des siARN dirigés contre les ARNm codant pour les protéines membres du complexe PeBoW : WDR12, PES1, BOP1. La fraction de cellules en phase S est déterminée par des analyses d'incorporation de BrdU.

d'après Hölzel et al., 2010

que le contrôle de la biogenèse des ribosomes est mis en jeu uniquement lorsque la voie Arf-Mdm2/p53 est inopérante (par exemple en absence de p53) ? Dans quelle mesure ces mécanismes sont induits suite à un stress oncogénique ou dans une situation d'homéostasie ? Il est suggéré qu'une compétition pour la liaison à ARF ait lieu entre MDM2 et NPM suggérant le contrôle d'un équilibre entre ces deux voies (Sherr, 2006).

1.1.3. Le stress ribosomique : induction d'un arrêt du cycle suite à des défauts de biogenèse des ribosomes

1.1.3.1. Des défauts de biogenèse des ribosomes induisent un arrêt du cycle et une apoptose dépendants de p53

Des perturbations de la transcription des ARNr, par un traitement à l'actinomycine D, la délétion de facteurs de transcription ou de l'ARN Polymérase I, entraînent l'activation de p53, un arrêt du cycle et une apoptose accrue (voir par exemple (Yuan et al., 2005)). Des défauts dans le processus de maturation des ARNr conduisent aussi à la stabilisation de p53. Par exemple, l'expression de formes mutées ou l'inhibition des protéines BOP1, PES1 et WDR12, membres du complexe PeBoW, entraîne des défauts de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique, associés à une élévation du niveau de p53 et un arrêt du cycle (Hölzel et al., 2005; Strezoska et al., 2002; Grimm et al., 2006). De façon intéressante, l'inactivation de *p53* restaure les défauts de cycle cellulaire de ces mutations (Figure 49) (Pestov et al., 2001; Lapik et al., 2004). Enfin, des défauts d'expression des RP sont aussi capables d'activer p53. Chez la souris, plusieurs modèles d'invalidation ou d'haploinsuffisance de certaines RP ont été développés. Je ne parlerai ici que de la protéine RPS6, cible de la voie mTOR. Autour de l'implantation, les embryons hétérozygotes pour *Rps6* présentent des défauts d'entrée en mitose, et une apoptose massive (Panić et al., 2006). Chez l'adulte, l'invalidation de *Rps6* dans le foie induit des défauts de prolifération après une hépatectomie partielle (Volarevic, 2000). L'invalidation de *p53* permet d'atténuer le phénotype létal embryonnaire, et de prolonger le développement jusqu'à E12.5. De plus, l'invalidation de p53 par ARN interférence permet de restaurer la prolifération de cellules humaines déficientes pour *Rps6* (Fumagalli et al., 2009). Cette étude suggère que la voie de réponse au stress ribosomique dépendante de p53 peut être activée *ex vivo* et *in vivo*. Est-ce que cette voie peut avoir un rôle au cours du développement normal est encore une question à appréhender.

1.1.3.2. La voie RP-Mdm2-p53, contrôle de la biogenèse des ribosomes

Il a été proposé et démontré dans plusieurs études que des altérations de la biogenèse des ribosomes pouvaient induire une voie spécifique de réponse à un stress ribosomique (pour revues, voir (Zhang and Lu, 2009; Deisenroth and Zhang, 2010)). Plus spécifiquement, c'est un déséquilibre entre la synthèse de l'ARNr et la synthèse des RP qui induit un stress ; alors que p53 n'est pas stabilisé lorsque ces deux processus augmentent de façon synchronisée (Donati et al., 2011a). Des désorganisations sévères du nucléole ne sont pas nécessaires pour l'induction d'une réponse : des

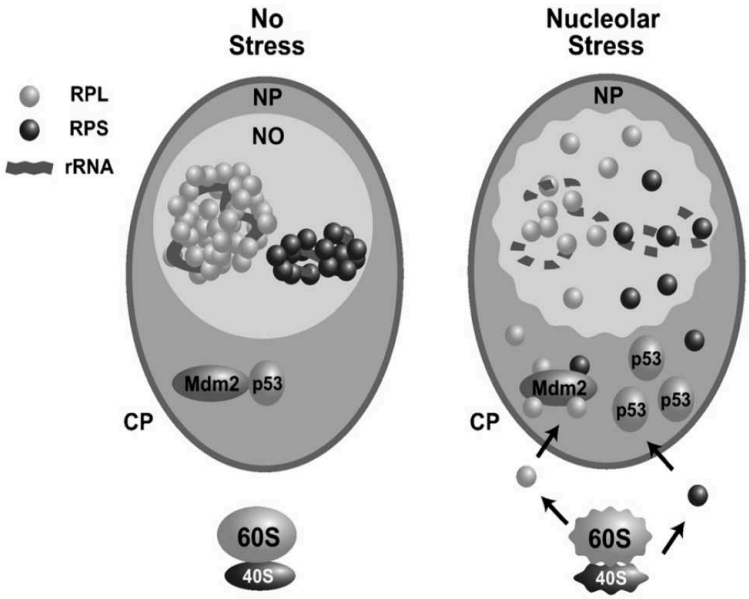


Figure 50. Représentation schématique de la voie RP-Mdm2-p53 activée par un stress ribosomique

En conditions normales de croissance, les protéines ribosomiques de la grande et de la petite sous-unité sont assemblées dans le nucléole et exportées vers le cytoplasme pour la synthèse protéique. Suite à un stress ribosomique, la biogenèse des ribosomes est altérée, et des protéines ribosomiques libres entrent dans le nucléoplasme depuis le cytoplasme ou le nucléole, et interagissent avec Mdm2, entraînant la stabilisation et l'activation de p53, et l'arrêt du cycle.

d'après Zhang and Lu, 2009

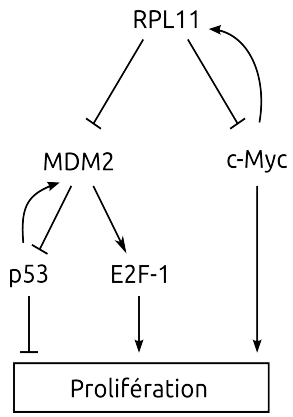


Figure 51. Rôles clés de RPL11 dans la régulation du cycle cellulaire

Suite à des défauts de biogenèse des ribosomes, la voie de réponse à un stress ribosomique peut être activée : l'association de RPL11 avec MDM2 induit la stabilisation de p53 et l'arrêt du cycle. Dans des cellules déficientes pour *p53*, l'interaction entre RPL11 et MDM2 entraîne la déstabilisation du facteur E2F-1, et donc de ses gènes cibles participant à l'entrée en phase S. Enfin, dans des conditions de culture pauvres en sérum, RPL11 se fixe sur la protéine c-Myc, et inhibe son activité, participant ainsi à la réduction du niveau de biogenèse des ribosomes et de la prolifération.

d'après Dai et al., 2007 ; Donati et al., 2011

altérations de la biogenèse des ribosomes peuvent être détectées avant l'apparition de modifications morphologiques du nucléole (Donati et al., 2011a; Fumagalli et al., 2009). La réponse au stress ribosomique fait intervenir des RP et la voie Mdm2-p53 (Figure 50). Il est généralement accepté que des défauts de biogenèse des ribosomes induisent une augmentation de la quantité des RP libres. Parmi celles-ci, RPL11 est capable de se fixer sur MDM2, entraînant alors la stabilisation de p53, et un arrêt du cycle en G1 consécutif (Bhat et al., 2004). Des défauts de biogenèse de la petite sous-unité ribosomique peuvent également induire activement la traduction de l'ARNm de *Rpl11* (Fumagalli et al., 2009). Dans les cellules ES, le maintien de la localisation nucléolaire de RPL11 régulée par PICT1 participe à la régulation de cette voie RPL11-Mdm2-p53 (Sasaki et al., 2011). Des études biochimiques ont pu mettre en évidence le rôle essentiel de la structure en doigt de zinc et de certains résidus basiques dans l'interaction entre RPL11 et MDM2 *in vitro* et *in vivo* (Zhang et al., 2011; Macias et al., 2010). Il a été proposé que d'autres RP, à savoir RPL5, RPL23, RPS7 ou RPL26, pourraient se fixer à MDM2 et réguler son activité de façon similaire (pour revue, voir (Deisenroth and Zhang, 2010)). Cependant, Fumagalli et al. ont montré que p53 était stabilisé suite à la délétion de *Rps7* ou de *Rpl23*, mais pas suite à la délétion de *Rpl5* et *Rpl11*, suggérant que RPL5 et RPL11 sont toutes les deux requises pour l'activation de la réponse au stress ribosomique (Fumagalli et al., 2012). Ces résultats remettent en cause les rôles de RPS7 et RPL23 dans la réponse au stress ribosomique. Ainsi, on voit que ces signalisations moléculaires ne sont pas encore pleinement élucidées. On peut encore s'interroger sur l'existence de voies faisant intervenir différentes RP. Ces voies seraient-elles redondantes ? Seraient-elles activées différemment en fonction des défauts détectés de la biogenèse des ribosomes ? Est-ce que le type de réponse induite par p53 pourrait dépendre des RP impliquées ?

1.1.3.3. Des voies de réponses au stress ribosomique indépendantes de p53 ?

Dans des cellules cancéreuses invalidées pour *p53*, l'inhibition de l'ARN Polymérase I entraîne un arrêt du cycle, suggérant que des mécanismes indépendants de p53 peuvent aussi coordonner le cycle cellulaire avec l'état de la biogenèse des ribosomes (Donati et al., 2011b). Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer ce contrôle. La protéine RPL11 pourrait se fixer à MDM2 et inhiber la stabilisation normalement induite par MDM2 du facteur de transcription E2F-1 (Donati et al., 2011b). Par ailleurs, RPL11 pourrait aussi participer à la régulation du cycle cellulaire indépendamment de p53, *via* l'inhibition de c-Myc. En effet, des conditions de culture pauvres en sérum entraînent l'association de RPL11 avec c-Myc, et l'inhibition consécutive de l'activité de c-Myc (Dai et al., 2007). La répression de c-Myc par RPL11 induit une réduction de la prolifération, de façon indépendante de p53. Il n'est pas encore bien compris comment les réponses induites par p53, par l'inhibition de E2F-1 et par l'inhibition de c-Myc sont coordonnées ; cependant, ces résultats soulignent la complexité des mécanismes régulant le cycle cellulaire et la biogenèse des ribosomes, et mettent en évidence des rôles régulateurs clés pour RPL11 (Figure 51). On pourrait se demander si RPL11 a aussi un rôle structurel au sein du ribosome, ou si son unique fonction est d'être un senseur

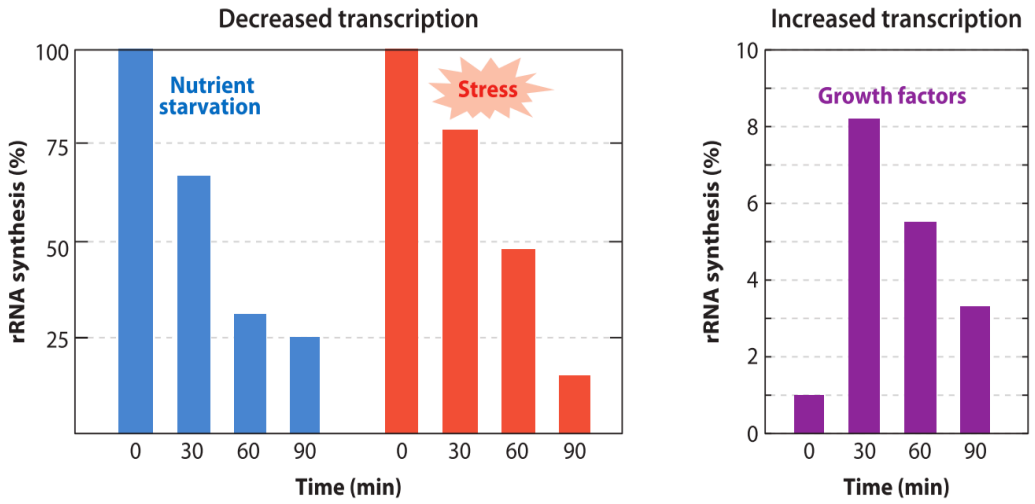


Figure 52. Régulation de la transcription par l'ARN Polymérase I en réponse à des facteurs extrinsèques

Représentation des niveaux relatifs de synthèse de l'ARNr dans des cellules soumises à des conditions pauvres en acides aminés (à gauche), dans des cellules soumises à un stress oxydatif (au milieu), ou dans des cellules stimulées par des facteurs de croissance (à droite).

d'après Drygin et al., 2010

des défauts de la biogenèse des ribosomes : séquestré en situation homéostatique par le ribosome, et libéré lorsque des défauts de biogenèse des ribosomes affectent la cellule. p53 et Myc sont apparus au cours de l'évolution et ne sont pas présents chez la levure : il serait intéressant de comparer les rôles structurels et/ou régulateurs de RPL11 chez la levure et chez les mammifères.

1.1.3.4. Des phénotypes variés suite à l'activation d'une voie de réponse au stress ribosomique

Suite à l'activation d'une voie de réponse au stress ribosomique, un arrêt du cycle en G1 est fréquemment observé. Récemment, il a été montré que des défauts dans la biogenèse des ribosomes au sein des deux sous-unités, par la délétion de RP des deux sous-unités simultanément, induisaient une « supra-induction » de p53 (Fumagalli et al., 2012). Les profils de cycle des cellules humaines analysées suggèrent l'existence d'un blocage du cycle en G1 et aussi en G2/M. Il est probable que l'activation de p53 puisse induire des réponses diverses. De nouvelles études aideront à comprendre le rôle de p53 en fonction des types de défauts de biogenèse des ribosomes et du type cellulaire. Par exemple, les cellules ES peuvent activer une voie de réponse au stress ribosomique, suite à un traitement à l'actinomycine D, suite à la déplétion de *Rpl37* (Morgado-palacin et al., 2012) ou suite à la délétion de *Notchless* (données du laboratoire, Léonard Jarzebowski). Cependant, les cellules ES ne présentent pas de point de contrôle en G1, l'activité de p53 se manifeste probablement de façon différente dans ces cellules.

1.1.3.5. Conclusion : Surveillance coordonnée de la biogenèse des ribosomes et du cycle cellulaire par les RP

Depuis une dizaine d'années, les protéines ribosomiques sont considérées comme des senseurs de l'état de la biogenèse des ribosomes. RPL11, et peut-être d'autres RP, semblent effectuer un contrôle interne et, en cas de défauts de la biogenèse des ribosomes, peuvent activer des voies de réponses au stress ribosomique. Il est intéressant de noter que la cellule est alors arrêtée en cycle avant que des défauts dans l'organisation du nucléole ne soient observés ou que la déplétion des ribosomes ne survienne.

1.2. Couplage entre les ribosomes et la régulation de la croissance

1.2.1. Régulation de l'ARN Polymérase I en fonction des conditions de croissance

L'activité transcriptionnelle de l'ARN Polymérase I est liée aux conditions de croissance et de prolifération des cellules. Des conditions associées avec des défauts métaboliques, comme un stress oxydatif, un manque de nutriments, une inhibition de la synthèse protéique, ou la confluence des cellules va induire l'inhibition de la transcription de l'ADNr. A l'inverse, la présence de facteurs de croissance ou d'agents stimulants la croissance et la prolifération entraînera l'activation de l'ARN Polymérase I (Figure 52) (pour revue, voir (Drygin et al., 2010)).

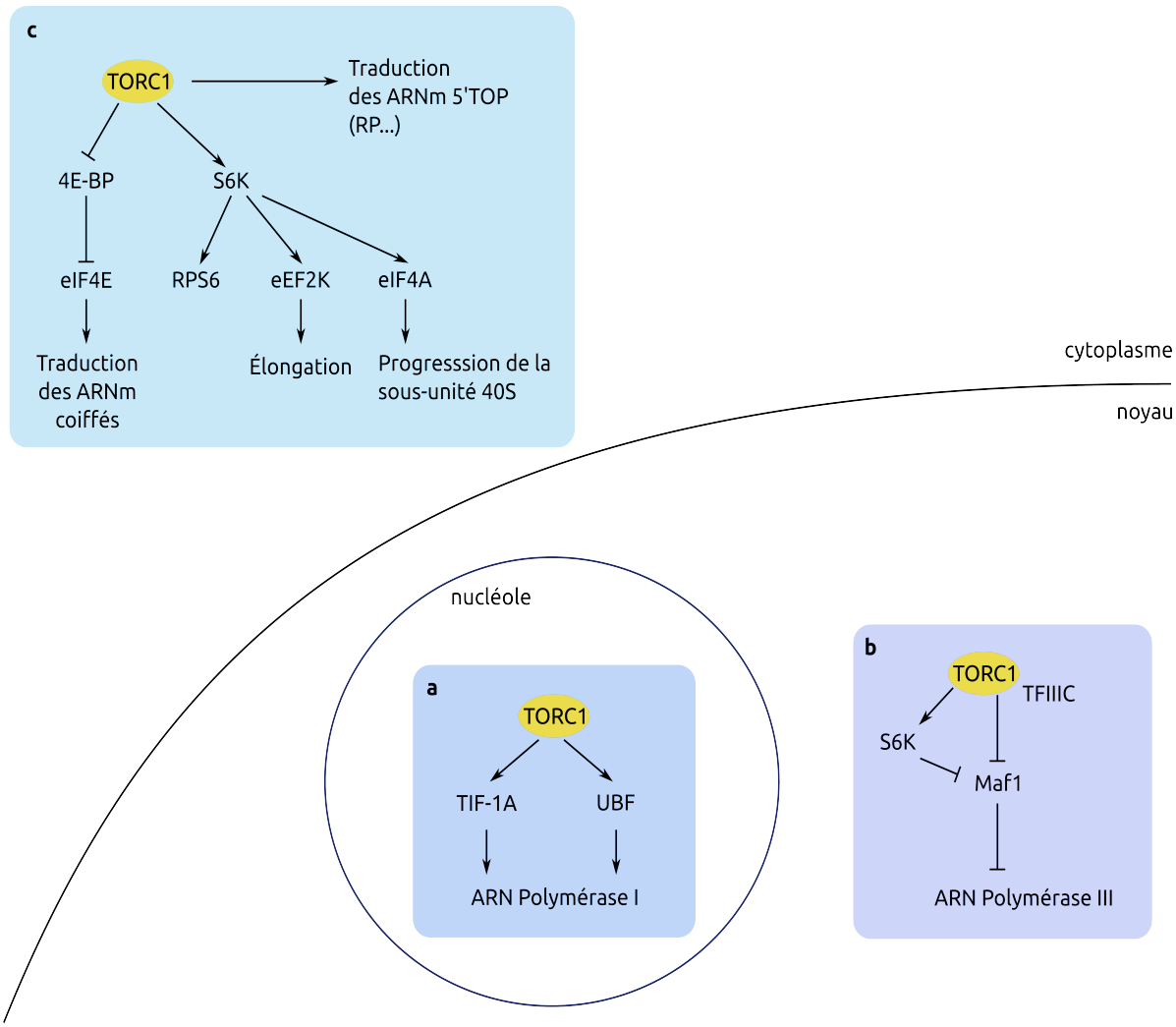


Figure 53. Contrôle de la biogenèse des ribosomes par TORC1

Schéma simplifié de la régulation de la traduction par TORC1. **a**. La régulation de la transcription des ARNr par l'ARN polymérase I a lieu dans le nucléole. **b**. TORC1 induit également la transcription de l'ARNr 5S *via* l'induction de l'ARN polymérase III. **c**. Dans le cytoplasme, TORC1 contrôle les traductions des ARNm selon plusieurs mécanismes. Des éléments sur les voies moléculaires sont détaillées dans le manuscrit.

1.2.2. La voie mTOR, acteur majeur de la régulation de la croissance

En interagissant avec d'autres protéines, la protéine kinase TOR (Target Of Rapamycin) peut former deux types de complexes TORC1 et TORC2. La voie TOR répond à une kyrielle de signaux, parmi lesquels la disponibilité en nutriments, le statut énergétique de la cellule, des stress cellulaires, des facteurs de croissance, et régule le métabolisme et la croissance cellulaire. La voie TOR est considérée comme un mécanisme important par lequel la cellule ajuste sa capacité de biosynthèse protéique à la disponibilité des nutriments. L'étude de la voie TOR chez la levure a apporté beaucoup d'informations sur les mécanismes moléculaires et les fonctions de TOR (pour revues, voir (Loewith and Hall, 2011; Mayer and Grummt, 2006)) ; son rôle dans la division cellulaire a été beaucoup étudié notamment chez la drosophile. Je m'intéresserai ici à la voie mTOR chez les mammifères, et plus particulièrement, je souhaite décrire comment les deux complexes TORC1 et TORC2 permettent une coordination de la biogenèse des ribosomes avec la croissance cellulaire.

1.2.2.1. TORC1 : régulation de la biogenèse des ribosomes à plusieurs niveaux

Chez les mammifères, TORC1 est régulé par de nombreux signaux extra- et intra-cellulaires, parmi lesquels on peut citer les facteurs de croissance et la voie PI3K/Akt. TORC1 régule la biogenèse des ribosomes à de nombreux niveaux, ce qui est illustré sur la Figure 53, et détaillé ci-après. Chez la souris, mTOR est nécessaire pour l'activation de la transcription de l'ARNr 47S. Effectivement, d'un point de vue moléculaire, TORC1 participe à la mise en place du complexe de transcription de l'ARN polymérase I, en modulant l'activité du facteur TIF-1A et en régulant le facteur UBF (Mayer et al., 2004; Hannan et al., 2003). TORC1 est trouvé sur le gène de l'ARNr 5S, suggérant également un possible contrôle direct de la transcription de cet ARNr par mTOR (Kantidakis et al., 2010). TORC1 pourrait être recruté sur le promoteur de l'ARNr 5S par une interaction avec le facteur TFIIIC, facteur de transcription associé à l'ARN Polymérase III, et pourrait inhiber le répresseur Maf1 soit directement soit indirectement *via* l'activation de la kinase S6K1. Les mécanismes moléculaires ne sont pas tous bien élucidés aujourd'hui. Récemment, Iadevaia et al. ont montré qu'en plus de son rôle dans la transcription des ARNr, TORC1 régule aussi le processus de maturation des ribosomes (Iadevaia et al., 2011).

TORC1 participe aussi au contrôle de la traduction des RP. Les ARNm codant pour les RP présentent une séquence en 5' riche en pyrimidines : séquence 5'TOP -pour 5' terminal oligopyrimidine-. La régulation de la traduction de ces ARNm dépend de l'état de croissance de la cellule : en conditions basales, leur traduction est réprimée ; elle est activée par la présence de facteurs de croissance ou de sérum. TORC1 régule la traduction de ces ARNm, ainsi que d'autres ARNm 5'TOP, codant pour des composants de la machinerie traductionnelle, comme des facteurs d'élongation (Iadevaia et al., 2008). Cependant, les mécanismes par lesquels TORC1 active spécifiquement ce type de traduction ne sont pas bien élucidés aujourd'hui (pour revue, voir (Iadevaia et al., 2012)).

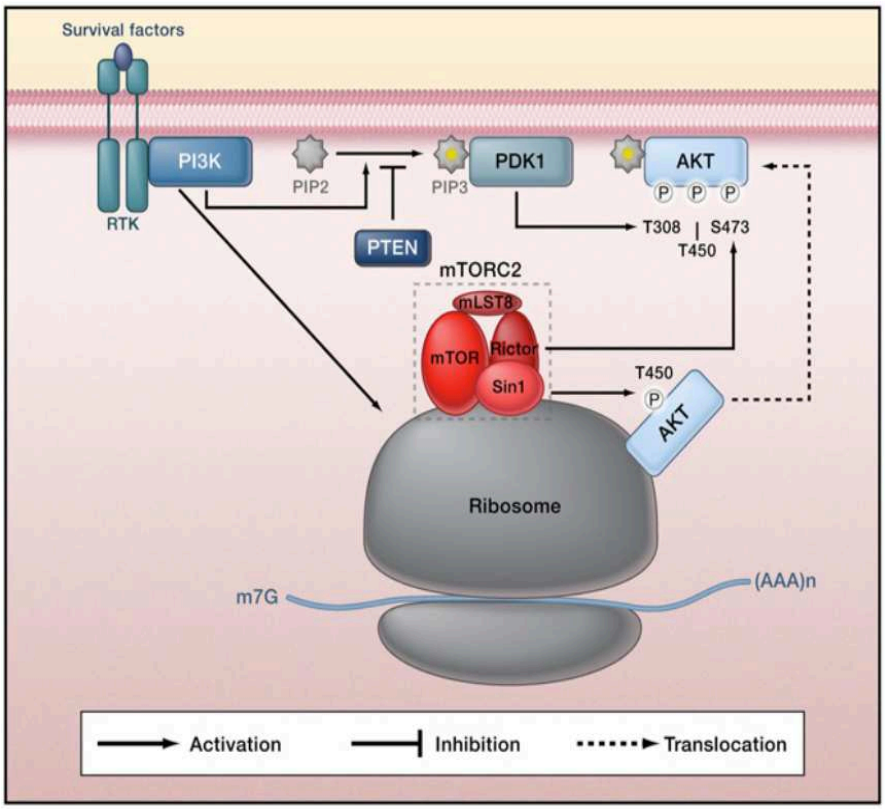


Figure 54. Régulation de TORC2 par l'association avec le ribosome

En réponse à une stimulation, l'activation de PI3K active TORC2 en induisant son association avec le ribosome. TORC2 peut alors phosphoryler AKT sur la thréonine 450, pendant sa traduction, et sur le motif hydrophobique (sérine 473) de façon post-traductionnelle et dépendante de la signalisation PI3K.

d'après Xie et Guan, 2011

Enfin, TORC1 participe au contrôle de la synthèse protéique globale. Les deux cibles les plus étudiées de TORC1 sont les facteurs 4E-BP (protéine se liant au facteur d'initiation eucaryote eIF4E) et la kinase S6K (pour revue, voir (Russell et al., 2011)). Ces deux protéines agissent sur des complexes régulateurs liés aux régions 5'UTR des ARNm. 4E-BP régule négativement l'assemblage des facteurs d'initiation en se liant et en séquestrant eIF4E. La stimulation de TORC1 par des facteurs de croissance ou des nutriments entraîne la phosphorylation de 4E-BP, et la libération de eIF4E, qui promeut la traduction des ARNm dépendante d'une coiffe, nucléotide modifié à l'extrémité 5' de l'ARNm. Dans une étude récente, Dowling et al. ont montré que les facteurs 4E-BP régulaient la prolifération cellulaire en inhibant spécifiquement la traduction dépendante de eIF4E d'ARNm codants pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Dowling et al., 2010). La délétion de 4E-BP entraîne une résistance de plusieurs lignées cellulaires aux effets anti-prolifératifs des inhibiteurs de TORC1. *Via* les facteurs 4E-BP, TORC1 régule ainsi la prolifération cellulaire. L'activation de TORC1 active aussi la traduction et l'activation de la kinase S6K. S6K phosphoryle de multiples substrats impliqués dans la synthèse protéique, parmi lesquels la protéine ribosomique RPS6, composant de la petite sous-unité, eEF2K, participant à l'élongation, et eIF4A, entraînant la progression de la petite sous-unité ribosomique 40S le long de l'ARNm.

En régulant la biogenèse des ribosomes et la traduction, TORC1 permet un contrôle de la croissance cellulaire dépendante de la disponibilité en nutriments. TORC1 joue ainsi un rôle d'intégrateur de la physiologie de la cellule et de l'environnement pour assurer une croissance adaptée.

1.2.2.2. Le ribosome et TORC2 : des collaborateurs pour la croissance

TORC2 participe à des signalisations induisant la survie cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine. Parmi ses cibles, il faut citer la kinase Akt, qui régule notamment TORC1. La voie TORC2 est moins bien connue que TORC1 ; néanmoins, des études récentes ont mis au jour l'existence d'un lien entre TORC2 et les ribosomes. Deux équipes ont montré que TORC2 s'associe aux ribosomes matures (Figure 54) (Zinzalla et al., 2011; Oh et al., 2010). Zinzalla et al. ont montré que le ribosome était nécessaire pour l'activation de la signalisation TORC2. En particulier, l'activation de la kinase PI3K dans des cellules de mammifères entraîne l'association de TORC2 avec le ribosome, et pourrait avoir un rôle physiologique à la fois dans des cellules normales et dans des cellules cancéreuses (Zinzalla et al., 2011). Oh et al. se sont intéressés à la signalisation induite par l'association de TORC2 avec le ribosome, et ont montré que TORC2 phosphorylait AKT pendant sa traduction, sur la thréonine 450 (Oh et al., 2010).

Pourquoi une telle régulation par le ribosome ? On peut spéculer qu'un tel mécanisme impliquant le ribosome assure l'activation de TORC2 dans des cellules traductionnellement actives et capables de répondre aux signaux de croissance. Ces résultats mettent également en avant l'existence de co-régulations entre TORC1 et TORC2. En effet, TORC2 associé au ribosome peut activer AKT,

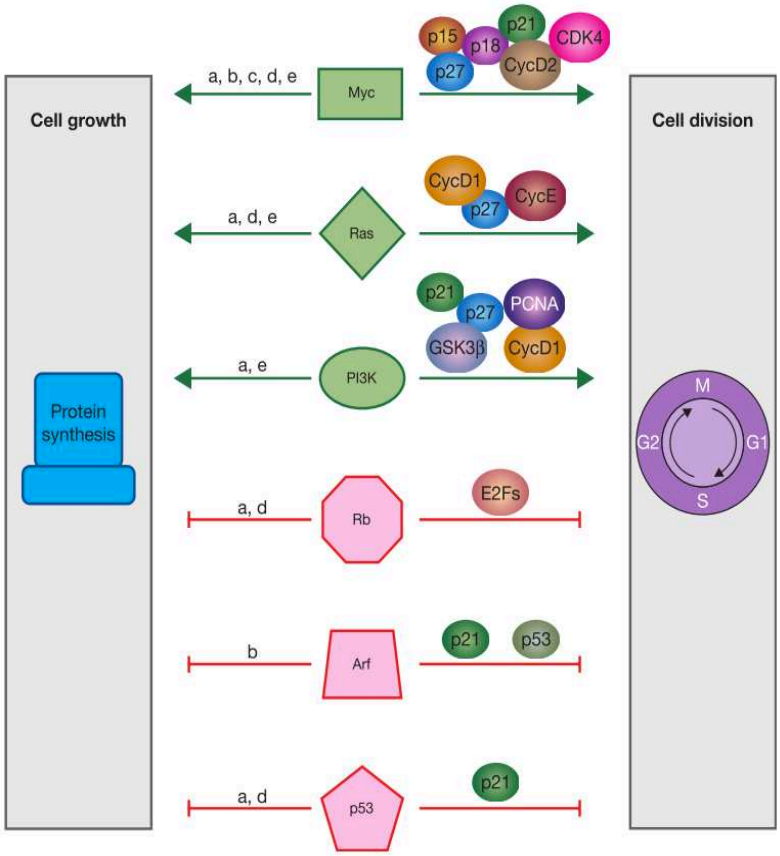


Figure 55. Contrôle coordonné de la croissance cellulaire et de la prolifération

Plusieurs voies de signalisations régulent à la fois la croissance (à gauche) et la prolifération (à droite), de façon activatrice (ou oncogénique, en rouge) ou de façon répressive (ou suppression de tumeur, en vert). Les processus participant à la régulation de la croissance sont : la transcription par l'ARN Polymérase I (a), la maturation des ARNr (b), la transcription par l'ARN polymérase II (c), la transcription par l'ARN polymérase III (d), la traduction des ARNm (e).

d'après Oskarsson and Trumpp, 2005

dont TORC1 est une cible directe et indirecte. TORC1, quant à lui, en régulant la synthèse des ribosomes peut affecter l'activation de TORC2.

1.3. Les ribosomes, à la croisée de la croissance et de la prolifération

Les contrôles de la synthèse protéique, de la biogenèse des ribosomes, de la croissance cellulaire et de la division sont intimement liés. En effet, la division cellulaire requiert une augmentation de la croissance, et donc une synthèse protéique plus importante. De plus, la division cellulaire nécessite aussi la présence de certaines protéines spécifiques, impliquées dans la régulation de points de contrôle du cycle cellulaire. Considérer alors séparément les régulations de la croissance et de la prolifération est sûrement simpliste, voire faux. De nombreuses régulations croisées existent, je vais seulement ici m'intéresser au rôle des ribosomes dans le couplage entre la croissance et le cycle cellulaire.

Chez la levure, la cellule doit atteindre une taille critique avant de pouvoir se diviser. Afin de comprendre quels mécanismes permettaient de coordonner la régulation du cycle cellulaire avec la croissance et la taille de la cellule, des cribles systématiques ont été réalisés. Ces études ont montré que plusieurs gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes sont nécessaires pour assurer le couplage entre la taille de la cellule et la division (Jorgensen et al., 2002).

Chez les mammifères, de nombreuses voies de signalisation régulent à la fois la prolifération et la croissance (Figure 55). De façon intéressante, la régulation à plusieurs niveaux de la biogenèse des ribosomes contrôle la croissance des cellules. Nous avons parlé du suppresseur de tumeurs *Arf* tout à l'heure, l'exemple de *Myc* est également éloquent. En réponse à des signaux mitogéniques, *Myc* induit la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, et induit la biogenèse des ribosomes, connectant ainsi la régulation de la prolifération avec la croissance (pour revues, voir (Oskarsson and Trumpp, 2005; Murphy et al., 2005)). c-Myc active la biogenèse des ribosomes à plusieurs niveaux : c-Myc augmente l'activité de l'ARN polymérase I en facilitant le recrutement du facteur TIF-IB sur le promoteur de l'ADNr ; il active la transcription des protéines ribosomiques par l'ARN polymérase II, et il augmente la transcription par l'ARN polymérase III en activant le facteur TFIIIB (pour revue, voir (Van Riggelen et al., 2010)). En particulier, c-Myc induit la transcription de *Rpl11*, et par un rétro-contrôle négatif, RPL11 peut inhiber l'activité de c-Myc, ce qui met en lumière des régulations croisées complexes (Figure 51) (Dai et al., 2007). Dans une situation du tumorigenèse induite par Myc, ou suite à un stress ribosomique, c-Myc pourrait également activer la voie RPL11-Mdm2-p53 (Kim et al., 2011; Macias et al., 2010). A une échelle pluricellulaire, on peut noter que *Myc* joue un rôle dans l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la prolifération des cellules hématopoïétiques immatures (*cf.* Partie 1 : II.2.2.1). Pléthore de signalisations sont régulées par *Myc*. Cependant, l'intégration de la régulation du cycle cellulaire et de la croissance des cellules souches est

particulièrement importante : *Myc* pourrait participer au maintien d'un équilibre entre ces mécanismes cellulaires.

2. L'hétérogénéité des ribosomes, au service d'une hétérogénéité fonctionnelle

2.1. Introduction : un filtre ribosomique ?

Des premières données suggérant que les ribosomes eucaryotes pourraient ne pas être homogènes datent des années 1970 ! En particulier, des analyses sur gel révèlent des différences dans les protéines présentes au sein des ribosomes natifs, des sous-unités dérivées de ribosomes libres, ou de polysomes, associés ou non à la membrane dans des cellules de mammifères (McConkey and Hauber, 1975). Pourtant, les ribosomes ont longtemps été considérés comme des entités constitutives et homogènes au sein des cellules.

Depuis quelques années, des résultats soulignent la possibilité d'une hétérogénéité des ribosomes, chez la levure, mais également chez les invertébrés et chez les mammifères. Il est fascinant de constater que les ribosomes peuvent être distincts les uns des autres à de nombreux niveaux : la séquence primaire et les modifications de l'ARNr, la présence de certaines RP, et/ou de leurs paralogues, les modifications post traductionnelles de plusieurs natures, et enfin, les facteurs associés aux ribosomes matures. Ainsi, une quantité formidable de ribosomes différents peuvent en théorie être produits. L'hypothèse séduisante que cette diversité pourrait générer des ribosomes fonctionnellement différents a été initialement formulée sous l'appellation de « filtre ribosomique » (Mauro and Edelman, 2007). Cette hypothèse postule l'existence d'un code ribosomique, qui, en parallèle du code génétique, apporterait un niveau de régulation supplémentaire de l'expression génique.

Dans cette partie, j'ai choisi de détailler quelques exemples d'hétérogénéité des ribosomes, principalement dans des cellules de mammifères, parfois chez d'autres espèces. Quand les données sont disponibles, j'ai essayé de décrire comment cette hétérogénéité pourrait affecter la traduction.

2.2. La séquence de l'ARNr : peu de données chez les mammifères

Chez les mammifères, plusieurs centaines de copies d'ADNr sont présentes dans le génome. Est-ce que ces séquences sont toutes transcrites de façon équivalente ? Comment est régulée leur transcription ? Peu de données existent chez les mammifères pour répondre à ces questions. Néanmoins, deux exemples, chez le parasite *Plasmodium* et chez la bactérie *Escherichia coli*, suggèrent que la séquence de l'ARNr en elle-même pourrait constituer un premier niveau d'hétérogénéité fonctionnelle.

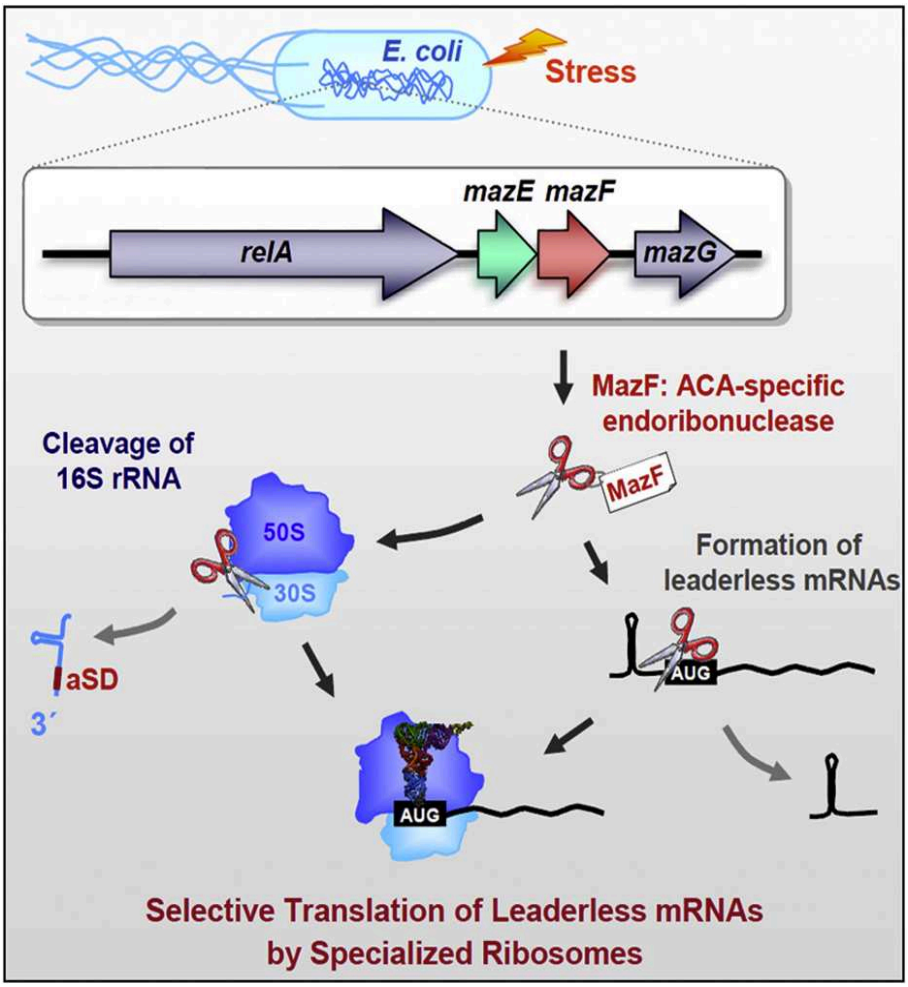


Figure 56. Génération de ribosomes de stress et réponse spécifique suite à un stress chez la bactérie *E.coli*

Suite à un stress, l'endonucléase MazF est activée. Cette enzyme clive l'extrémité 3' de l'ARNr 16, libérant la séquence anti-Shine-Dalgarno. Les ribosomes alors générés ne sont plus capables de reconnaître et de traduire la plupart des ARNm, à l'exception d'ARNm dits « leaderless », auxquels il manque la séquence Shine-Dalgarno en 5'. En parallèle, MazF reconnaît des sites ACA et clive la séquence en amont du codon AUG sur une sous-population d'ARNm impliqués dans la réponse au stress, permettant ainsi leur traduction spécifique par les ribosomes « de stress ».

d'après Vesper et al., 2011

Il y a 25 ans, une équipe américaine a entrepris de séquencer l'ARNr de la petite sous-unité à différentes phases du cycle de la vie du parasite *Plasmodium* (Gunderson et al., 1987). Étonnamment, ils ont trouvé une forme prédominante lorsque le parasite est sous forme de sporozoïte, *i.e.* de cellules dans le moustique avant une nouvelle infection ; une autre séquence de l'ARNr est trouvée lorsque le parasite se trouve dans la circulation de l'hôte infecté. Ainsi, le parasite *Plasmodium* exprime deux formes d'ARNr différentes au cours du cycle d'infection.

Suite à un stress chez la bactérie *E.coli*, l'endonucléase MazF est activée. Cette activation induit une forte répression de la traduction, à l'exception de la traduction d'une petite portion d'ARNm, spécifiquement impliqués dans la réponse au stress et la mort cellulaire (Vesper et al., 2011). De façon remarquable, cette traduction spécifique est expliquée par la formation de ribosomes spécialisés, dits des « ribosomes de stress ». Par des clivages de certains ARNm et de l'ARNr au sein des ribosomes, MazF est capable de générer des ribosomes spécifiquement efficaces pour la traduction de ces ARNm en question. Des informations plus moléculaires sont détaillées dans la Figure 56. Ainsi, l'hétérogénéité des ribosomes, par des variations de la séquence de l'ARNr, assure un mécanisme d'adaptation au stress efficace.

2.3. Des modifications post-transcriptionnelles de l'ARNr importantes pour la traduction des ARNm initiée par les IRES

Le rôle des modifications de l'ARNr dans la synthèse protéique a été abordé par l'étude du modèle murin de la dyskératose congénitale. Comme nous en avons déjà parlé, la forme liée à l'X de la dyskératose congénitale est associée à des mutations dans la *dyskérine*, enzyme qui participe à la stabilisation des ARNr par la conversion d'uridines en pseudo-uridines (*cf.* Partie 1 : II.4.1.2.3). Les souris portant une mutation hypomorphe $Dkc1^{m}$ présentent effectivement des défauts dans les modifications de l'ARNr (Ruggero et al., 2003) ; et des cellules $Dkc1^{m}$ ou des cellules de patients présentent une traduction affectée des ARNm initiée par une séquence IRES (pour Internal Ribosome Entry Site, séquence d'initiation de la traduction de certains ARNm) (Yoon et al., 2006).

2.4. Des modifications post-traductionnelles des RP

Les RP peuvent subir plusieurs types de modifications post-traductionnelles : méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination (Yu et al., 2005). Si l'on sait que beaucoup des RP subissent effectivement certaines de ces modifications, y compris chez les mammifères, leur rôle n'est pas bien compris. Que des modifications post-traductionnelles des RP puissent être à l'origine d'hétérogénéité dans les ribosomes n'est encore aujourd'hui qu'une hypothèse. Peu d'exemples sont connus chez les mammifères, je m'attarderai sur la régulation de la phosphorylation de RPS6 par la kinase S6K qui a attiré beaucoup d'attention (pour revue, voir (Meyuhas and Dreazen, 2009)). La protéine RPS6 peut être phosphorylée sur 5 sites par la kinase S6K, en réponse à des signaux

mitogéniques ou des facteurs de croissance. Certains résultats avaient suggéré que cette phosphorylation était nécessaire pour la traduction des ARNm avec une séquence 5'-TOP, les ARNm 5'TOP et la kinase S6K étant activés de façon corrélée. Pourtant, l'analyse de la souris *rpS6*$^{P-/-}$ exprimant deux allèles non phosphorylables de RPS6 a révélé que la phosphorylation de cette protéine ribosomique n'est pas impliquée dans la synthèse protéique (Ruvinsky et al., 2005). Cependant les cellules *rpS6*$^{P-/-}$ sont plus petites, et la souris *rpS6*$^{P-/-}$ présente des défauts de tolérance du glucose, suggérant ainsi que la phosphorylation de RPS6 pourrait avoir un rôle.

2.5. Des facteurs associés au ribosome peuvent modifier son activité

Dans les cellules HeLa, la protéine GYS1 -pour glycogen synthase 1- a récemment été identifiée comme un facteur associé aux ribosomes en cours d'élongation (Fuchs et al., 2011). GYS1 catalyse une réaction limitante de la biosynthèse du glycogène, et est donc impliquée dans la régulation du métabolisme cellulaire. La délétion de *GYS1* par ARN interférence modifie l'abondance et l'efficacité de la traduction d'une sous-population d'ARNm, incluant son propre ARNm, suggérant que GYS1 intervient dans le contrôle traductionnel. Des données supplémentaires seront nécessaires pour comprendre comment GYS1 assure ce contrôle d'un point de vue moléculaire. Cette étude suggère néanmoins déjà que GYS1 pourrait participer à la coordination entre l'état énergétique de la cellule et le contrôle de la machinerie traductionnelle par son association avec le ribosome.

L'exemple de la protéine Reaper chez la drosophile est également intéressant. Reaper est un facteur pro-apoptotique capable d'inhiber les inhibiteurs de l'apoptose, et aussi la synthèse protéique générale (Holley et al., 2002). En se fixant directement sur la sous-unité 40S, Reaper peut affecter la reconnaissance du codon initiateur AUG, et inhiber ainsi la traduction des ARNm dépendante d'une coiffe (Colón-Ramos et al., 2006). Par contre, la traduction initiée par des IRES implique le recrutement du ribosome directement sur le site d'initiation de la traduction, et n'est pas affectée par Reaper. Ainsi, les ribosomes associés à Reaper favorisent la traduction d'ARNm initiée par des IRES, contrôlant ainsi un programme traductionnel particulier.

2.6. L'expression non homogène des RP: une source d'hétérogénéité à l'échelle de l'organisme

2.6.1. Des spécificités de l'expression des protéines ribosomiques paralogues chez les mammifères

De nombreux paralogues pour les RP ont été identifiés chez la levure, chez la plante, et chez la drosophile. Issues de duplication des génomes, les différentes copies d'une même protéine ribosomique ne sont pas toujours redondantes, et peuvent avoir développé des spécificités dans leurs expressions et/ou leurs fonctions (pour revue, voir (Xue and Barna, 2012)). Par contraste, chez les

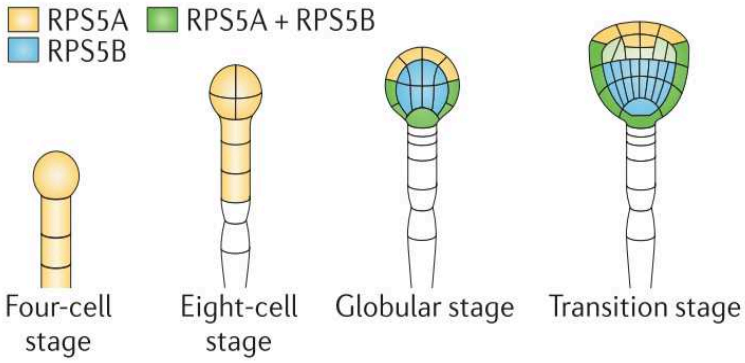


Figure 57. Hétérogénéité dans la composition des ribosomes chez *A.Thaliana* au cours du développement

Les protéines ribosomiques paralogues RPS5A et RPS5B ont des profils d'expression différents. RPS5A est exprimé dans les cellules en prolifération au cours du développement, RPS5B est exprimé préférentiellement dans les cellules en différenciation.

d'après Weijers et al., 2001 ; Xue and Barna, 2012

mammifères, beaucoup de pseudogènes et peu de paralogues ont été identifiés pour les RP. Je m'intéresserai ici aux quelques exemples décrits chez l'homme et la souris.

Chez l'homme, des paralogues ont été décrits pour la protéine RPS4. RPS4 est codée par 3 gènes : *RPS4X* sur le chromosome X et *RPS4Y1* et *RPS4Y2* sur le chromosome Y. Peu de données sont disponibles sur les rôles spécifiques de ces paralogues, cependant le profil d'expression réalisé en PCR quantitative révèle une expression ubiquitaire pour RPS4X et RPS4Y1, alors que l'expression de RPS4Y2 est restreinte aux testicules et à la prostate (Lopes et al., 2010).

Chez la souris, des protéines paralogues ont été identifiées pour RPL10, RPL22 et RPL39. Des analyses protéiques sur des gels 2D ont permis de déterminer les expressions relatives de ces protéines dans les testicules, la glande mammaire et le foie. Les protéines RPL10, RPL22 et RPL39 sont exprimées fortement dans ces trois organes. De façon surprenante, les protéines paralogues de RPL10 et de RPL39, appelées respectivement RPL10-like et RPL39-like, sont exprimées uniquement dans les testicules, alors que RPL22-like est exprimée de façon minoritaire dans le foie et la glande mammaire, mais pas dans les testicules (Sugihara et al., 2010). L'analyse de l'expression de l'ARNm de RPL39-like a révélé, également chez l'homme, une expression spécifique dans le testicule, parmi les 16 tissus humains analysés (Nadano et al., 2002). Il faut noter dans l'étude de Sugihara et al. l'intérêt de l'approche protéomique pour l'étude de l'expression des RP. Par ailleurs, les auteurs ont vérifié que la protéine RPL39-like est localisée dans le nucléole, et est incorporée à la grande sous-unité ribosomique, ce qui est cohérent avec une fonction au sein du ribosome pour cette protéine.

Ces résultats montrent que les RP paralogues peuvent être exprimées différentiellement selon les tissus, et pourraient donc être fonctionnellement distinctes. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une étude a montré que les RP paralogues pouvaient effectivement avoir des rôles non redondants. En particulier, des rôles fonctionnels spécifiques de certaines protéines paralogues ont été identifiés pour la sélection du site du bourgeon lors de la division, ou alors pour des résistances à diverses drogues (Komili et al., 2007). Des expériences plus approfondies aideront maintenant à évaluer le rôle de ces protéines paralogues chez les mammifères.

2.6.2. Un exemple chez la plante : des ribosomes différents en fonction du stade de différenciation ?

Chez la plante *A.thaliana*, des protéines ribosomiques paralogues sont exprimées différentiellement au cours du développement. Le gène *RPS5A* est fortement exprimé au niveau ARNm dans les cellules en division, alors que le gène *RPS5B* est exprimé, à un plus faible niveau, dans les cellules en cours de différenciation (Figure 57) (Weijers et al., 2001). Ce résultat pourrait suggérer l'existence de ribosomes hétérogènes au sein d'un même lignage au cours du développement. Il pourra être mis en parallèle avec les données tendant à proposer un rôle particulier des ribosomes au cours du développement, et pour les cellules souches (*cf.* Partie 2 : 3.1).

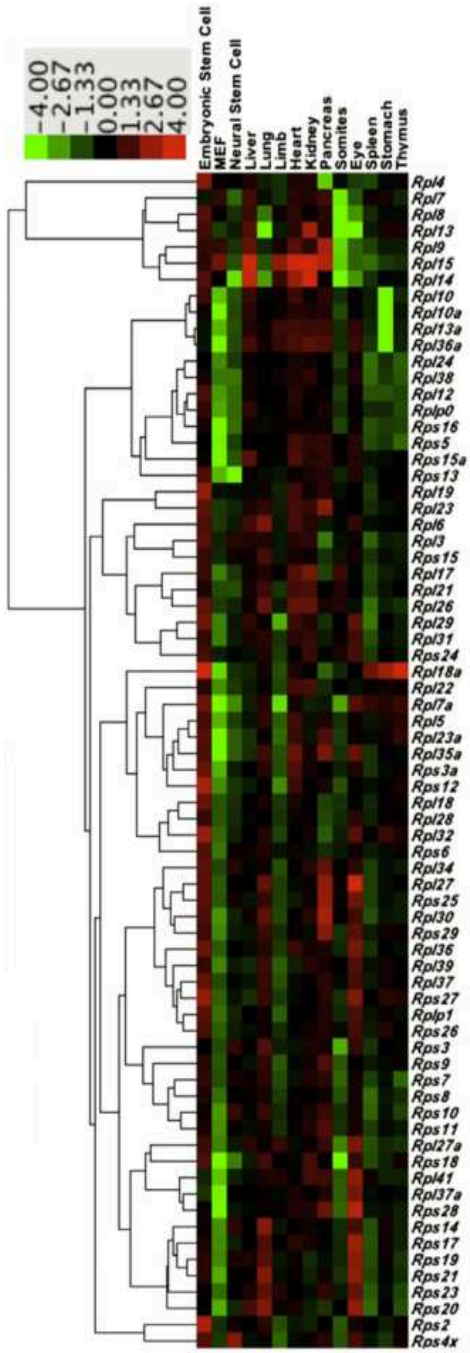


Figure 58. Profil d'expression des RP dans l'embryon de souris

Le diagramme montre les expressions de 72 protéines ribosomiques au niveau ARNm dans 14 tissus ou cellules de l'embryon. Le code couleur est gradué de +4 à -4 en échelle log2.

d'après Kondrashov et al., 2011

2.6.3. Quelques données sur le profil d'expression des protéines ribosomiques

Quelques données sur le profil d'expression des ARNm des RP dans quelques tissus chez l'homme et au cours du développement chez la souris sont aujourd'hui disponibles (Figure 58) (Bortoluzzi et al., 2001; Kondrashov et al., 2011). De façon surprenante, une forte hétérogénéité est observée pour certaines protéines ribosomiques dans les tissus observés. Nous en reparlerons dans la partie concernant les ribosomes et le développement (*cf.* Partie 2 : 3.1.1).

2.7. Conclusion : une hétérogénéité, pour un programme traductionnel défini ?

L'ensemble des résultats présentés ici met en évidence plusieurs sources possibles d'hétérogénéité des ribosomes de mammifères. Cependant, les données disponibles ne permettent pas aujourd'hui d'affirmer avec certitude que des ribosomes hétérogènes coexistent dans une même cellule, un même tissu ou un même organisme, ou au cours du développement. Certaines études indiquent que des ribosomes différents pourraient avoir une affinité particulière pour certains types d'ARNm et promouvoir ainsi un programme traductionnel spécifique. Des approches complémentaires sont aujourd'hui nécessaires pour comprendre comment s'applique cette spécificité de la traduction. On pourrait alors supposer que la cellule régule l'expression génique au niveau de la traduction par l'utilisation de ribosomes différents. Modifier certains ribosomes peut permettre à la cellule d'adapter rapidement et efficacement son programme traductionnel à une situation donnée, en particulier en cas de stress.

D'autres sources d'hétérogénéité des ribosomes sont aujourd'hui suspectées ou peuvent être envisagées : la localisation subcellulaire et la dégradation contrôlée des ribosomes pourraient également participer à la régulation de la traduction. Enfin, on peut supposer qu'au-delà de l'hétérogénéité dans la composition des ribosomes, leur biogenèse en elle-même pourrait présenter des différences en fonction des types cellulaires. Nous reviendrons sur cette dernière hypothèse dans le cadre de mes résultats qui tendent à montrer que *Notchless* est nécessaire à la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques, mais pas dans les cellules B. Est-ce que des voies alternatives de biogenèse des ribosomes peuvent participer à l'hétérogénéité de la composition des ribosomes ? Est-ce que les différents ribosomes ainsi formés pourraient avoir des programme traductionnels différents ? Ces questions sont bien sûr essentielles et seront abordées dans la discussion générale.

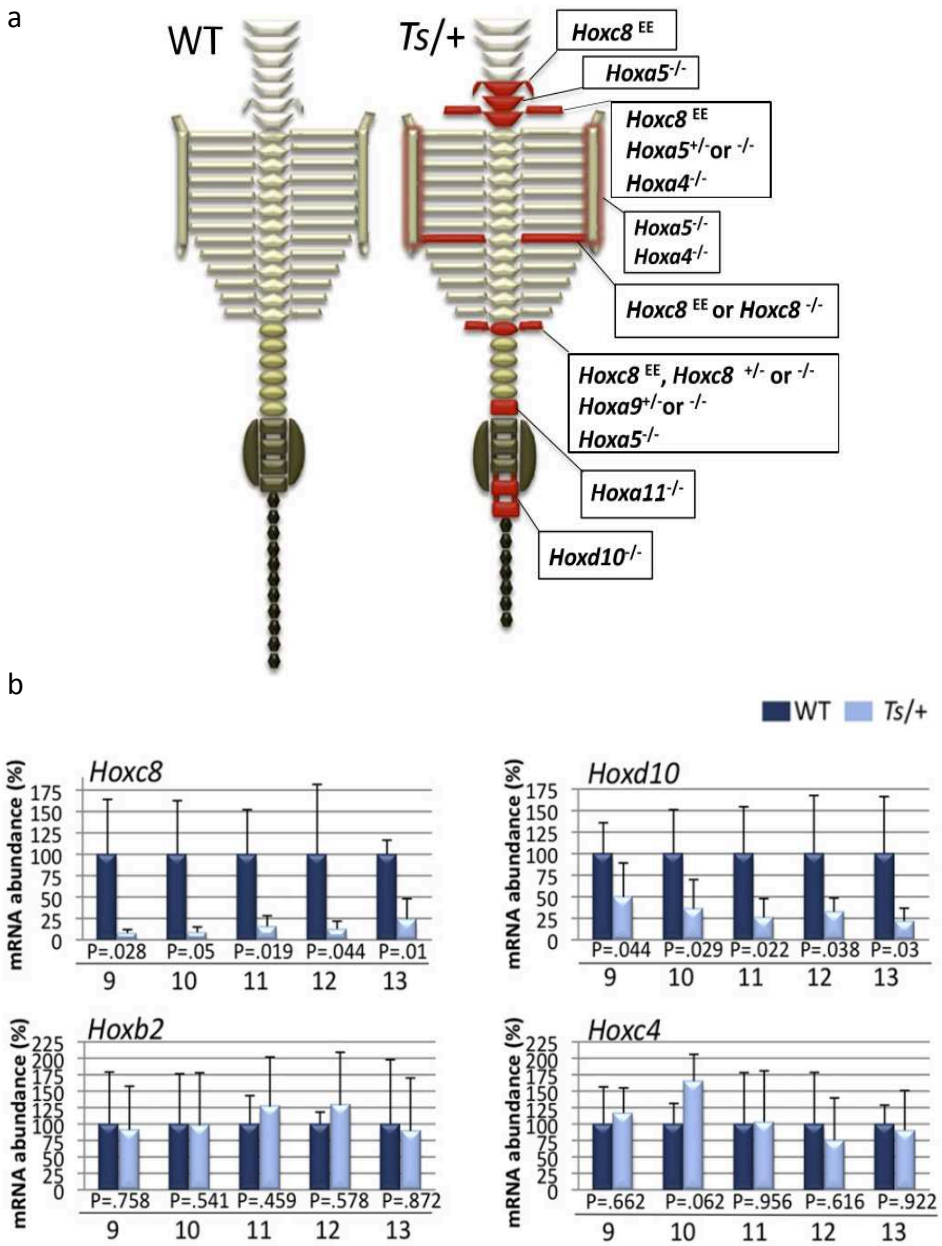


Figure 59. RPL38 régule la traduction de certains gènes *Hox* au cours du développement

a. Représentation schématique de l'axe squelettique d'une souris contrôle et d'une souris *Ts/+*, haploinsuffisante pour *Rpl38*. En rouge sont indiqués les défauts observés chez la souris *Ts/+*. Les mutations des gènes *Hox* qui induisent des phénotypes similaires sont listées sur la droite. On peut remarquer que les défauts observés chez la souris *Ts/+* sont similaires à ceux observés suite à une perte de fonction de plusieurs gènes *Hox*. **b**. Analyse des ARNm en cours de traduction dans le tube neural et les somites. Les fractions 9 à 13 représentent les fractions des polysomes après séparation sur gradient de sucrose. Des associations différentes des ARNm avec les polysomes dans les souris *Ts/+* par rapport à des souris contrôles sont observées pour 8 des 39 gènes Hox : des graphes représentatifs pour les gènes *Hoxc8* et *Hoxd10* sont présentés. Les graphes se référant aux gènes *Hoxb2* et *Hoxc4* sont représentatifs des gènes *Hox* dont l'incorporation dans les polysomes n'est pas modifiée dans les souris *Ts/+*.

d'après Kondrashov et al., 2011

3. Rôles régulateurs des ribosomes au sein d'un organisme pluricellulaire en situation normale et pathologique

3.1. En situation normale

3.1.1. Rôles régulateurs des ribosomes au cours du développement

3.1.1.1. Rôle des ribosomes au cours du développement chez plusieurs espèces

Les mutations dans des protéines ribosomiques sont associées à des défauts de développement dans plusieurs espèces. Bien documentés chez la drosophile, les mutants « Minute » présentent des phénotypes variables, dont des retards de développement, des soies courtes et fines et des problèmes de fertilité (Lambertsson, 1998). Chez la plante et le zebrafish, des mutations dans les protéines ribosomiques induisent également des défauts variables de développement, et l'haploinsuffisance de certaines RP, mais pas de toutes, peut favoriser l'apparition de tumeurs chez le zebrafish (Byrne, 2009; Uechi et al., 2006; Lai et al., 2009). De tels phénotypes spécifiques de certains tissus peuvent paraître étonnants, cependant, plusieurs pistes d'explications pourraient aider à les expliquer. On peut penser que les cellules prolifératives, requérant une forte synthèse protéique peuvent être plus sensibles à des haploinsuffisances des protéines ribosomiques. Par ailleurs, certaines RP peuvent avoir des rôles extra-ribosomiques, requis dans des tissus en particulier et pouvant expliquer ainsi des phénotypes observés (pour revue, voir (Warner and McIntosh, 2009)). Enfin, l'haploinsuffisance de certaines RP pourrait induire une altération qualitative de la traduction, comme cela a été montré suite à l'inhibition de l'expression de *Rps6* dans des cellules humaines (Fumagalli et al., 2009). Une augmentation de la traduction des ARNm 5'-TOP a été observée malgré une baisse globale du niveau de la traduction. De telles modifications, si elles sont reproduites *in vivo*, pourraient se traduire par des défauts spécifiques de certains tissus au cours du développement.

3.1.1.2. Rôle de RPL38 au cours du développement : un nouveau régulateur des gènes Hox

Dans une élégante étude publiée l'année dernière, l'équipe de M.Barna a mis en évidence le rôle de RPL38 dans la traduction des ARNm de certains gènes Hox et dans la mise en place de l'organisation des tissus au cours du développement chez la souris (Kondrashov et al., 2011). L'haploinsuffisance de *Rpl38* induit des transformations homéotiques correspondant à des mutations de plusieurs gènes *Hox* (Figure 59a). La traduction globale n'est pas affectée, néanmoins des approches pointues de RT-qPCR sur les ARNm en cours d'élongation sur les polysomes dans le tube neural et les somites indiquent que RPL38 est nécessaire pour la traduction de certains gènes *Hox*, mais pas de tous, dans ces tissus (Figure 59b). Ainsi RPL38 exerce un contrôle traductionnel spécifiquement sur ces ARNm, contrôle dont les aspects moléculaires ne sont pas encore connus. Notons que l'ensemble des protéines RPL38 est incorporé dans les ribosomes ; les auteurs en

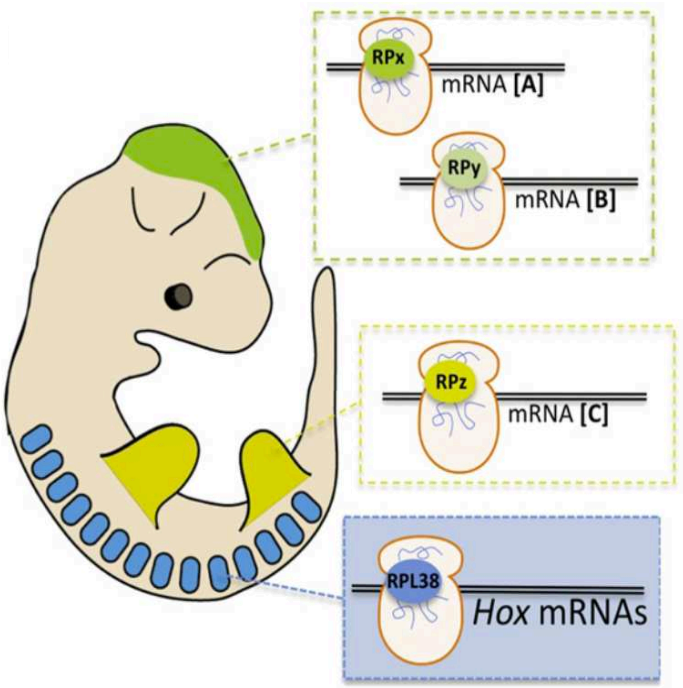


Figure 60. Modèle proposé pour le contrôle de l'expression génique au cours de l'embryogenèse

Certaines protéines ribosomiques (RP) sont enrichies dans certains tissus, et pourraient participer à la régulation du développement par un contrôle traductionnel spécifique de certains ARNm. En particulier, *Rpl38* régule traductionnellement certains ARNm de gènes *Hox*. cerveau (vert) ; membres (jaune) ; somites (bleu).

d'après Kondrashov et al., 2011

concluent que RPL38 exerce son contrôle traductionnel probablement au sein du ribosome, en régulant la formation du complexe 80S sur les ARNm des gènes *Hox* en question.

Par PCR quantitative et par hybridation *in situ*, le profil d'expression de *Rpl38* dans l'embryon de souris a été analysé (Kondrashov et al., 2011). De façon intéressante, les transcrits de *Rpl38* sont exprimés plus fortement dans les tissus affectés dans les souris haploinsuffisantes, notamment dans les somites en développement et les précurseurs des vertèbres.

L'étude de N.Kondrashov montre pour la première fois chez les mammifères qu'une protéine ribosomique participe à la régulation des processus développementaux par la traduction spécifique de certains ARNm. En considérant le profil d'expression hétérogène des protéines ribosomiques au sein de l'embryon de souris, on peut penser que, à l'image de RPL38, d'autres RP pourraient jouer un rôle régulateur en contrôlant l'expression de certains gènes clés du développement (Figure 60).

3.1.2. Rôles régulateurs des ribosomes dans les cellules souches ?

3.1.2.1. Importance particulière de protéines nucléolaires et de la biogenèse des ribosomes dans le maintien des cellules ES murines ?

Plusieurs gènes nucléolaires ont été identifiés comme d'importants régulateurs du maintien des cellules ES murines. En particulier, un crible gain de fonction réalisé sur des cellules pluripotentes de carcinome embryonnaire P19 a identifié la protéine Mki67ip comme régulateur de la pluripotence (Abujarour et al., 2010). Mki67ip et la nucléophosmine (NPM) sont fortement exprimées dans les ES et au cours du développement précoce. Dans les cellules ES, Mki67ip et NPM interagissent et participent au maintien de la prolifération et de la pluripotence des cellules. Par ailleurs, la nucléostemine et la nucléoline sont exprimées dans les nucléoles des cellules ES, et sont nécessaires au maintien de leurs propriétés (Tsai and McKay, 2002; Yang et al., 2011). Ces protéines nucléolaires ont été associées de façon plus ou moins précise à des rôles dans la biogenèse des ribosomes. Ainsi, une des multiples fonctions de NPM est de réguler la biogenèse des ribosomes à de nombreux niveaux (pour revue, voir (Lindström, 2011)). Le rôle de la nucléostemine dans la maturation de la grande sous-unité ribosomique a également été décrit récemment (Romanova et al., 2009). Mki67ip est une protéine capable de se lier à l'ARN, elle interagit avec la forme phosphorylée de Ki67 au cours de la mitose dans les cellules HeLa. La localisation nucléolaire et la régulation dépendante du cycle cellulaire de Mki67ip et Ki67 ont amené plusieurs équipes à proposer un rôle dans la biogenèse des ribosomes pour ces protéines, cependant, ce rôle n'a pas été montré formellement (Takagi et al., 2001; MacCallum and Hall, 2000). Si ces travaux soulignent l'importance de plusieurs protéines nucléolaires dans le maintien de l'état indifférencié des cellules ES, il n'est pas clairement établi que c'est leur rôle dans la biogenèse des ribosomes qui régule leurs propriétés.

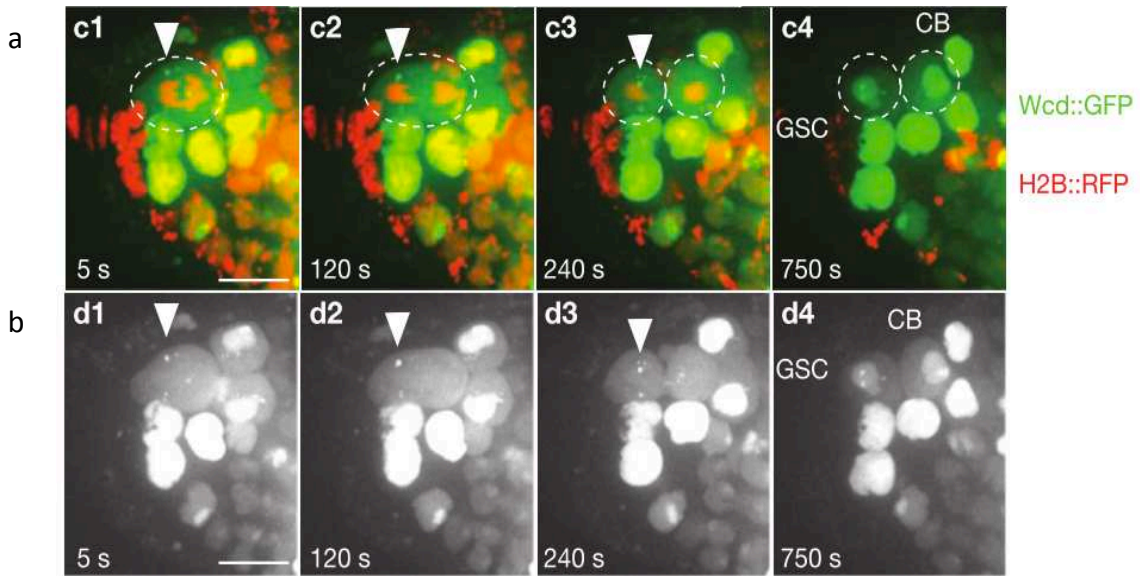


Figure 61. Wicked est ségrégée asymétriquement au cours de la mitose des cellules souches germinales

a. La protéine de fusion Wicked:Gfp est en vert ; le marqueur de l'ADN H2B:RFP est en rouge. La cellule souche germinale en cours de division est marquée par un cercle en pointillé, les têtes de flèches indiquent les particules de Wicked:Gfp formées au cours de la mitose. La division de la cellule souche germinale a été suivie par vidéomicroscopie *ex vivo*. Le temps est indiqué en bas de chaque image. b. Le canal de visualisation de Wicked:Gfp est montré seul.

d'après Fichelson et al., 2009

3.1.2.2. Les cellules souches chez la drosophile : des besoins quantitatifs ou qualitatifs de biogenèse des ribosomes ?

Chez la drosophile, l'équipe de JR.Huynh a mis en évidence le rôle de Wicked dans le maintien des cellules souches germinales et neurales (Fichelson et al., 2009). En effet, la délétion de *Wicked* affecte le maintien de ces cellules souches en induisant leur différenciation prématurée. Par ailleurs, Wicked est intégrée dans le complexe ribonucléoprotéique U3 sno-RNP, et sa délétion dans des cellules en culture induit des défauts de maturation de la petite sous-unité ribosomique. De façon très intéressante, une fraction de la protéine Wicked présente dans la cellule s'agrège sous forme de particules. Par des approches de vidéomicroscopie *ex vivo*, les auteurs ont montré que ces particules sont héritées principalement par la cellule fille destinée à rester cellule souche au sein du lignage germinal chez la femelle ou du lignage neural (Figure 61). En notant que la cellule souche est amenée à proliférer sur du long terme, il est proposé que la régulation de la croissance cellulaire par la biogenèse des ribosomes soit un paramètre important pour le maintien et la fonction des cellules souches (Figure 62). En soutien de ce modèle, on peut noter que Brat et Mei-P26 régulent la taille de la cellule et des nucléoles en inhibant la biogenèse des ribosomes (Betschinger et al., 2006; Neumüller et al., 2008). Dans les lignages germinal femelle et neural respectivement, les protéines Mei-P26 et Brat sont ségrégées dans les cellules filles amenées à se différencier, assurant la diminution de la croissance des cellules au cours de leur différenciation. La délétion de *Mei-P26* ou *Brat* induit une augmentation aberrante de la biogenèse des ribosomes dans les cellules différenciées qui se traduit par la formation de tumeurs. A l'inverse, la diminution de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches, suite à la délétion de *Wicked*, induit la différenciation et la perte de ces cellules. Ainsi, la biogenèse des ribosomes en elle-même pourrait permettre la régulation de la croissance différentielle des cellules souches et des cellules différenciées, et ainsi assurer le maintien des cellules souches.

Le modèle proposé est basé sur des besoins quantitatifs de biogenèse des ribosomes plus importants dans les cellules souches. En effet, chez la drosophile, les cellules souches se divisent fréquemment et ont une taille plus importante que les cellules différenciées. Le maintien de la taille cellulaire pourrait être critique pour les cellules souches, et afin que ces cellules soient maintenues sur du long-terme, il est probable que la biogenèse des ribosomes y soit plus active que dans d'autres cellules en différenciation. Néanmoins, les particules de Wicked ségrégées dans la cellule fille qui reste cellule souche ne représentent qu'une fraction minoritaire de l'ensemble des protéines Wicked présentes dans la cellule. Il est alors peu probable que l'augmentation totale minime de Wicked assure une biogenèse des ribosomes accrue dans la cellule souche. Alternativement, la nature des particules de Wicked ségrégées pourrait être qualitativement différente des autres protéines Wicked. Ces particules pourraient être associées avec des RP ou des voies de biogenèse des ribosomes particulièrement exprimées dans les cellules souches. Cette hypothèse propose ainsi que la biogenèse des ribosomes pourrait être qualitativement différente dans les cellules souches et les cellules différenciées.

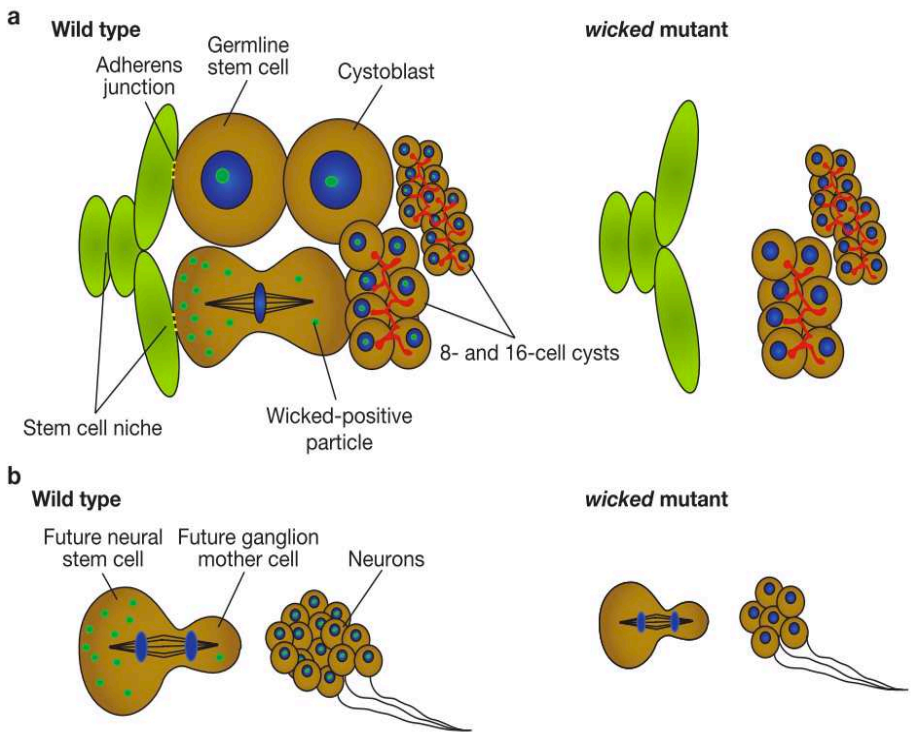


Figure 62. Modèle de ségrégation de Wicked au cours des divisions des cellules souches germinales et neurales

a. La cellule souche germinale est au contact direct de la niche (en vert). Après la mitose, une des deux cellules n'est plus en contact avec la niche et se différencie en cystoblaste, qui se divise 4 fois pour former un cyste de 16 cellules. Les particules de Wicked sont ségrégées préférentiellement dans la future cellule souche (à gauche). Les cellules souches germinales déficientes pour *Wicked* se différencient prématurément, probablement dû à un défaut de croissance (à droite). En rouge : le fusome, organelle membranaire qui connecte les cellules d'un même cyste. **b**. Le neuroblaste se divise pour former un autre neuroblaste et une cellule mère ganglionnaire, qui se différencie et se divise pour former 2 neurones. Les particules de Wicked sont ségrégées dans le futur neuroblaste. Les neuroblastes déficients pour *Wicked* sont plus petits et produisent moins de neurones que dans le cas contrôle.

d'après Neumüller et Knoblich, 2010

Le crible par ARN interférence réalisé par l'équipe de J.Knoblich apporte des informations sur les gènes importants pour le maintien des cellules souches neurales de la drosophile (Neumüller et al., 2011). La biogenèse des ribosomes, parmi d'autres voies de signalisation, apparaît comme essentielle pour l'auto-renouvellement de ces cellules souches. La délétion dans le neuroblaste de certaines protéines régulant la biogenèse des ribosomes et de certaines protéines ribosomiques entraîne un phénotype de diminution du nombre et de la taille des neuroblastes. En particulier, la délétion de certaines RP paralogues, parmi lesquels RPL10Aa, RPS10a et RPS5b, induit des défauts de croissance du neuroblaste. Ces résultats suggèrent qu'après les phénomènes de duplication du génome, certaines protéines ribosomiques ont gardé un rôle indispensable pour toutes les cellules, et d'autres ont pu acquérir une spécificité d'action au sein des cellules souches.

3.1.2.3. Des expressions spécifiques des acteurs de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches ?

Certaines protéines ribosomiques ou certains acteurs de la biogenèse des ribosomes sont exprimés plus fortement dans les cellules souches, dans plusieurs systèmes et chez plusieurs espèces. Ainsi, chez la drosophile, les gènes codant pour plusieurs acteurs impliqués dans la transcription et la traduction sont fortement exprimés dans les cellules souches germinales de l'ovaire (Kai et al., 2005). En particulier, les gènes *Rps5b*, *Rps10a*, *Rps19b* et *Rpl22-like* sont préférentiellement exprimés dans les cellules souches germinales. Par ailleurs, chez la souris et le rat, *Rpl22* est particulièrement exprimé dans les cellules souches spermatogoniales (Hamra et al., 2004). Enfin, chez le zebrafish et le medaka, des gènes nucléolaires et/ou impliqués dans la biogenèse des ribosomes ont été trouvés enrichis dans les cellules souches neurales au cours du développement (JS.Joly, communication personnelle).

Il faut noter que les études présentées ici ont analysé les niveaux d'expression des ARNm de ces RP. Il sera nécessaire de vérifier si cette spécificité d'expression des ARNm se traduit effectivement au niveau protéique. Par ailleurs, il est important d'envisager l'éventualité de fonctions extra-ribosomiques pour les protéines paralogues, certaines pourraient avoir des rôles spécifiques dans les cellules souches de certains tissus. Ce point est techniquement difficile à aborder, l'analyse de la localisation subcellulaire et de l'incorporation des protéines étudiées au sein des ribosomes peut néanmoins déjà apporter des informations.

L'ensemble des données présentées ici convergent vers une expression préférentielle dans plusieurs types de cellules souches de certaines RP et de certains facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes. Ainsi, il pourrait être intéressant de proposer l'existence d'une voie spécifique de biogenèse des ribosomes, ou de la formation de ribosomes spécifiques dans les cellules souches. Appréhender ces spécificités est un nouveau défi, qui invitera bien sûr à s'interroger sur la façon dont une voie de biogenèse des ribosomes particulière peut participer à la définition et au maintien des propriétés des cellules souches.

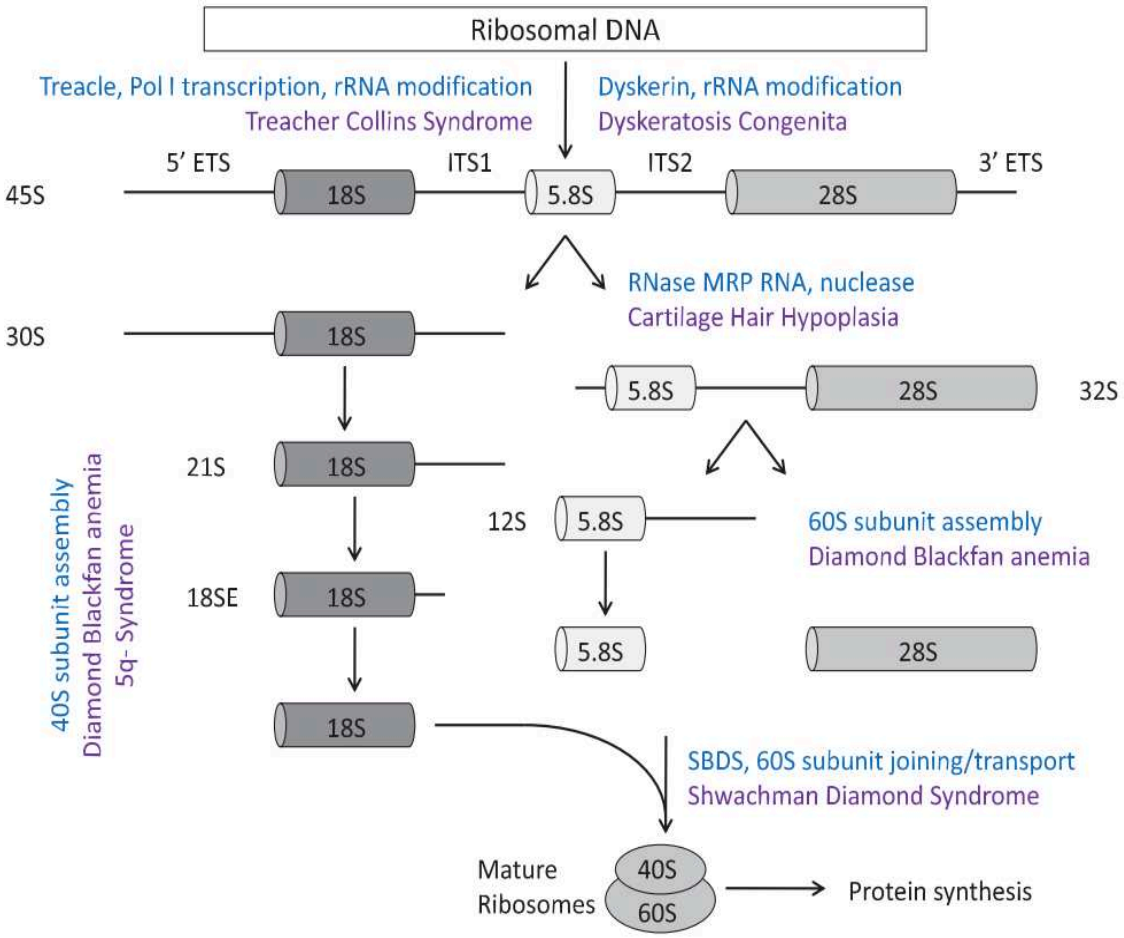


Figure 63. Défauts de biogenèse des ribosomes dans les ribosomopathies

Représentation schématique de la biogenèse des ribosomes chez les mammifères. Les mutations connues et les étapes affectées dans les différentes ribosomapthies y sont notées.

d'après Narla and Ebert, 2010

3.2. En situation pathologique

3.2.1. Les ribosomopathies : des syndromes liés à des défauts de biogenèse des ribosomes

3.2.1.1. Les ribosomopathies, de l'hétérogénéité génétique à l'hétérogénéité clinique

On regroupe sous le terme de ribosomopathies l'ensemble des syndromes dans lesquels des anomalies génétiques induisent des défauts de la biogenèse et de la fonction des ribosomes, provoquant des phénotypes spécifiques sur le plan clinique. Ces maladies rares font l'objet d'études et de revues récentes (Figure 63 ; Tableau 4) (voir par exemple (Narla and Ebert, 2010)). C'est en 1999 que pour la première fois et de façon surprenante, des mutations dans le gène codant pour la protéine ribosomique RPS19 ont été identifiées chez des patients atteints d'anémie de Diamond-Blackfan (Draptchinskaia et al., 1999). L'anémie de Diamond-Blackfan est une maladie congénitale rare caractérisée par une anémie sévère, et éventuellement d'autres défauts hématopoïétiques ; des malformations et des retards de croissance sont également observés (pour revue, voir (Ball, 2011)). Aujourd'hui, des mutations à l'état hétérozygote dans une dizaine de protéines ribosomiques sont associées à cette anémie. Il est frappant de constater que d'autres syndromes liés à des défauts de biogenèse des ribosomes sont également associés à des anomalies de développement, et à des défauts du tissu hématopoïétique, et en particulier du lignage érythroïde : le syndrome de Schwachman-Diamond, pour lequel dans 90% des cas, des mutations sont trouvées dans le gène codant pour la protéine SDBS, impliquée dans la maturation et le transport de la grande sous-unité ribosomique ; la dyskératose congénitale, pour laquelle les mutations causatives sont associées à des fonctions du complexe télomérase (*cf.* Partie 1 : II.4.1.2.3), la mutation de la dyskérine dans la forme liée à l'X de la dyskératose induit en plus des défauts de maturation de l'ARNr ; l'hypoplasie cartilage-cheveux, dont la mutation causative a été identifiée dans le gène *RMRP*, codant pour l'ARN composant d'un complexe ribonucléoprotéique impliqué dans diverses étapes de la synthèse de l'ARNr (Tableau 4). Par ailleurs, le syndrome 5q- est un syndrome myélodysplasique acquis caractérisé également par une anémie macrocytaire présentant des similarités avec l'anémie de Diamond-Blackfan. Chez les patients atteints de ce syndrome, la délétion somatique du bras court du chromosome 5 est observée. Il est proposé que l'haploinsuffisance de *RPS14*, située dans cette région, soit impliqué dans le phénotype érythrocytaire (Ebert et al., 2008). Enfin, le tissu hématopoïétique n'est pas nécessairement affecté dans ces maladies : par exemple, le syndrome de Treacher-Collins est associé à des anomalies de développement cranio-facial et à des mutations dans le gène *TCOF1*, induisant des défauts de transcription de l'ADNr et de méthylation de l'ARNr.

3.2.1.2. Pourquoi une telle spécificité du lignage hématopoïétique et particulièrement érythroïde dans les ribosomopathies ?

Il est connu que certaines protéines ribosomiques ont des fonctions en dehors de leur rôle dans la biogenèse des ribosomes et la traduction (Warner and McIntosh, 2009). Il est alors justifié de se

Disease	Gene Defect	Clinical Features	Cancer Risk
Diamond Blackfan anemia	RPS19, RPS24, RPS17, RPL35A, RPL5, RPL11, RPS7, RPL36, RPS15, RPS27A	Macrocytic anemia Short stature Craniofacial defects Thumb abnormalities	?osteosarcoma ?MDS
5q-syndrome	RPS14	Macrocytic anemia Hypolobulated micromegakaryocytes	10% progression to AML
Shwachman-Diamond syndrome	SBDS	Neutropenia/infections Pancreatic insufficiency Short stature	MDS and AML
X-linked dyskeratosis congenita	DKC1	Cytopenias Skin hyperpigmentation Nail dystrophy Oral leukoplakia	AML Head+neck tumors
Cartilage hair hypoplasia	RMRP	Hypoplastic anemia Short limbed dwarfism Hypoplastic hair	Non-Hodgkin lymphoma Basal cell carcinoma
Treacher Collins syndrome	TCOF1	Craniofacial abnormalities	None reported

Tableau 4. Ribosomopathies : détails des gènes mutés, des caractéristiques cliniques et des risques de cancer

d'après Narla and Ebert, 2010

demander si les défauts de biogenèse des ribosomes expliquent les phénotypes observés dans les ribosomopathies, ou si d'autres fonctions cellulaires sont responsables de ces effets. L'anémie, ou certaines anomalies développementales sont retrouvées dans plusieurs types de ribosomopathies, et sont associées à des mutations dans différents gènes impliqués dans la biogenèse ou la fonction des ribosomes. A moins d'imaginer que l'ensemble de ces gènes partagent une même fonction extra-ribosomique, cela suggère que les défauts de biogenèse des ribosomes en eux-mêmes sont responsables de ces phénotypes. Comment des altérations dans la biogenèse des ribosomes, processus nécessaire à chaque cellule, peuvent-elles induire des phénotypes spécifiquement dans certains types cellulaires ? Pourquoi les cellules hématopoïétiques, et particulièrement les cellules du lignage érythroïde sont particulièrement affectées ? Quelques pistes d'explications peuvent être envisagées.

Il est raisonnable de penser que les cellules à fort taux de prolifération pourraient être particulièrement sensibles à une haploinsuffisance de protéines ribosomiques et donc à une diminution de la production des ribosomes. Ainsi, les progéniteurs hématopoïétiques, et particulièrement les progéniteurs érythroïdes, ont des taux de division très élevés, et doivent générer de grandes quantités d'hémoglobine. Ces cellules ont donc des besoins importants en synthèse protéique et en biogenèse des ribosomes, elles pourraient être particulièrement sensibles à des défauts de synthèse des ribosomes. Néanmoins, d'autres cellules à fort taux de prolifération, par exemple les cellules de la crypte intestinale n'ont pas été décrites comme étant particulièrement affectées chez les patients atteints de ribosomopathies, suggérant que la prolifération n'explique pas à elle seule la sensibilité des cellules érythroïdes.

Par ailleurs, les cellules érythroïdes doivent équilibrer la production d'hème et la traduction des globines de façon précise : un excès d'hèmes dans la cellule érythroïde est toxique et provoque l'apoptose (Quigley et al., 2004). De façon étonnante, une accumulation de l'hème et l'haploinsuffisance d'une RP peuvent induire des phénotypes similaires. En effet, la délétion conditionnelle dans le système hématopoïétique chez la souris de *Flvcr*, un transporteur de l'hème, induit une accumulation de l'hème et une anémie macrocytique sévère (Keel et al., 2008). A ce jour, aucune mutation dans ce récepteur n'a été identifiée dans un cas de ribosomopathie. Néanmoins, il pourrait être intéressant d'examiner si une accumulation d'hème est présente dans les progéniteurs érythroïdes des patients. Des études futures aideront à comprendre s'il existe des liens entre le métabolisme de l'hème et la biogenèse des ribosomes.

Certains défauts de biogenèse ou de composition des ribosomes pourraient également altérer spécifiquement la traduction d'ARNm requis particulièrement pour les cellules du lignage érythroïde. Par exemple, l'haploinsuffisance de RPS19 ou RPL11, deux gènes dont des mutations sont associées à l'anémie de Diamond-Blackfan, affecte la prolifération et la différenciation d'érythroblastes de souris déficients pour *p53* en culture (Horos et al., 2012). En analysant les ARNm recrutés sur les polysomes, il a été montré que la réduction de l'expression de *Rps19* ou de *Rpl11* affectent la traduction de certains ARNm dépendante de séquences IRES, parmi lesquels les gènes *Bag1* et *Csde1* sont

particulièrement importants pour la prolifération et la différenciation au sein du lignage érythroïde. De façon intéressante, les niveaux d'expression de BAG1 et CSDE1 sont diminués dans les érythroblastes de patients atteints d'anémie de Diamond-Blackfan *in vivo*, suggérant que des changements qualitatifs de la traduction pourraient expliquer une partie du phénotype de ce syndrome, de façon indépendante de p53. En soutien de ce résultat, nous avons vu que la traduction initiée par les IRES était affectée dans des cellules de souris *Dkc1*^{m} ou dans des cellules de patients atteints de dyskératose congénitale liée à l'X. En particulier, les facteurs anti-apoptotiques *Bcl-xL* et *XIAP* dépendent d'une traduction initiée par des IRES ; leurs traductions sont fortement altérées dans ces cellules (Yoon et al., 2006; Bellodi et al., 2010; Montanaro et al., 2010).

L'activation de p53 par un stress ribosomique pourrait être une composante importante de la pathogénicité des ribosomopathies. En effet, une accumulation nucléaire de p53 est observée *in vivo* sur des biopsies de patients atteints d'anémie de Diamond-Blackfan et du syndrome 5q- (Dutt et al., 2011; Pellagatti et al., 2010). *Ex vivo*, la délétion de *RPS14* ou *RPS19* dans des cellules hématopoïétiques humaines en culture induit une accumulation de p53, un arrêt du cycle et une apoptose accrue, reflétant probablement l'activation de la voie de stress ribosomique. Il est intéressant de noter que ces défauts apparaissent spécifiquement dans le lignage érythroïde, et pas dans les cellules myéloïdes ou dans les mégacaryocytes, indiquant que ce lignage est particulièrement sensible à la réduction des niveaux d'expression de certaines protéines ribosomiques (Dutt et al., 2011). La question du rôle de p53 dans le phénotype érythropoïétique a été posée dans différents modèles animaux. Chez le zebrafish, l'inhibition de *Rps19* par morpholino induit des défauts de développement, de prolifération et de différenciation au sein du lignage érythroïde, ainsi qu'une activation de la voie p53 dans l'embryon et dans les progéniteurs érythroïdes (Danilova et al., 2008). Une mutation dans le gène *Rps19* ou *Rps20* chez la souris induit des défauts de pigmentation, le lignage érythroïde est légèrement affecté et une augmentation de l'apoptose est observée dans les progéniteurs hématopoïétiques (McGowan et al., 2008). Enfin, un modèle murin du syndrome 5q- est caractérisé par une anémie macrocytaire et une diminution du nombre de progéniteurs hématopoïétiques, accompagnée par une activation de p53 et un fort niveau d'apoptose des cellules hématopoïétiques (Barlow et al., 2010). A la fois chez la souris et chez le zebrafish, la délétion ou l'haploinsuffisance de p53 atténue ou supprime certains des phénotypes développementaux observés (Danilova et al., 2008; McGowan et al., 2008; Barlow et al., 2010). Ces résultats suggèrent que la voie p53 est une réponse commune à des défauts de protéines ribosomiques et pourrait être impliquée dans les phénotypes de certaines ribosomopathies. Il faut cependant noter que ces études sont basées sur des modèles animaux qui ne récapitulent pas exactement la pathologie humaine, les phénotypes du lignage érythroïde ne reflètent par exemple pas toujours les phénotypes des patients. Ainsi, il semble que des mécanismes dépendants de p53 et d'autres indépendants de p53 participent aux phénotypes observés suite à des défauts de biogenèse des ribosomes (voir aussi (Jones et al., 2008; Provost et al., 2012; Torihara et al., 2011)).

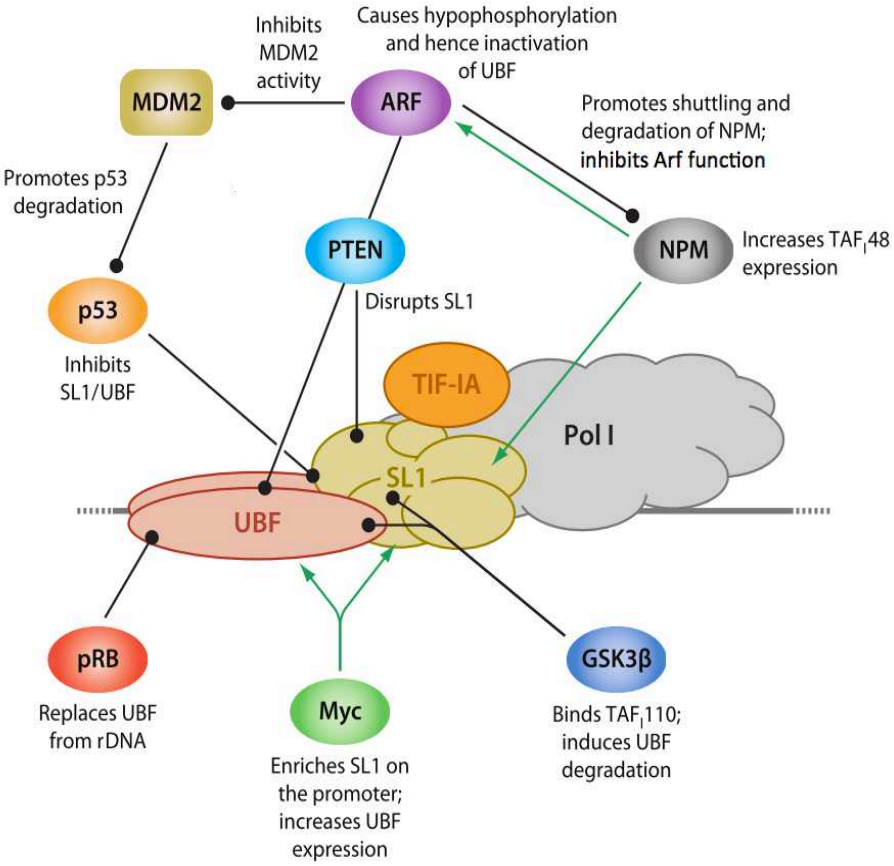


Figure 64. Contrôle de la transcription par l'ARN Polymérase I par des oncogènes et des suppresseurs de tumeur

Des oncogènes activent la synthèse de l'ARNr en augmentant le niveau de transcription de facteurs associés à l'ARN polymérase I, et/ou en modifiant des interactions protéines-protéines ou protéines-ADN (flèches vertes). Les suppresseurs de tumeurs inhibent la synthèse de l'ARNr en interagissant de diverses façons avec l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription (flèches noires).

d'après Drygin et al., 2010

3.2.2. Des relations complexes entre les ribosomes et les cancers

Des modifications de la biogenèse des ribosomes ou de l'expression des protéines ribosomiques sont observées dans certains cancers. Ces données suggèrent qu'un lien pourrait exister entre biogenèse des ribosomes et cancer. Est-ce que les ribosomes ou la biogenèse des ribosomes participent à la formation et/ou au maintien des cellules cancéreuses ? Quels sont les mécanismes moléculaires qui pourraient expliquer un lien entre les ribosomes et le cancer ?

3.2.2.1. Un niveau élevé de ribosomes et de biogenèse des ribosomes associé à la tumorigenèse et au maintien des cellules cancéreuses

Des oncogènes et suppresseurs de tumeurs ont été identifiés comme des régulateurs de la biogenèse des ribosomes (pour revue, voir (Drygin et al., 2010)). Nous en avons évoqué quelques-uns précédemment (c-Myc, Arf, mTOR, *cf.* Partie 2 : 1). La Figure 64 décrit le rôle de quelques oncogènes et suppresseurs de tumeurs dans la régulation de l'ARN polymérase I. Des oncogènes activent la synthèse de l'ARNr, alors que des suppresseurs de tumeurs ont plutôt un rôle d'inhibition de la biogenèse des ribosomes, suggérant un lien entre un niveau élevé de biogenèse des ribosomes et les transformations malignes.

L'analyse de diverses tumeurs ou de lignées de cellules cancéreuses humaines a révélé une augmentation fréquente du niveau d'expression des protéines ribosomiques et de la synthèse protéique dans ces cellules (Tableau 5) (Van Riggelen et al., 2010; Derenzini et al., 1998).

Par ailleurs, dans un modèle cellulaire de progression tumorale, les cellules cancéreuses contiennent plus de nucléoles, dont la taille et le nombre de centres fibrillaires sont plus importants que dans des cellules contrôles (Belin et al., 2009). Des modifications quantitatives et qualitatives des nucléoles sont également révétées par des marquages du nucléole de type AgNor -pour Argyrophilia Nucleolar Organiser Regions-. Ces marquages à l'argent ont permis de mettre en évidence des corrélations entre les caractéristiques du nucléole et le stade, l'agressivité et le pronostic de certains cancers ; ils sont parfois utilisés comme outils diagnostiques (pour revue, voir (Pich et al., 2000)).

L'ensemble de ces observations suggèrent que la biogenèse des ribosomes est augmentée dans les cellules cancéreuses, reflétant probablement les besoins métaboliques accrus de ces cellules.

3.2.2.2. Un lien causal entre l'augmentation de la biogenèse des ribosomes et le développement de cancers ?

Plusieurs traitements anti-cancer utilisés aujourd'hui exercent un effet thérapeutique par l'inhibition de la synthèse de l'ARNr (pour revue, voir (Drygin et al., 2010)). Ces données soulignent que la biogenèse des ribosomes pourrait être particulièrement critique pour le maintien des cellules cancéreuses. Afin de mieux comprendre le rôle de la biogenèse des ribosomes dans l'établissement et le maintien d'un cancer, il est important de se demander si cette augmentation de synthèse ribosomique est une cause ou une conséquence de la tumorigenèse. Afin d'aborder cette question, des

Type of cancer	Ribosomal proteins
Oesophageal	RPL15
Gastrointestinal	RPL13
Hepatocellular	RPL13, RPL36a, RPS8, RPL12, RPL23a, RPL27 and RPL30
Colorectal	RPS3, RPS6, RPS8, RPS12, RPL5, RPL22, RPL26 and RPL35
Prostate	RPL37 and RPL7a
Cervical	RPS12

Tableau 5. Augmentation de l'expression des RP dans des cancers humains

d'après Van Riggelen et al., 2010

approches fonctionnelles ont été utilisées chez la souris. La suractivation de l'ARN polymérase III, suivie d'une augmentation du niveau d'expression des ARNt et de l'ARNr 5S, a des conséquences associées à la transformation oncogénique dans des cellules de mammifères (Marshall et al., 2008). La surexpression de la protéine ribosomique RPS3a participe également à l'induction de la tumorigenèse dans des cellules murines, par son rôle de protéine ribosomique ou par son implication dans la régulation de l'apoptose, de façon extra-ribosomique (Naora et al., 1998). Par ailleurs, la souris *Eμ-Myc/+*, surexprimant l'oncogène *Myc* dans les cellules B, est utilisée comme modèle de lymphogenèse (Harris et al., 1988). Nous avons vu que Myc régulait la biogenèse des ribosomes à plusieurs niveaux, cependant, cet oncogène agit sur de multiples voies de signalisations cellulaires. L'équipe de D.Ruggero a apporté un lien direct entre la biogenèse des ribosomes et la tumorigenèse induite par Myc. En effet, cette équipe a montré que l'haploinsuffisance des protéines ribosomiques RPL38 ou RPL24 protégeait la souris des lymphomes induits par *Myc*, mais n'a pas d'effet sur la tumorigenèse induite par la délétion de *p53* (Barna et al., 2008). Ces résultats montrent que le potentiel tumorigénique de Myc est en partie lié à sa capacité de stimuler la synthèse protéique. Ainsi, des modifications quantitatives de la machinerie ribosomique pourraient participer à l'induction de cancers.

3.2.2.3. Une haploinsuffisance de facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes est aussi associée à des cancers

Chez le nématode, Voutev et al. ont analysé des lignées caractérisées par des mutations somatiques affectant de façon non autonome cellulaire la prolifération de la lignée germinale et pouvant induire le développement de tumeurs germinales (Voutev et al., 2006). Le clonage positionnel a permis d'identifier des mutations dans les gènes *pro-1*, *pro-2* et *pro-3*, dont les orthologues chez la levure interviennent dans la biogenèse des ribosomes. Afin de caractériser de façon plus générale le rôle de la biogenèse des ribosomes dans l'induction de tumeurs, la délétion de plusieurs gènes dont les orthologues chez la levure sont impliqués dans la biogenèse des ribosomes a été réalisée par ARN interférence. Les phénotypes induits sont similaires à ceux observés suite à la délétion des gènes *pro*. Cette étude met donc en évidence le rôle clé de la biogenèse des ribosomes dans le contrôle de la prolifération d'un tissu adjacent, et suggère que des défauts de biogenèse des ribosomes pourraient participer à la tumorigenèse de façon non autonome cellulaire.

Des mutations perte de fonction de protéines ribosomiques à l'état hétérozygote ont été analysées chez le zebrafish (Amsterdam et al., 2004). De façon attendue, ces mutations induisent une diminution relative de l'expression de la sous-unité ribosomique à laquelle appartient la protéine mutée. De façon plus inattendue, l'haploinsuffisance de certaines protéines ribosomiques, mais pas de toutes, est associée avec le développement de tumeurs de plusieurs origines, suggérant un rôle suppresseur de tumeur pour ces protéines. Plus précisément, parmi les 28 lignées mutantes pour une protéine ribosomique, 17 présentent une sensibilité à la tumorigenèse (Lai et al., 2009). L'hypothèse

que ces protéines exercent leur rôle suppresseur de tumeur par des fonctions extra-ribosomiques peut être envisagée. Toutefois, étant donné le nombre de protéines ribosomiques concernées, il semble plus probable d'imaginer une fonction suppresseur de tumeur associée au ribosome.

Enfin, chez l'homme, les patients atteints de ribosomopathies, chez qui des défauts de biogenèse des ribosomes sont observés, présentent un risque accru de cancers principalement hématopoïétiques (Tableau 4) (Narla and Ebert, 2010).

3.2.2.4. Des pistes d'explication : des défauts d'activation de p53

Certaines RP et certains facteurs associés à la biogenèse des ribosomes sont requis pour l'activation de p53. Dans un contexte de stress ribosomique, l'haploinsuffisance des RP impliquées dans la voie de réponse au stress ribosomique module l'activation de p53 et son action suppresseur de tumeur. Ainsi, alors que des défauts de biogenèse des ribosomes ou la délétion de certaines RP induisent l'activation de p53, ce dernier n'est pas stabilisé suite à la délétion de *Rpl5* ou de *Rpl11* (Fumagalli et al., 2012). Les mutations de *Rpl5* ou *Rpl11* observées chez certains patients atteints d'anémie de Diamond-Blackfan pourraient se manifester par une absence d'activation de p53 suite à des défauts de biogenèse des ribosomes, expliquant en partie la sensibilité accrue de ces patients à la tumorigenèse. Par ailleurs, des défauts de biogenèse des ribosomes peuvent affecter l'activation de p53 suite à des dommages à l'ADN. Ainsi, dans des cellules humaines, RPL26 est capable de se lier à la région 5'UTR de l'ARNm de *p53* (Takagi et al., 2005). Suite à des dommages à l'ADN, RPL26 induit ainsi la traduction de *p53* en favorisant son association avec les polysomes. Chez le zebrafish, la sensibilité à la tumorigenèse des lignées avec une mutation hétérozygote pour une RP est associée avec une réduction de l'activation de p53 suite à une irradiation ou à l'inhibition du protéasome (MacInnes et al., 2008). La distribution et la pénétrance des tumeurs dans ces lignées sont de plus similaires à celles observées dans des zebrafish déficients pour *p53*. Il a été proposé que l'haploinsuffisance de ces RP affecte spécifiquement la traduction de *p53*. L'ensemble de ces résultats suggère que des mécanismes généraux pourraient lier le dosage des protéines ribosomiques, la régulation de *p53* et la tumorigénicité. Ce résultat est renforcé par des études moléculaires sur les souris $Dkc1^{m}$ déficientes pour la dyskérine, modèle de la dyskératose congénitale liée à l'X. Dans un contexte de transformation maligne *ex vivo* ou suite à des dommages à l'ADN *in vivo*, les cellules $Dkc1^{m}$ présentent des défauts de la traduction des suppresseurs de tumeur p53 et p27 (Bellodi et al., 2010). D'une façon plus générale, la diminution de l'activation de p53 et de la traduction liée aux séquences IRES est associée avec une plus forte agressivité tumorale dans un modèle cellulaire de cancer du sein (Belin et al., 2009). De façon intéressante, dans ce modèle, la tumorigénicité a été associée avec des modifications de certaines étapes de la maturation de l'ARNr. Ces résultats amènent à se demander si différents ribosomes ou si des ribosomes avec différentes capacités de traduction sont formés au cours de cette biogenèse des ribosomes spécialisée.

Enfin, une sélection indirecte des cellules déficientes pour *p53* peut également participer à la tumorigenèse induite par des défauts de biogenèse des ribosomes. En effet, si parmi les cellules soumises à des défauts de biogenèse des ribosomes, les cellules déficientes pour *p53* ou pour un gène associé à l'apoptose induite par p53 n'activent pas ou activent moins efficacement des voies de réponse au stress ribosomique, elles pourraient alors avoir un avantage sélectif. Une telle sélection peut être une étape importante lors de l'initiation tumorale, expliquant ainsi que des défauts de biogenèse des ribosomes augmentent le risque de cancer.

4. Conclusion

Les ribosomes ont longtemps été considérés comme des entités constitutives et homogènes de la cellule. Aujourd'hui, de nombreuses études indiquent que les ribosomes pourraient avoir un rôle régulateur, au niveau de la cellule ou à l'échelle d'un organisme pluricellulaire. Plusieurs sources d'hétérogénéité théoriques pour les ribosomes ont été proposées, néanmoins, des données précises sur l'existence réelle de ribosomes hétérogènes, et sur le fonctionnement moléculaire de la régulation assurée par les ribosomes manquent encore. La reconnaissance spécifique de certains ARNm, liée à des caractéristiques comme la coiffe, les séquences IRES ou 5'TOP, semble participer à la spécificité fonctionnelle des ribosomes. Les maladies associées à des défauts de biogenèse et/ou de fonction des ribosomes, à savoir les ribosomopathies et certains cancers, sont bien sûr à mettre en parallèle avec une éventuelle hétérogénéité et le rôle régulateur des ribosomes. On cherche à comprendre aujourd'hui si ces dérégulations sont liées à des traductions altérées par des ribosomes affectés, à des changements de leur programme traductionnel, et/ou à une détection en amont des défauts dans la biogenèse des ribosomes, induisant des voies de réponse au stress ribosomique.

Objectifs de la thèse

Au sein du laboratoire, notre équipe cherche à comprendre le rôle du gène *Notchless* (*Nle*) chez la souris, en utilisant des approches de mutagenèse conditionnelle inductible. Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à l'implication de *Nle* dans le maintien du système hématopoïétique. Les CSH sont très rapidement affectées suite à la délétion de *Nle*, j'ai alors été amenée à me poser plusieurs questions. Pour quelle(s) propriété(s) des CSH *Nle* est-il important ? En particulier, la quiescence et la survie des CSH sont-elles affectées suite à la délétion de *Nle* ? Est-ce que toutes les cellules hématopoïétiques sont sensibles à la perte de *Nle*, ou est-ce que des cellules plus différenciées peuvent se passer de *Nle* ? J'envisageais alors des approches de greffes réciproques pour évaluer si *Nle* jouait un rôle intrinsèque au tissu hématopoïétique, ou s'il participait à des interactions entre les CSH et la niche. De façon plus précise, j'ai également voulu savoir si *Nle* était requis de façon autonome cellulaire dans les CSH, et s'il participait à leur maintien à l'homéostasie et/ou en situation de stress.

L'orthologue de *Nle* chez la levure participe à la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique. Ceci m'a amenée en particulier à me demander si la délétion de *Nle* pouvait induire un stress ribosomique dans les CSH, si les CSH pouvaient y être sensibles, et quelles réponses moléculaires et cellulaires elles mettaient en place. D'une façon plus générale, cette étude a soulevé des questions sur le rôle de la biogenèse des ribosomes dans la régulation des CSH.

Au cours de ma thèse, j'ai cherché à aborder expérimentalement ces questions, certaines réponses ont pu être apportées, certains points ne sont pas encore élucidés et seront développés dans la discussion générale.

Résultats

1. Préambule : *Notchless* (*Nle*), de la voie Notch à la biogenèse des ribosomes

1.1. *Nle*, un régulateur de la voie Notch chez la drosophile

Nle a été identifié chez la drosophile, au cours d'un crible génétique recherchant des régulateurs de la voie Notch (Royet et al., 1998). L'allèle *Notchoïd* (nd^1) code pour un allèle muté de Notch, et est responsable de l'aspect dentelé des ailes chez la drosophile suite à une diminution de l'activité de Notch. La perte d'un allèle de *Nle* dans le fond génétique nd^1 supprime l'aspect dentelé des ailes, suggérant qu'une haploinsuffisance de *Nle* augmente l'activité de la voie Notch (Figure 65). De plus, l'introduction d'un allèle muté de *Nle* dans un fond *Abruptex* aggrave le phénotype caractéristique d'une augmentation de l'activité de la voie Notch au niveau des veines de ce mutant. Ces approches génétiques suggèrent que *Nle* régule négativement la voie Notch, c'est au vu de ces résultats que l'équipe de S.Cohen a baptisé ce gène « *Notchless* ». Néanmoins, la surexpression de *Nle* chez la drosophile ou le xénope peut également induire une surexpression de la voie Notch. Selon le contexte, *Nle* pourrait réguler la voie Notch positivement ou négativement. Les auteurs suggèrent que la protéine NLE pourrait se lier à la partie intra-cytoplasmique du récepteur Notch. Cependant, les approches expérimentales de cette étude utilisant la surexpression de protéines de fusion, et l'absence de confirmation d'une telle interaction *in vivo* limitent les interprétations des résultats. Aujourd'hui, les mécanismes moléculaires de cette régulation n'ont pas été élucidés.

1.2. Chez la souris, *Nle* régule la survie des cellules pluripotentes de l'embryon indépendamment de la voie Notch

Chez la souris, le gène *Nle* contient 13 exons et code pour une protéine de 485 acides aminés. Le gène *Nle* est constitué d'un domaine dit « domaine *Nle* » en N-terminal, suivi de huit domaines WD40. La protéine NLE est exprimée au cours du développement et dans tous les organes analysés (Cormier et al., 2006). Le laboratoire a montré que *Nle* était requis pour la survie des cellules de la masse cellulaire interne : les blastocystes déficients pour *Nle* présentent une létalité au moment de l'implantation (Figure 66) (Cormier et al., 2006). Etant données les interactions suggérées avec la voie Notch chez la drosophile, il était alors important de se demander si la létalité des embryons $Nle^{-/-}$ était due à une dérégulation de la voie Notch au cours du développement pré-implantatoire. La capacité à moduler la voie Notch de la protéine murine NLE a été confirmée chez le xénope, bien que ces résultats n'apportent pas une démonstration directe de la régulation de Notch par *Nle* chez la souris (Cormier et al., 2006). Ce résultat était étonnant, étant donné que chez la souris, les mutations de perte de fonction de la voie Notch n'induisaient pas de phénotypes avant l'implantation. L'observation que les ARNm de certains acteurs de la voie Notch étaient exprimés dans l'ovocyte et à différents stades

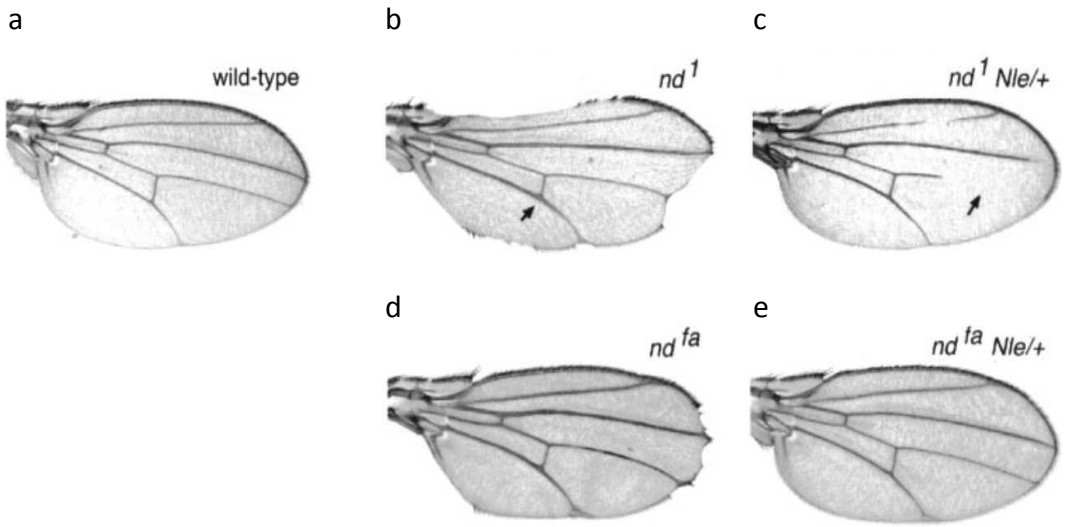


Figure 65. Exemples d'interactions génétiques entre *Notch* et *Notchless* chez la drosophile

a. Aile sauvage de drosophile. **b**. Aile dans un fond *Notchoïd* (nd^1). Le phénotype est caractérisé par des encoches sur les ailes, signe d'une diminution de l'activité de la voie Notch. **c**. La délétion d'un allèle de *Nle* sauve le phénotype d'encoches sur les ailes. **d**. L'allèle nd^{fa} code pour un allèle déficient de Notch, induisant également un phénotype d'aile dentelée. **e**. La délétion d'un allèle de *Nle* sauve ce phénotype, suggérant que l'interaction génétique n'est pas spécifique d'un allèle de Notch.

d'après Royet et al., 1998

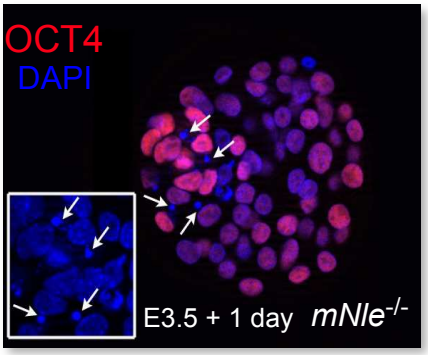


Figure 66. *Nle* est nécessaire pour la survie des cellules de la masse cellulaire interne au cours du développement péri-implantatoire

Immunodétection de Oct4, exprimé plus fortement dans les cellules de la masse cellulaire interne à ce stade, dans un embryon déficient pour *Nle*, prélevé à E3.5 et cultivé *ex vivo* pendant un jour. Le DAPI marque le noyau et révèle la présence de noyaux pycnotiques, signe d'une mort cellulaire.

d'après Cormier et al., 2006

du développement pré-implantatoire a amené l'équipe à revisiter cette question (Cormier et al., 2004). Des mutants de la voie Notch ont alors été réalisés, en déplétant à la fois les stocks maternels et zygotiques de *Rbp-Jκ* chez la souris (Souilhol et al., 2006). Le développement pré-implantatoire de ces mutants est normal, les blastocystes se développent et s'implantent correctement ; les embryons meurent au milieu de la gestation à 10.5 jpc. Ces résultats suggèrent que la voie Notch n'est pas requise pour le développement précoce de l'embryon. Il semble alors peu probable que la mort des embryons *Nle*$^{-/-}$ soit consécutive à une perte d'activité de la voie Notch au cours du développement pré-implantatoire, suggérant que *Nle* n'agit pas comme régulateur positif de la voie Notch au cours du développement précoce. Par ailleurs, l'activation constitutive de la voie Notch, par l'expression de NICD, partie intracellulaire du récepteur Notch, permet un développement normal jusqu'au stade blastocyste (Céline Souilhol, données non publiées). Il est alors également peu probable que le phénotype des embryons déficients pour *Nle* soit dû à une suractivation de la voie Notch : *Nle* n'est probablement pas un régulateur négatif de la voie Notch. Ce dernier résultat a été confirmé par des approches génétiques : l'invalidation de *Nle* dans un fond déficient pour la voie Notch (par la déplétion des stocks zygotiques et maternels de *Rbp-Jκ*) ne modifie pas le phénotype des embryons *Nle*$^{-/-}$ (Céline Souilhol et Sarah Beck-Cormier, données non publiées). Ainsi, ces résultats montrent que le rôle critique de *Nle* au cours du développement pré-implantatoire est indépendant de la voie Notch canonique.

1.3. *Nle*, un acteur essentiel de la biogenèse des ribosomes chez la levure

Le gène *Nle* est conservé chez tous les eucaryotes et présente 51% d'identité entre la souris et la levure. De façon importante, la voie Notch est spécifique aux métazoaires, et n'existe donc pas chez la levure ou chez la plante. Des études sur l'évolution des acteurs de la voie Notch ont révélé que certains facteurs associés à la voie Notch avaient une origine plus ancienne ; il se pourrait qu'ils aient une fonction ancestrale et que leur rôle dans la régulation de la voie Notch soit apparu au cours de l'évolution (Gazave et al., 2009). Ca pourrait être le cas de *Nle*, dont le rôle a été élucidé récemment chez la levure. *RSA4*, l'orthologue de *Nle* chez la levure, a été identifié comme un gène codant pour un acteur unique et indispensable à la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique (de la Cruz et al., 2005). Des levures mutantes pour *RSA4* présentent un blocage des dernières étapes de maturation de l'ARNr, conduisant à l'accumulation de la grande sous-unité dans le noyau, à la diminution des ribosomes fonctionnels dans le cytoplasme et à l'arrêt de la croissance des cellules. Plus récemment, des aspects moléculaires du rôle de Rsa4 ont été élucidés, grâce à des approches de microscopie électronique. Par son domaine N-terminal, Rsa4 interagit avec le domaine MIDAS (pour Metal Ion Dependant Adhesion Site) de l'ATPase Midasine Rea1/Mdn1 au sein de la particule pré-ribosomique 60S (Ulbrich et al., 2009). En particulier, l'acide aspartique situé en position 114 du domaine *Nle* s'est révélé être essentiel pour l'interaction avec Rea1, et de façon conséquente pour la croissance des

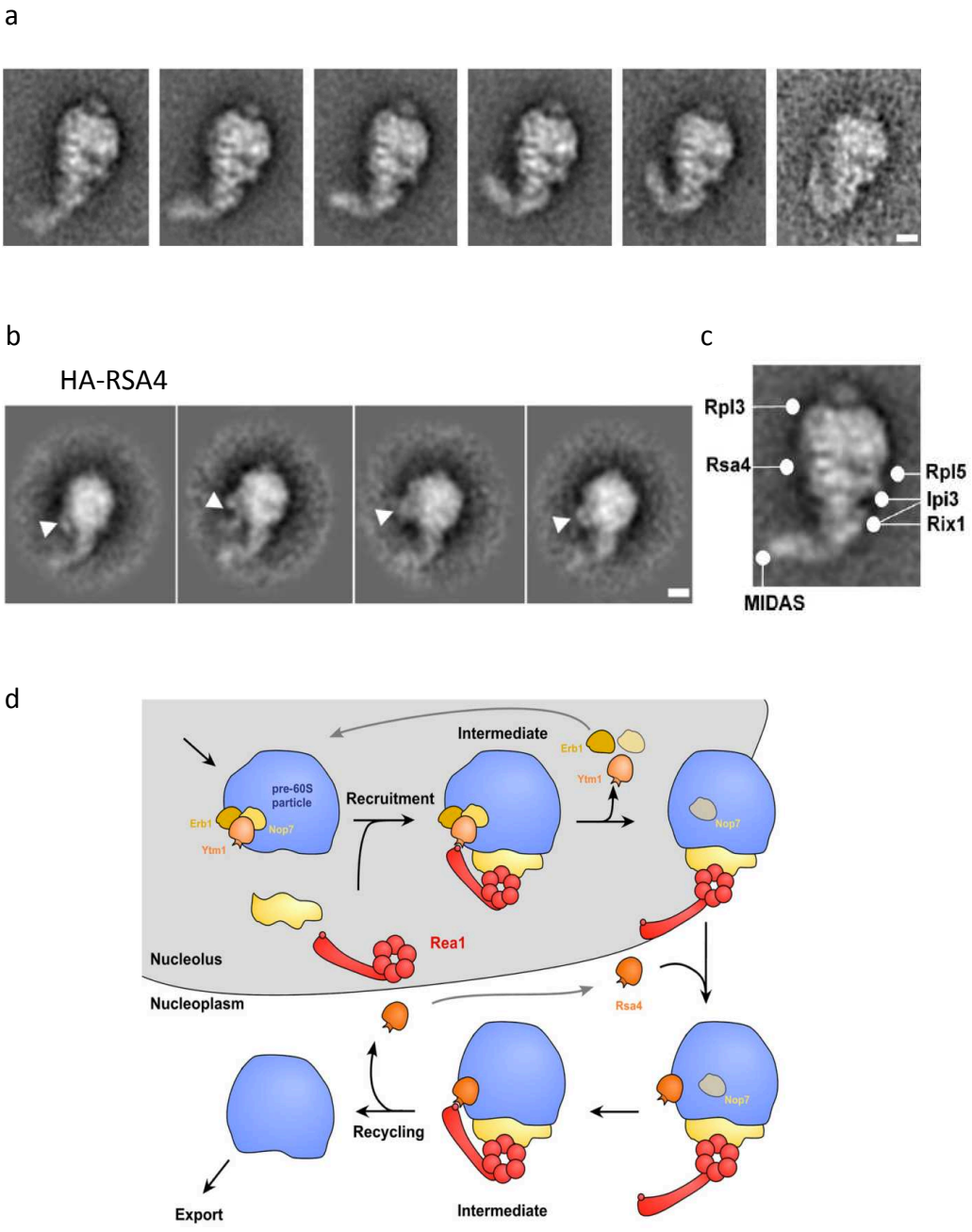


Figure 67. *Nle/Rsa4* interagit avec l'ATPase Rea1 au sein de la particule pré-ribosomique 60S chez la levure

a. Des images en microscopie électronique illustrent le mouvement de la queue de l'ATPase Rea1 au sein de la particule pré-60S. Dans la sixième image, l'extrémité de la queue de Rea1 est au contact du corps de la particule. **b**. La protéine Rsa4 est marquée par une étiquette HA, et repérée par immuno-microscopie électronique au sein des particules (têtes de flèches). **c**. Des approches similaires permettent de localiser plusieurs protéines au sein de la particule. **d**. Modèle du rôle de Rea1 au cours de la maturation et de l'export de la sous-unité pré-60S. Rea1 s'associe avec la particule pré-ribosomique nucléolaire. En interagissant avec Ytm1, Rea1 libère le complexe Ytm1-Erb1-Nop7, et permet l'export de la sous-unité dans le nucléoplasme. Le recrutement de Rsa4 dans le nucléoplasme initie la deuxième réaction dépendante de Rea1, qui aboutit à la libération de Rsa4, du complexe Rix1 (en jaune) et de l'ATPase Rea1.

d'après Ulbrich et al., 2009 ; Kressler et al., 2012

cellules. L'interaction entre Rsa4 et Rea1 génère une tension induisant la dissociation mécanique dépendante de l'ATP des facteurs pré-ribosomiques Rea1, Rsa4 et du complexe Rix1, associé à Rea1 ; cette dissociation est nécessaire pour la maturation ultérieure de la grande sous-unité (Figure 67.a-c).

1.4. *NLE* et *WDR12*, deux acteurs de la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique

Wdr12 code pour une protéine à domaines WD40, avec un domaine en N-terminal similaire au « domaine *Nle* » (Nal et al., 2002). Chez la souris, la protéine WDR12 est incorporée au sein du complexe PeBoW, avec les protéines PES1 et BOP1 ; l'intégrité de ce complexe est nécessaire pour la biogenèse de la grande sous-unité et la prolifération cellulaire (Hölzel et al., 2005; Rohrmoser et al., 2007). De façon intéressante, ce complexe est conservé chez la levure : les protéines Nop7, Erb1 et Ytm1 s'associent au sein de la particule pré-ribosomique 60S et participent à la régulation de la prolifération cellulaire et de la biogenèse des ribosomes (Du and Stillman, 2002). Chez la levure, l'équipe de E.Hurt a montré que Ytm1, l'orthologue de WDR12, interagissait avec l'ATPase Rea1 au sein de la particule pré-ribosomique (Bassler et al., 2010). Ils proposent un modèle selon lequel Rea1 interagit successivement avec Ytm1 puis Rsa4 par leurs motifs conservés au sein du « domaine *Nle* » (Figure 67.d). Selon ce modèle, Rea1 interagit avec le complexe Nop7-Erb1-Ytm1 dans le nucléole, puis avec Rsa4 dans le nucléoplasme, avant l'export de la sous-unité dans le cytoplasme. Ces résultats ne sont cependant pas cohérents avec la première étude publiée chez la levure, suggérant que Rsa4 est nucléolaire, et que sa délétion induit l'accumulation des particules pré-ribosomiques dans le nucléole (de la Cruz et al., 2005). En lien avec ces résultats la protéine NLE a été identifiée au sein des nucléoles dans plusieurs cribles chez la levure et chez l'homme (Bassler et al., 2001; Gavin et al., 2002; Nissan et al., 2002; Scherl et al., 2002). Chez la souris, des approches par immunofluorescence montrent que la protéine NLE est localisée principalement dans les nucléoles (*cf.* Figure 6A de l'article). Les déductions théoriques aboutissant au modèle proposé chez la levure n'ont pas été formellement testées, et sont peut-être trop rapides, ou la localisation de NLE pourrait différer en fonction des espèces. Par ailleurs, la visualisation de la protéine Rsa4 chez la levure a été réalisée par l'expression d'une protéine de fusion. Dans le laboratoire, il a été montré qu'une protéine de fusion NLE-GFP se localise dans le nucléoplasme et est exclue des nucléoles alors qu'une fusion HA-NLE est ciblée dans les nucléoles. Il est probable que la présence de la GFP interfère avec la localisation subcellulaire de la protéine NLE. L'ensemble de ces résultats est donc à interpréter avec précaution.

1.5. Un rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes dans d'autres espèces ? Coup d'œil chez la plante

Chez la plante, *NLE* joue un rôle critique au cours du développement. Chez la pomme de terre sauvage *Solanum Chacoense*, la délétion de *NLE* par des approches d'ARN interférence induit des phénotypes pléïotropes, dont des défauts de fertilisation, de croissance et de développement de la

graine (Chantha et al., 2006; Chantha and Matton, 2007). Un crible double-hybride a suggéré une interaction entre la Midasine MDN1, orthologue de l'ATPase Rea1, et NLE, par le « domaine *Nle* » (Chantha and Matton, 2007). Ces résultats suggèrent que le rôle joué par *Nle*/*RSA4* chez la levure pourrait être conservé chez la plante, et que des défauts de biogenèse des ribosomes pourraient induire des défauts de prolifération et de développement chez la plante. Cette hypothèse est soutenue par des résultats récents montrant que chez *Arabidopsis thaliana*, la délétion de *NLE* ou de *MDN1* induit des phénotypes similaires, à savoir des défauts de la progression de la gamétogenèse femelle (Chantha et al., 2010). Ces résultats sont cohérents avec un rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes chez la plante, cependant, aucune démonstration directe n'a été apporté à ce jour dans des espèces autres que la levure.

1.6. Un rôle de *Nle* dans la tumorigenèse ? des données chez l'homme et le nématode

Comme nous l'avons vu en introduction, des données indiquent que la biogenèse des ribosomes pourrait participer à la régulation de la tumorigenèse. Deux exemples suggèrent que des altérations du niveau d'expression de *Nle* sont associées à des tumeurs. Le projet COSMIC (pour Catalogue of Somatic Mutations In Cancer) développé au Wellcome Trust Sanger Institute s'attèle à répertorier des informations sur les mutations somatiques présentes dans les cancers humains (voir le site http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/). En 2006, un crible à grande échelle a permis d'identifier des mutations de *Nle* dans des tumeurs du sein (Sjöblom et al., 2006). Deux mutations distinctes ont été identifiées, à l'état hétérozygote, pouvant affecter l'épissage. Aujourd'hui, des mutations ont été identifiées dans des échantillons de tumeurs de diverses origines (leucémie, carcinome ovarien, médulloblastome, carcinome rénal, cancer pancréatique et glioblastome). Plus précisément, 6 mutations ont été identifiées sur un total de 284 échantillons analysés. Par ailleurs, chez le nématode, l'interférence ARN dirigée contre *Nle* peut provoquer l'apparition de tumeurs germinales (Voutev et al., 2006). En particulier, le phénotype observé présente des similarités avec les phénotypes obtenus par ARN interférence dirigée contre d'autres protéines orthologues de facteurs impliqués dans la biogenèse des ribosomes chez la levure. Ces résultats suggèrent que le rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes pourrait être conservé également chez le nématode, et que l'inhibition de *Nle* pourrait être impliqué dans des processus de tumorigenèse. Des études plus approfondies seront nécessaires pour évaluer le rôle de *Nle* dans la tumorigenèse, et évaluer dans quelle mesure son rôle dans la biogenèse des ribosomes participe à ce processus.

1.7. Les modèles d'étude de *Nle* disponibles au laboratoire

Au sein du laboratoire, des cellules ES permettant l'invalidation conditionnelle de *Nle* ont été produites par Sarah Beck-Cormier, Sandrine Vandormael-Pournin et Céline Souilhol. Des ciblages successifs ont permis l'obtention de cellules ES $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$ et $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/+}$

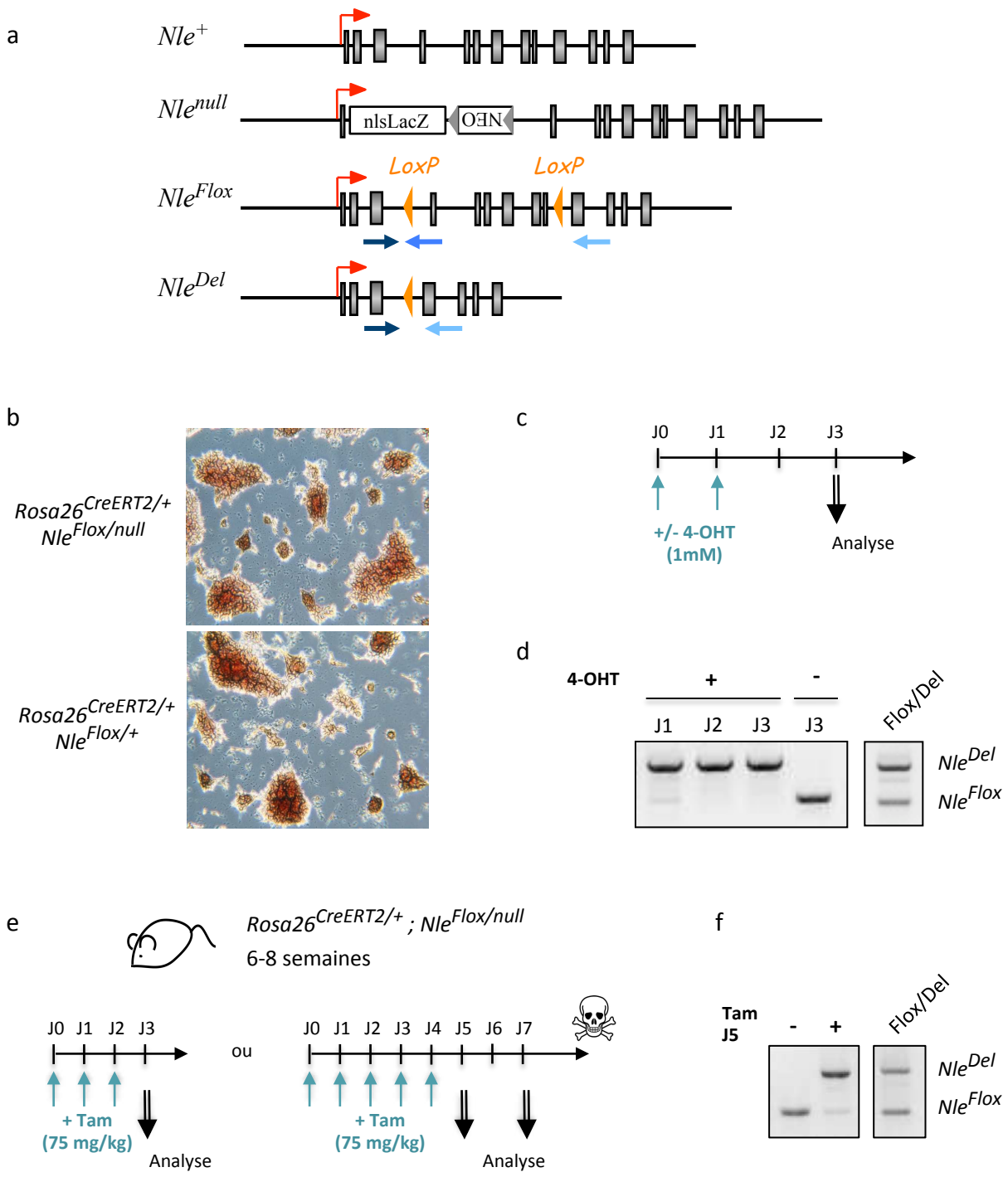


Figure 68. Modèles d'étude de *Nle* utilisés dans le laboratoire

a. Présentation des allèles de *Nle* utilisés pour cette étude. Les positions des amorces pour la PCR détectant les allèles Nle^{Flox} et Nle^{Del} sont présentés en bleu. Cette PCR ne détecte pas les allèles Nle^{+} ou Nle^{null}. **b.** Les cellules ES $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$ ou $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/+}$ sont cultivées sans cellules nourricières. La révélation de l'activité phosphatase alcaline est positive pour les deux lignées. **c**. Protocole d'induction de la Cre utilisé pour les cultures de cellules ES. **d**. Vérification de la délétion de l'allèle Nle^{Flox} dans les cellules ES par PCR. Un ADN hétérozygote $Nle^{Flox/Del}$ est utilisé comme contrôle. **e.** Protocole utilisé pour la délétion de *Nle* dans les souris $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$. Les souris sont injectées au tamoxifène 3 ou 5 jours consécutifs, et sont analysées à J3, J5 ou J7. **f.** Vérification par PCR de la délétion de l'allèle Nle^{Flox} dans la moelle osseuse.

(voir les schémas des différents allèles de *Nle* sur la Figure 68.a). Suite à une induction au 4-Hydroxy-Tamoxifène (4-OHT), la recombinase Cre est activée, relocalisée dans le noyau et permet la délétion de l'allèle Nle^{Flox} en un allèle Nle^{Del} qui est un allèle nul. Ces cellules étaient classiquement cultivées sur des fibroblastes embryonnaires de souris ; au cours de passages successifs, j'ai pu les « habituer » à pousser sans ces cellules nourricières, permettant de limiter les contaminations des extraits de cellules ES par des fibroblastes, et d'avoir une plus grande souplesse dans l'expérimentation. De façon importante, Sandrine Vandormael-Pournin a vérifié l'état indifférencié de ces cellules par la révélation de leur activité phosphatase alcaline (Figure 68.b). De façon classique pour l'étude, les cellules ES sont traitées 2 jours consécutifs au 4-OHT (1µM) et sont analysées à différents points après l'induction (voir le schéma du protocole utilisé au cours de ma thèse, Figure 68.c et la PCR associée, Figure 68.d). Notons qu'une apoptose massive et des défauts de prolifération sont observés à J3 (données du laboratoire).

Des approches d'invalidation conditionnelle de *Nle in vivo* ont également été développées au laboratoire. En utilisant des souris porteuses de l'allèle Nle^{Flox}, de l'allèle Nle^{null} et de différentes lignées exprimant la Cre, il est possible d'induire la délétion de *Nle* de façon conditionnelle dans plusieurs tissus. J'ai utilisé la lignée $Rosa26^{CreERT2/+}$ au cours de ma thèse : la recombinase Cre, placée sous le contrôle du promoteur ubiquitaire *Rosa26*, permet la délétion de *Nle* dans tout l'organisme, suite à des injections au tamoxifène (Hameyer et al., 2007). Nous avons choisi comme animaux expérimentaux des souris portant un allèle Nle^{Flox} et un allèle Nle^{null}, et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la présence d'un seul allèle Nle^{Flox} par cellule permet théoriquement une plus grande homogénéité de délétion entre les cellules. Par ailleurs, le choix du génotype $Nle^{Flox/null}$ facilite le suivi de la délétion qui se fait grâce à une PCR permettant de détecter simultanément les deux allèles Nle^{Flox} et Nle^{Del} (*cf.* Figure S3 de l'article) : l'absence d'allèle Nle^{Del} avant induction de la Cre permet une quantification plus aisée de l'efficacité de conversion de l'allèle Nle^{Flox} en allèle Nle^{Del}. De plus, la persistance d'un allèle Nle^{Del} me permettait de tracer par PCR la persistance de cellules déficientes pour *Nle*, notamment dans les expériences de transplantations, ce qui n'aurait pas été possible si l'allèle Nle^{Del} était présent avant la délétion. C'est pour ces raisons que les souris $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$ ont été préférées à des souris $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/Del}$. Avant mon arrivée au laboratoire, des études préliminaires sur ces souris avaient montré que la délétion ubiquitaire de *Nle* induisait la mort des souris en une douzaine de jours, précédée de graves défauts dans le système hématopoïétique et l'épithélium intestinal. J'ai donc utilisé ces souris pour étudier le rôle de *Nle* dans le système hématopoïétique (Figure 68.e-f). Par ailleurs, les lignées $Villin^{CreERT2}$, Tyr^{Cre}, ou encore $Pax7^{CreERT2}$ ont été utilisées pour l'étude de *Nle* dans l'épithélium intestinal, dans le lignage mélanocytaire et dans les cellules immatures du muscle respectivement (*cf.* Discussion générale).

2. Des défauts d'export de la sous-unité pré-ribosomique 60S suite à la délétion de *Nle* dans les cellules ES

Afin de documenter le rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes, nous avons cherché à savoir si, comme son orthologue chez la levure, *Nle* était nécessaire pour la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique chez la souris. J'ai été amenée à utiliser des approches classiques du domaine, en m'appuyant sur l'expertise de plusieurs laboratoires (Micheline Fromont-Racine, Institut Pasteur, Paris ; Pierre-Emmanuel Gleizes, Université Paul Sabatier, Toulouse ; Jean-René Huynh, Institut Curie, Paris). De façon notable, certaines de ces approches nécessitaient de grandes quantités de matériel biologique ; je les ai donc utilisées sur le modèle *ex vivo* des cellules ES. En ce qui concerne les expériences de fractionnement cellulaire sur gradients de sucrose, la séparation des particules pré-40S, pré-60S et 80S a nécessité des adaptations du protocole utilisé classiquement chez la levure. J'ai ainsi pu montrer que le profil de polysomes était fortement altéré suite à la délétion de *Nle*, suggérant un rôle de *Nle* dans la biogenèse de la grande sous-unité ribosomique (*cf.* Figure 6B de l'article). J'ai également utilisé des approches de Northern blot pour mettre en évidence des défauts de maturation de l'ARNr suite à la délétion de *Nle*. Je me suis interrogée sur la façon de normaliser les dépôts sur gel. En effet, la quantité d'ARN totale mesurée par l'absorbance à 260nm reflète principalement la quantité d'ARNr matures, espèces d'ARN majoritaires dans les cellules. Les défauts de biogenèse des ribosomes pouvant induire une diminution de la formation des ARNr matures, cette normalisation ne nous a pas paru adaptée. En déposant sur gel les ARN totaux obtenus à partir d'un nombre identique de cellules, j'ai pu mettre en évidence que la délétion de *Nle* induisait effectivement une diminution des espèces d'ARNr matures 5.8S et 28S par cellule. Le dépôt d'une quantité identique d'ARN aurait provoqué une surestimation des accumulations des espèces immatures. En revanche, le dépôt d'un équivalent de cellules reflète plus fidèlement l'accumulation des espèces immatures 12S et 32S par cellule (*cf.* Figure 6D-F de l'article).

Un des objectifs de cette recherche était de visualiser *in fine* des défauts de biogenèse des ribosomes *in vivo* sur des populations rares, les cellules souches, ce qui pouvait être considéré comme une difficulté importante. Des approches de miniaturisation de l'analyse des polysomes ont été mises au point pour l'étude des ARNm en cours d'élongation dans les somites et le tube neural d'embryons de souris au stade E11 (Kondrashov et al., 2011). Nous avons préféré des approches plus adaptées à l'étude d'un petit nombre de cellules, à savoir la RT-qPCR sur des populations cellulaires triées, ou le développement d'approches permettant la détection au niveau cellulaire de l'accumulation des particules pré-ribosomiques dans les nucléoles, conséquences des défauts de l'export de la grande sous-unité ribosomique. Ces approches reposent sur la visualisation soit de protéines ribosomiques incorporées dans la particule avant le rôle de NLE, soit d'ARNr composants de cette particule. J'ai dans un premier temps testé plusieurs techniques dans les cellules ES de façon exploratoire, à la fois

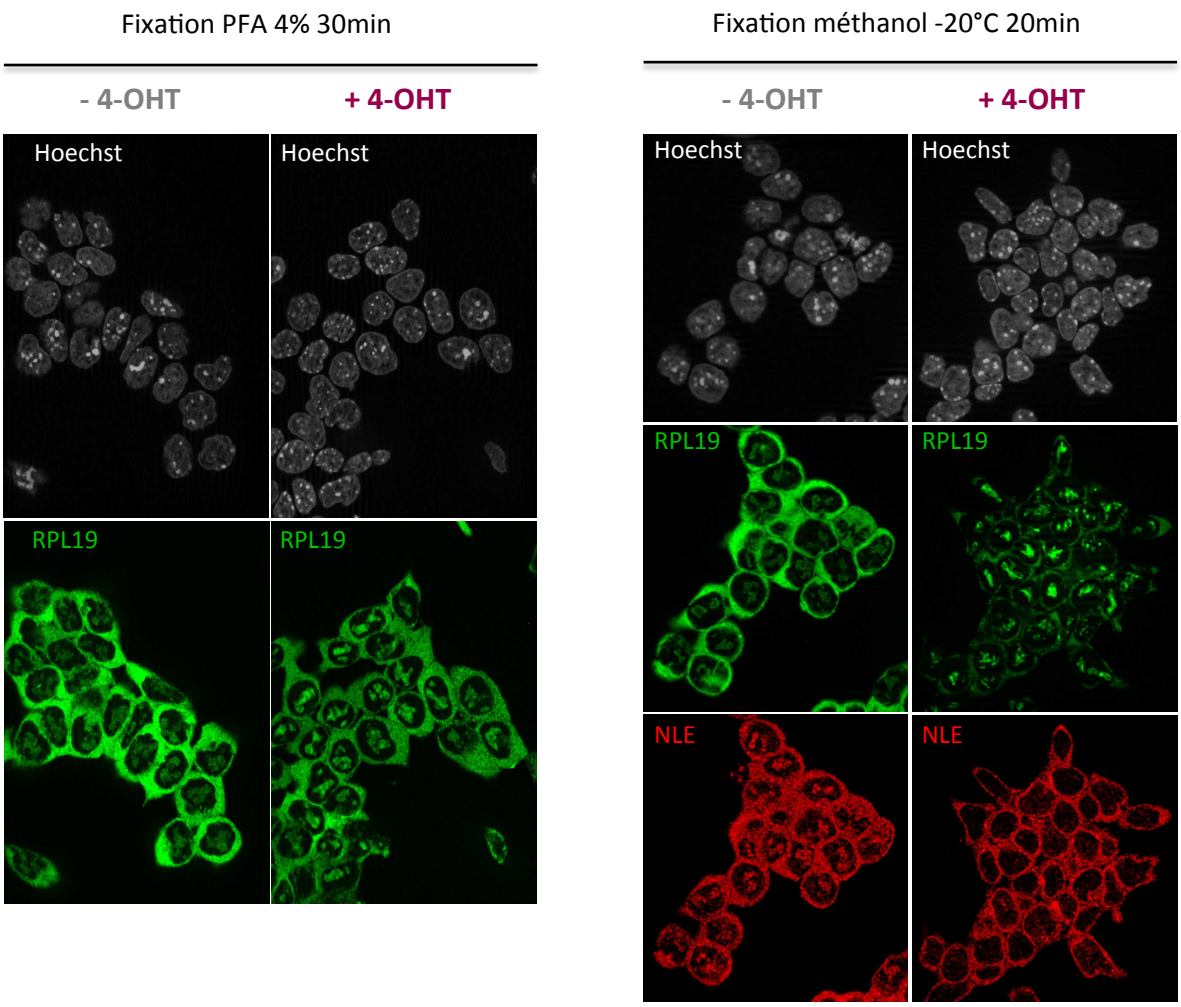


Figure 69. Défauts d'export observés en immunofluorescence

Des cellules ES traitées ou non au 4-OHT à J3 sont fixées à la paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 30 minutes (à gauche) ou au méthanol à -20°C pendant 20 minutes (à droite) et sont marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine ribosomique RPL19, et avec l'anticorps dirigé contre NLE dans le cas de la fixation méthanol uniquement. Un marquage au Hoechst permet de repérer les noyaux.

pour documenter le phénotype de ces cellules suite à la délétion de *Nle*, et pour être capable de choisir une technique adaptée à l'étude des populations hématopoïétiques. Les différentes approches sont présentées ici.

2.1. Visualisation d'une RP par immunofluorescence

Afin de visualiser les RP de la grande sous-unité, j'ai utilisé une approche d'immunofluorescence. Après avoir testé plusieurs anticorps, j'ai choisi l'anticorps dirigé contre RPL19, qui fonctionnait entre mes mains. Dans un premier temps, en utilisant des protocoles classiques de fixation à la paraformaldéhyde (PFA), j'ai observé la localisation de cette RP. Dans des cellules non traitées au 4-OHT, le marquage reflète la localisation de la grande sous-unité ribosomique : j'ai observé un marquage fort dans le cytoplasme, et un marquage plus faible dans des zones restreintes du noyau, probablement les nucléoles. Après 3 jours de traitement au 4-OHT, le marquage est qualitativement différent : j'observe un marquage qui semble plus faible dans le cytoplasme, et une accumulation de RPL19 dans les nucléoles (Figure 69, colonne de gauche). Ces résultats suggèrent que la délétion de *Nle* induit des défauts d'export de la grande sous-unité et donc son accumulation dans les nucléoles. Afin de confirmer ces résultats, j'ai voulu illustrer que la perte de la protéine NLE était corrélée avec l'accumulation de RPL19. Dans nos mains, l'anticorps dirigé contre NLE, un anticorps polyclonal de lapin, permet de détecter la protéine dans des cellules ES après une fixation au méthanol. J'ai donc réalisé des immunofluorescences sur des cellules ES fixées au méthanol (Figure 69, colonne de droite). Dans les cellules non traitées au 4-OHT, l'anticorps dirigé contre NLE révèle un marquage cytoplasmique et un marquage restreint dans le noyau. Le marquage nucléaire, mais pas le marquage cytoplasmique, disparaît dans les cellules déficientes pour *Nle*, indiquant que seul le marquage nucléaire pourrait être spécifique. Des marquages par immunofluorescence des protéines NLE et B23 (ou Nucléophosmine, une protéine nucléolaire) simultanément indiquent que ces deux protéines sont localisées dans une zone similaire du noyau, suggérant que NLE est probablement nucléolaire (*cf.* article, Figure 6A). Le marquage de la protéine RPL19 sur les cellules non traitées au 4-OHT fixées au méthanol est comparable avec celui des cellules fixées à la PFA. De façon notable, cette analyse révèle un effet similaire à celui observé dans le cas de la fixation à la PFA, à savoir une diminution du marquage cytoplasmique et une augmentation du marquage nucléolaire. La différence d'intensité observée entre les deux situations est probablement liée au mode de fixation utilisé (Schnell et al., 2012).

Ces résultats sont préliminaires : il serait important de quantifier ces marquages, par exemple par analyse d'image, et de réaliser en parallèle un immuno-marquage avec un anticorps dirigé contre la petite sous-unité, afin de s'assurer de la spécificité du rôle de *Nle* dans l'export de la grande sous-unité. L'immuno-marquage de CSH triées pour une visualisation par microscopie était envisageable bien que lourd, je n'ai donc pas privilégié cette approche dans un premier temps.

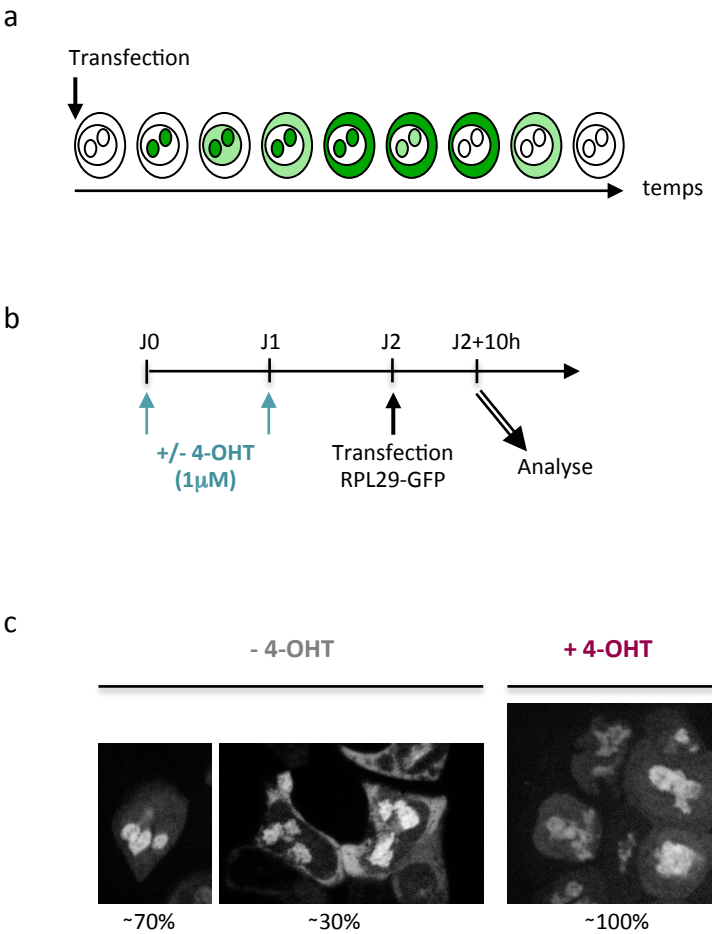


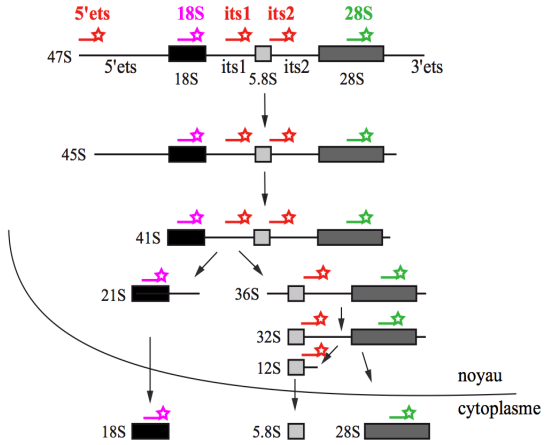
Figure 70. Approche par transfection de la visualisation de défauts d'export

a. Localisation attendue de l'expression de RPL29-GFP suite à une transfection transitoire. **b**. Protocole suivi : les cellules ES sont traitées ou non au 4-OHT, puis transfectées à J2 avec un plasmide codant pour la protéine de fusion RPL29-GFP. A J2+10h, les cellules sont fixées (PFA, 4%) et observées au microscope. **c**. Exemples de profils observés.

2.2. Transfection d'une protéine de fusion RPL29-GFP

Les RP sont incorporées à différents stades de la maturation des sous-unités ribosomiques. Suivre la localisation d'une RP marquée qui s'incorpore dans une sous-unité ribosomique peut permettre de visualiser l'export cette sous-unité, et de mettre en évidence d'éventuels défauts d'export. Ainsi, l'expression inductible de la protéine de fusion RPL29-GFP a été utilisée par l'équipe de U.Kutay pour cribler des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes dans des cellules HeLa (Wild et al., 2010). De façon similaire, j'ai utilisé des approches de transfection transitoire de la protéine RPL29-GFP dans des cellules ES. Cette approche présente l'avantage d'obtenir des renseignements sur la dynamique de l'export des sous-unités ribosomiques, et pas seulement une observation de l'état de la cellule à un temps *t*, comme ce que l'on a pu observer en immunofluorescence. Dans des cellules contrôles, suite à la transfection, la protéine RPL29-GFP est observée dans un premier temps dans les nucléoles, puis dans le nucléoplasme et le cytoplasme, de façon corrélée avec l'export de la grande sous-unité contenant cette protéine marquée. La transfection étant transitoire, la protéine n'est plus exprimée à des temps plus tardifs (Figure 70.a). J'ai supposé dans ces expériences que les marquages dans des zones délimitées du noyau, correspondant par ailleurs à des zones généralement de faible densité du marquage au Hoechst, étaient des marquages nucléolaires. Afin de visualiser d'éventuels défauts de l'export de la grande sous-unité ribosomique suite à la délétion de *Nle*, j'ai voulu exprimer la protéine RPL29-GFP dans des cellules déficientes pour *Nle*. Le choix des cinétiques de délétion de *Nle* et de la transfection de RPL29-GFP a été particulièrement délicat. En effet, il était important que la protéine RPL29-GFP soit exprimée dans des cellules dans lesquelles la protéine NLE avait déjà disparue. La transfection doit alors avoir lieu après la délétion génomique de *Nle*, et à une période où la protéine NLE a disparu. L'analyse Western blot de la protéine NLE a montré que celle-ci n'est plus détectée dans les cellules ES deux jours après l'induction au 4-OHT (*cf.* Figure S6B de l'article). De plus, les cellules commencent à mourir dès J3, contraignant encore les temps d'expérience. J'ai donc choisi de suivre la cinétique présentée en Figure 70.b pour une première analyse : j'ai transfecté les cellules à J2 et analysé le profil d'expression 10h après. Dans les cellules non traitées au 4-OHT, j'ai observé des cellules avec un marquage fort dans le nucléole et plus léger dans le nucléoplasme, et dans environ 30% des cas, un marquage bien défini dans le cytoplasme et dans les nucléoles était visible. Dans les cultures traitées au 4-OHT, la majorité des cellules présentaient un profil avec un marquage fort dans les nucléoles et plus faible dans le nucléoplasme, je n'ai observé que très rarement la présence de la protéine RPL29-GFP dans le cytoplasme (Figure 70.c). Ces résultats préliminaires sont cohérents avec les marquages en immunofluorescence et suggèrent que la délétion de *Nle* pourrait effectivement affecter l'export de la grande sous-unité ribosomique. Afin de valider cette conclusion, une quantification de ces résultats et la réalisation de l'expérience contrôle permettant le suivi de l'export de la petite sous-unité seraient

a



b

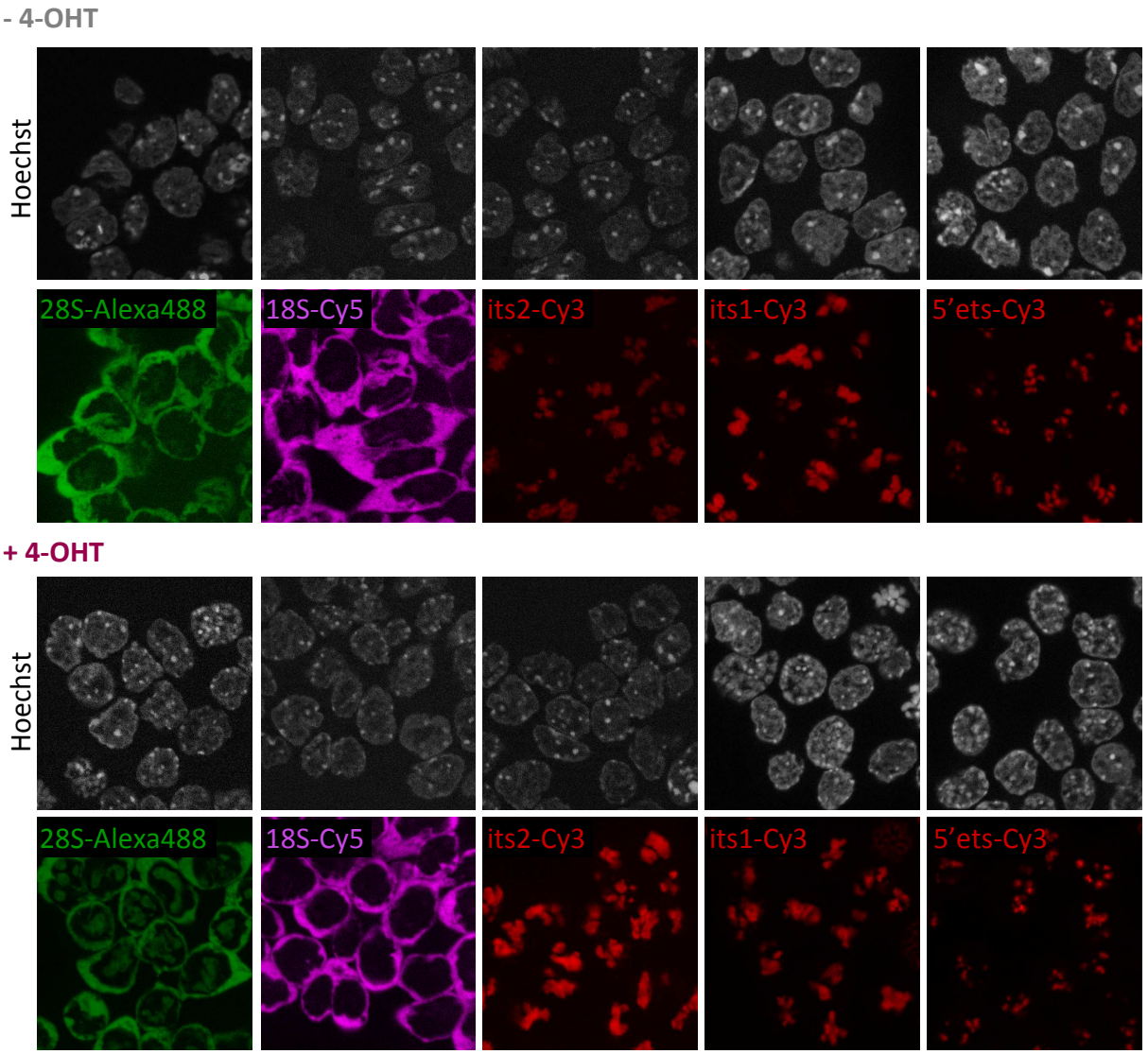


Figure 71. Marquage de FISH sur des cellules ES

a. Schéma simplifié de la maturation des ARNr, avec la localisation des sondes utilisées pour le FISH. **b**. Marquages de FISH sur des cellules ES à J3.

importantes. Cette approche n'étant pas facilement exploitable pour l'étude des CSH, je ne l'ai pas retenue par la suite.

2.3. Marquage des ARNr par FISH

Afin d'observer la localisation des particules pré-ribosomiques autrement que par la détection de certaines RP, j'ai exploré une piste alternative, à savoir la visualisation des ARNr composants des particules pré-ribosomiques, par des expériences de FISH avec des sondes dirigées contre différentes espèces des ARNr (O'Donohue et al., 2010). Des sondes ADN couplées à des fluorochromes sont dirigées contre des ARNr matures ou contre des séquences présentes dans les ARNr immatures (Figure 71.a). Des exemples des marquages obtenus sont présentés en Figure 71.b et sont détaillés ci-dessous. Afin de visualiser la grande sous-unité ribosomique mature ou immature, j'ai utilisé les sondes 28S et its2 : la sonde 28S marque l'ARNr mature et l'ensemble des espèces immatures en amont, elle est détectée principalement dans le cytoplasme des cellules non traitées au 4-OHT, et faiblement dans le noyau (plus particulièrement les nucléoles), alors que la sonde its2 marque des espèces immatures présentes uniquement dans les nucléoles. Dans les cellules traitées au 4-OHT, le marquage avec la sonde 28S est davantage visible au sein du noyau, probablement dans les nucléoles. De façon similaire, la délétion de *Nle* est accompagnée par une augmentation du marquage its2. Je me suis alors demandée si l'augmentation de ces marquages pouvait être due à une augmentation du niveau de la synthèse de l'ARNr. Afin de tester cette hypothèse, j'ai utilisé une sonde 5'ets, qui ne détecte que l'espèce immature 47S, et pourrait refléter le niveau de synthèse de l'ARNr. Le marquage détecté avec la sonde 5'ets dans les cellules contrôles est nucléaire (probablement nucléolaire), et de façon attendue plus restreint que le marquage its2. Dans les cellules traitées au 4-OHT, le marquage 5'ets ne semble pas modifié, suggérant qu'une hausse de la synthèse du 47S n'est probablement pas responsable de l'augmentation des marquages 28S et its2 dans les nucléoles des cellules suite à la délétion de *Nle*, mais est sans doute liée à une accumulation des particules pré-ribosomiques de la grande sous-unité. Afin de tester si cet effet est spécifique de la grande sous-unité, j'ai utilisé de façon similaire des sondes 18S et its1 dirigées contre des espèces d'ARNr matures et immatures associées à la petite sous-unité. Comme attendu, dans les cellules non traitées au 4-OHT, la sonde 18S est majoritairement détectée dans le cytoplasme, et le marquage de la sonde its1 est localisé dans le noyau (probablement dans les nucléoles). La délétion de *Nle* ne semble pas modifier ces marquages, suggérant que l'export de la petite sous-unité n'est pas affecté.

Les trois approches présentées ici (visualisation de RPL19 par immunofluorescence, transfection de RPL29-GFP, marquage des ARNr par FISH) donnent des résultats cohérents entre eux, suggérant un effet de *Nle* dans l'export de la grande sous-unité ribosomique. Par l'approche de FISH et d'immunofluorescence, l'accumulation des particules pré-60S est observée dans des zones restreintes du noyau, qui sont très probablement les nucléoles, lieu de synthèse et de maturation

précoce des ribosomes. Ces données suggèrent que la délétion de *Nle* induit des défauts d'export de la grande sous-unité depuis le nucléole et soutiennent l'idée que *Nle* interagit avec la grande sous-unité pré-ribosomique au sein des nucléoles, plutôt que du nucléoplasme, comme il avait été proposé chez la levure.

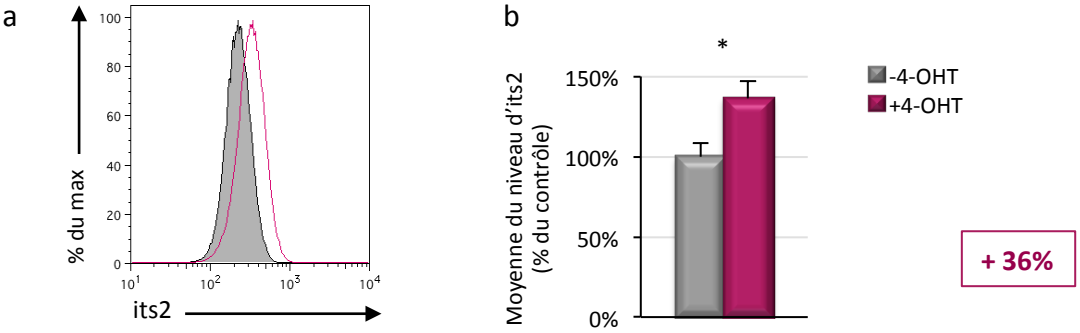
En interprétant l'ensemble de ces résultats concernant l'export de la grande sous-unité ribosomique, j'ai été amenée à me poser plusieurs questions. Les approches de FISH et d'immunofluorescence proposent une visualisation des particules ribosomiques à un temps *t*, et ne permettent pas de conclure sur la dynamique de la biogenèse des ribosomes dans les cellules déficientes pour *Nle*. Est-ce que la maturation et l'export de la grande sous-unité sont complètement bloquées, ou est-ce qu'un retard seulement affectent les cellules déficientes pour *Nle* est une question à laquelle ces expériences ne permettent pas de répondre. L'approche par transfection transitoire, ou des marquages radioactifs des ARNr nouvellement synthétisés pourraient aider à répondre à cette question.

L'approche de FISH m'a paru pertinente à développer, pour aborder les questions de défauts de biogenèse des ribosomes dans les CSH. En effet, je pouvais utiliser le fait que les marquages obtenus avec les sondes its1, its2 et 5'ets étaient uniquement nucléolaires : la quantification du marquage cellulaire total correspondait à la quantification du marquage nucléolaire d'intérêt. J'envisageais alors une approche par cytométrie de flux pour mesurer les intensités des marquages. Cette perspective m'ouvrait des possibilités d'analyse des CSH, en couplant le FISH à des marquages de cellules hématopoïétiques. L'approche de FISH permet aussi d'analyser en parallèle l'export de la grande et de la petite sous-unité, ce qui n'a pas été développé jusqu'ici avec les autres approches. La régulation de la biogenèse des ribosomes étant très complexe, on pourrait s'attendre à ce que des rétro-contrôles se mettent en place suite à des défauts spécifiques de biogenèse des ribosomes. Une stimulation ou une inhibition de la synthèse du 47S, ou une diminution de la synthèse de l'autre sous-unité pourraient ainsi être envisagées. Mon objectif était de mettre en évidence des défauts spécifiques de la grande sous-unité, il m'a paru pertinent d'analyser en parallèle l'export de la grande et de la petite sous-unité. En quantifiant le ratio its2/its1, je pouvais documenter les défauts spécifiques de la grande sous-unité par rapport à la synthèse de la petite sous-unité dans les cellules hématopoïétiques, c'est ce paramètre que j'ai utilisé pour l'étude dans le système hématopoïétique (*cf.* article). De plus, la quantification du marquage obtenu par FISH avec la sonde 5'ets pourrait donner une idée du niveau de biosynthèse du 47S.

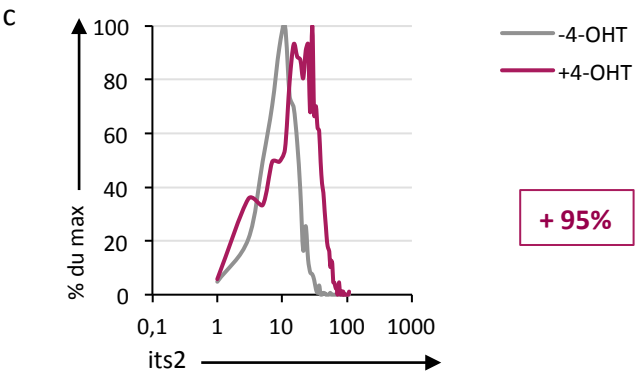
2.4. Quantification de l'accumulation de la grande sous-unité pré-ribosomique

Je me suis donc concentrée sur la quantification de l'accumulation de la grande sous-unité ribosomique en mesurant les intensités des marquages de FISH par cytométrie de flux. Pour cela, j'ai adapté le protocole de FISH pour des cellules en suspension. La sonde its2-Cy3 peut être excitée avec

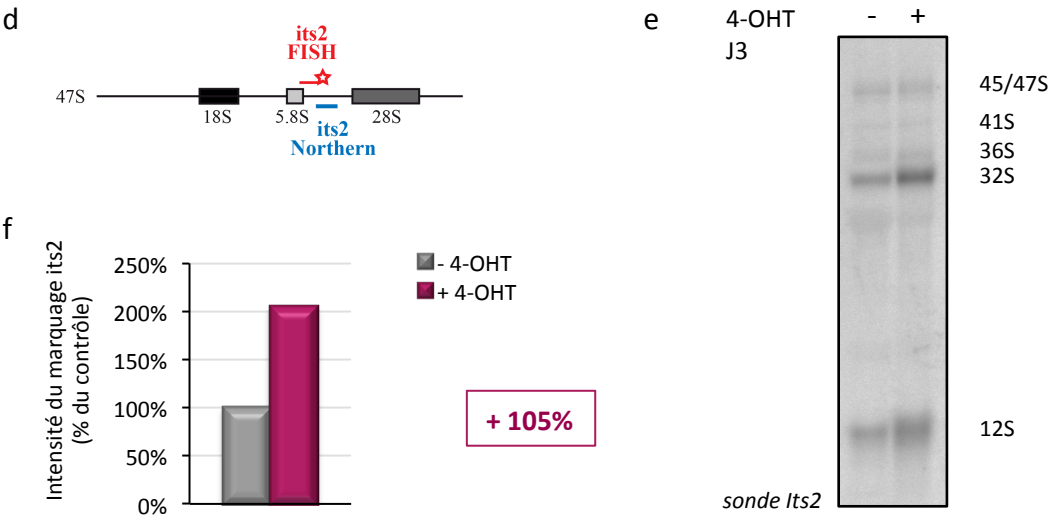
Quantification d'expériences de FISH par cytométrie de flux



Quantification d'expériences de FISH par analyse d'images



Quantification de Northern Blot



le laser jaune/vert à 561nm sur le Facs LSR Fortessa, la lecture de la fluorescence émise à 582nm permet une mesure de l'intensité du marquage (Figure 72.a). L'accumulation d'its2 peut alors être quantifiée en comparant les moyennes des populations observées, une augmentation de 36% a été mesurée pour l'expérience présentée (Figure 72.b). Pour d'autres expériences indépendantes, des augmentations entre 36% et 55% avaient été mesurées.

J'ai envisagé de valider cette quantification de plusieurs manières. Tout d'abord, en collaboration avec la plate-forme d'Imagerie Dynamique de l'Institut Pasteur, j'ai développé une approche de quantification par analyse d'images, en utilisant le logiciel Acapella (collaboration avec Anne Danckaert). Des images ont été réalisées à l'apotome au grossissement *25 à partir d'expériences de FISH sur cellules ES sur des lamelles de verre, les noyaux des cellules ont été détectés en utilisant les images du Hoechst, et la fluorescence émise par la sonde its2 dans le noyau de chaque cellule a été mesurée. Les paramètres de taille et de « rondeur » des noyaux ont été adaptés à mes images. Une analyse préliminaire a permis de mesurer une augmentation de 95% du marquage its2 dans les cellules ES déficientes pour *Nle* (Figure 72.c). Une analyse similaire sur une expérience indépendante avait mis en évidence une augmentation de 68%.

En parallèle de l'approche par FISH, la quantification de Northern blot peut également valider l'accumulation du marquage its2. Une sonde its2, dirigée contre une séquence au sein de la région its2 légèrement différente de celle choisie en FISH, est utilisée pour le Northern blot (Figure 72.d). Des ARN totaux extraits de cellules ES traitées ou non au 4-OHT sont utilisés pour la migration du Northern, la membrane est hybridée avec la sonde its2 marquée au ^{32}P (Figure 72.e). Différentes bandes correspondant aux espèces intermédiaires des ARNr, à savoir le 47S, 41S, 36S, 32S, et 12S, sont détectées, une accumulation des espèces 32S et 12S est visible dans les ARN des cellules déficientes pour *Nle*. La quantification du marquage total visible avec la sonde its2 par le logiciel Image Quant révèle une augmentation de 105% du marquage (Figure 72.f).

Enfin, une approche par RT-qPCR a aussi été envisagée. Au sein du laboratoire, nous avons choisi des amorces capables d'amplifier les séquences 5'ets, its1 et its2, et donc de quantifier les espèces d'ARNr immatures (Figure 72.g). J'envisage de mesurer de cette façon l'accumulation de la grande sous-unité pré-ribosomique par la quantification du niveau d'expression d'its2 dans les cellules ES. Une telle approche par RT-qPCR pourra être utilisée sur des populations rares, comme les CSH après un tri cellulaire par cytométrie de flux. Cette approche a été utilisée par Aline Stedman, en stage post-doctoral dans le laboratoire : sur des extraits de cryptes d'intestin contrôles et invalidés pour *Nle*, la RT-qPCR a permis de mettre en évidence une accumulation d'its2, sans modification du niveau d'its1 ou du 47S (Figure 72.h).

En conclusion, toutes les approches testées mettent en évidence une accumulation de la grande sous-unité suite à la délétion de *Nle*, d'une intensité allant de 30% à 100% environ. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces variations et pourront être prises en compte dans l'interprétation des données. Tout d'abord, entre mes mains, l'intensité du phénotype est variable en fonction des expériences. La

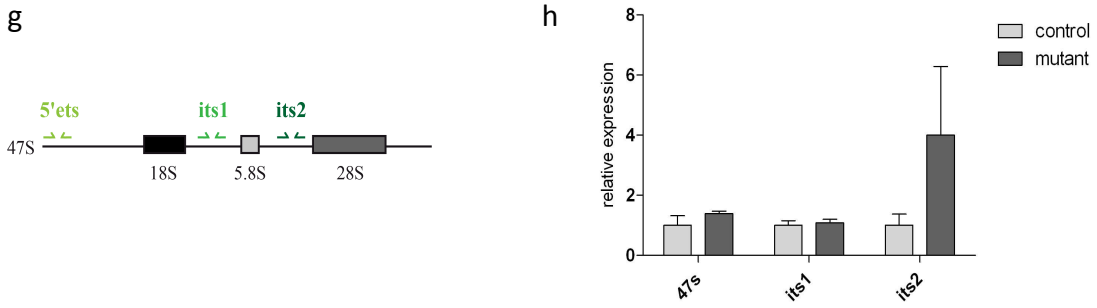


Figure 72. Quantification de l'accumulation de its2 dans les cellules ES déficientes pour *Nle*

Des cellules ES *Rosa26*$^{CreERT2/+}$ sont traitées ou non au 4-OHT et analysées à J3. **a-b**. Quantification du FISH par cytométrie de flux. **a**. Profil facs représentatif. **b**. Quantification du niveau de its2 (n=3). **c**. Quantification du FISH par analyse d'images avec le logiciel Acapella (n=1). **d-f**. Quantification par Northern blot. **d**. Localisations relatives des sondes its2 pour le FISH et le Northern blot. **e**. Northern blot avec la sonde dirigée contre la séquence its2. **f**. Quantification du marquage total détecté avec la sonde its2 sur le Northern blot (n=1). **g-h**. Stratégie de quantification par qPCR. **g**. Les positions des amorces sont présentées sur la séquence de l'ARNr 47S. **h**. Exemple de quantification par qPCR sur des ARN extraits de cryptes intestinales (Aline Stedman). 4 jours après la délétion de *Nle* dans l'épithélium intestinal, les ARNr contenant la séquence its2, *i.e.* précurseurs de la grande sous-unité sont augmentés, mais pas les ARNr précurseurs de la petite sous-unité, ni l'ARNr 47S, suggérant une accumulation spécifique de la grande sous-unité ribosomique.

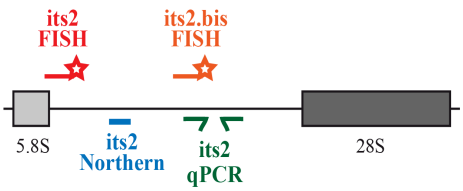


Figure 73. Localisations relatives des sondes et amorces utilisées pour détecter la séquence its2

régulation de la biogenèse des ribosomes étant très liée à la prolifération des cellules, l'état de confluence de la culture pourrait par exemple influencer l'effet de la délétion de *Nle*. En effet, il est raisonnable de penser que la biogenèse des ribosomes pourrait être réduite dans des cellules presque confluentes, l'accumulation des particules pré-ribosomiques serait peut-être alors sous-estimée. Par ailleurs, les sondes de Northern blot et de FISH, ainsi que les amorces de RT-qPCR ne sont pas localisées exactement au même endroit sur la séquence de l'ARNr, elles ont été choisies en fonction de critères spécifiques pour chacune de ces techniques. En prenant en compte une certaine variabilité des clivages lors de la biogenèse des ribosomes, les sondes et les amorces pourraient alors détecter des espèces d'ARNr légèrement différentes (Figure 73). En fonction des différentes étapes inhibées suite à la délétion de *Nle*, qui ne sont pas précisément identifiées, la quantification de l'accumulation d'its2 pourrait varier en fonction des techniques utilisées. Il pourrait être intéressant d'utiliser plusieurs sondes en parallèle pour affiner ces comparaisons. Une deuxième sonde its2 pour le FISH (its2.bis) est par exemple disponible au laboratoire, elle a été utilisée pour décrire le profil de la biogenèse des ribosomes dans la moelle osseuse (*cf.* Résultats.3). De plus, des caractéristiques techniques liées à chaque type d'expérience peuvent être mises en évidence. Ainsi, le système apotome permet d'imager une coupe optique. Pour les analyses des images de FISH par microscopie, le choix du z est fait manuellement, et peut varier légèrement d'une image à l'autre. Par ailleurs, il pourrait être intéressant de mettre en parallèle la sensibilité de la caméra CCD utilisée en microscopie avec la sensibilité des lecteurs de fluorescence du facs. L'approche par Northern blot peut présenter de légères approximations, si l'on considère par exemple les phénomènes de diffusion ou de perte des espèces d'ARNr lors de la migration et du transfert. En outre, l'accessibilité aux ARNr est un point intéressant à soulever : l'accès aux ARNr de la sonde de FISH nécessite des étapes de fixation et de perméabilisation, dont les efficacités ne sont pas faciles à mesurer. Par contraste, les approches de Northern blot ou de RT-qPCR permettent d'éviter ces problèmes. Ainsi, il est possible que l'approche par FISH sous-estime légèrement la quantification des marquages, et modifie peut être alors la quantification des accumulations observées. Enfin, la pureté du tri cellulaire sera importante pour les approches de RT-qPCR sur les populations rares de cellules souches. L'ensemble de ces biais liés à l'expérimentation sont à prendre en compte lors de la comparaison des résultats obtenus avec diverses techniques.

Par ailleurs, comme nous l'avons vu, la quantification d'une éventuelle accumulation de la petite sous-unité semble être un bon contrôle pour documenter le phénotype suite à la délétion de *Nle*. La quantification d'un marquage its1 est aussi envisagé en parallèle avec les approches de FISH, de RT-qPCR et de Northern blot.

a

Marquage sur cellules hématpoïétiques

↓

Fixation (PFA 4%)

↓

Déshydratation (EtOH 70%)

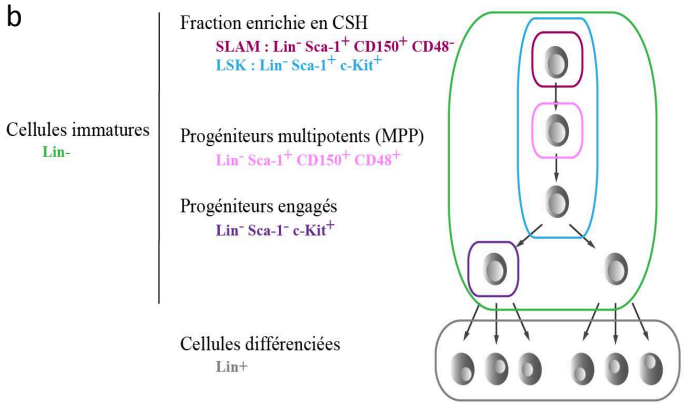
↓

Pré-hybridation et
hybridation (10% formamide, 2x SSC)

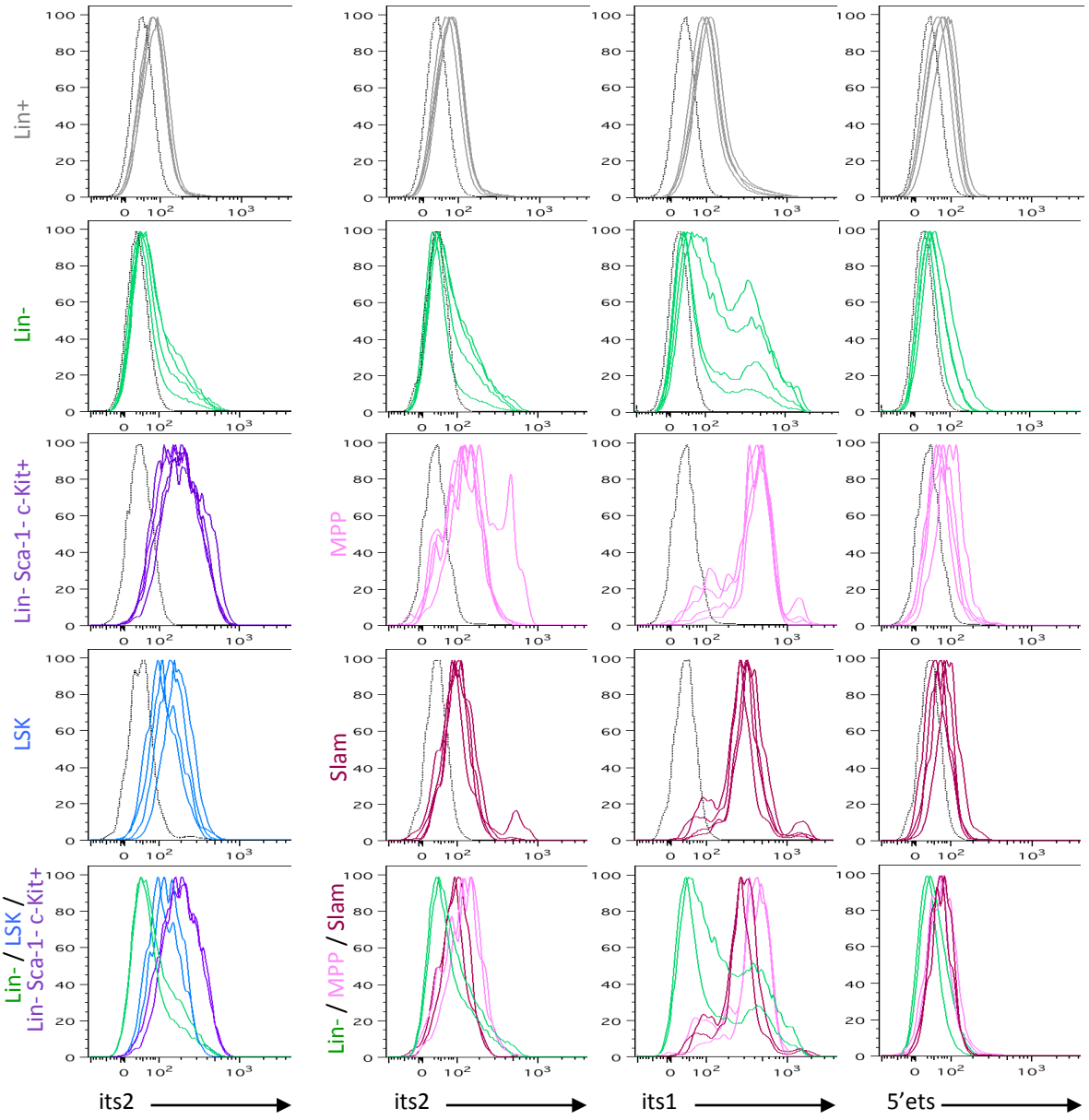
↓

Analyse au facs

b



c



3. Profil de la biogenèse des ribosomes dans la moelle osseuse : développement d'une technique de FISH couplée à des marquages des cellules hématopoïétiques

Afin d'obtenir des informations sur la biogenèse des ribosomes dans différentes populations de la moelle osseuse suite à la délétion de *Nle*, j'ai choisi d'utiliser l'approche de FISH et de quantification par cytométrie de flux. J'ai alors développé un protocole pour coupler les immuno-marquages classiques des cellules hématopoïétiques et le marquage de FISH. Les principales étapes sont indiquées en Figure 74.a. En parallèle, j'ai testé parmi les fluorochromes couplés aux anticorps utilisés ceux qui résistaient au protocole de FISH. Cette approche m'a permis de visualiser la présence de défauts de biogenèse des ribosomes dans les CSH, mais pas dans les cellules B, ces résultats sont détaillés dans l'article. J'ai aussi observé des différences notables dans les profils de FISH entre les différents types cellulaires dans une souris contrôle.

Dans des souris contrôles, j'ai analysé les intensités des marquages obtenus avec les sondes its1, its2 et 5'ets au sein de plusieurs populations de la moelle osseuse. L'ensemble des progéniteurs et des cellules différenciées représente la majorité des cellules hématopoïétiques ; ces cellules, exprimant des marqueurs des différents lignages, sont regroupées sous le terme Lin^+. Les cellules Lin^-, quant à elles, regroupent les cellules immatures du système hématopoïétique, cette population hétérogène représente environ 5% des cellules de la moelle osseuse, elle comprend les CSH, les progéniteurs multipotents (MPP) et les progéniteurs immatures engagés dans la différenciation lymphoïde ou myéloïde. Les populations analysées dans cette étude et les combinaisons de marqueurs associées sont indiquées sur la Figure 74.b. L'utilisation d'un grand nombre de marqueurs permet d'obtenir des populations de CSH ou de progéniteurs relativement homogènes. Dans la moelle osseuse, les profils de FISH obtenus avec les sondes its1 et its2 mettent en évidence des différences en fonction des populations étudiées (Figure 74.c). Les cellules Lin^+ sont faiblement marquées. La majorité des cellules Lin^- est également faiblement marquée ; cependant, une sous-population des cellules Lin^- présente un marquage plus fort en its1 et its2 : c'est le cas des CSH, des MPP et des cellules Lin^- $Sca\text{-}1^-$ $c\text{-}Kit^+$, population enrichie en progéniteurs myéloïdes. Les cellules les plus fortement marquées sont retrouvées au sein des populations de MPP ou de Lin^- $Sca\text{-}1^-$ $c\text{-}Kit^+$, en fonction des marquages utilisés. La sonde 5'ets donne des résultats légèrement différents : le marquage est globalement faible pour toutes les populations étudiées. Ce résultat est probablement lié au fait que la sonde 5'ets ne révèle que l'espèce d'ARNr immature 47S. Il est alors difficile de conclure si les intensités sont différentes en fonction des populations. Une approche similaire m'a permis d'observer les intensités des marquages its1, its2 et 5'ets dans les cellules du lignage B. Des marquages avec des anticorps dirigés contre CD19 et IgM dans la moelle osseuse ou dans la rate permettent d'identifier des populations de progéniteurs pré-B, de cellules B immatures et de cellules B matures (Figure 74.d).

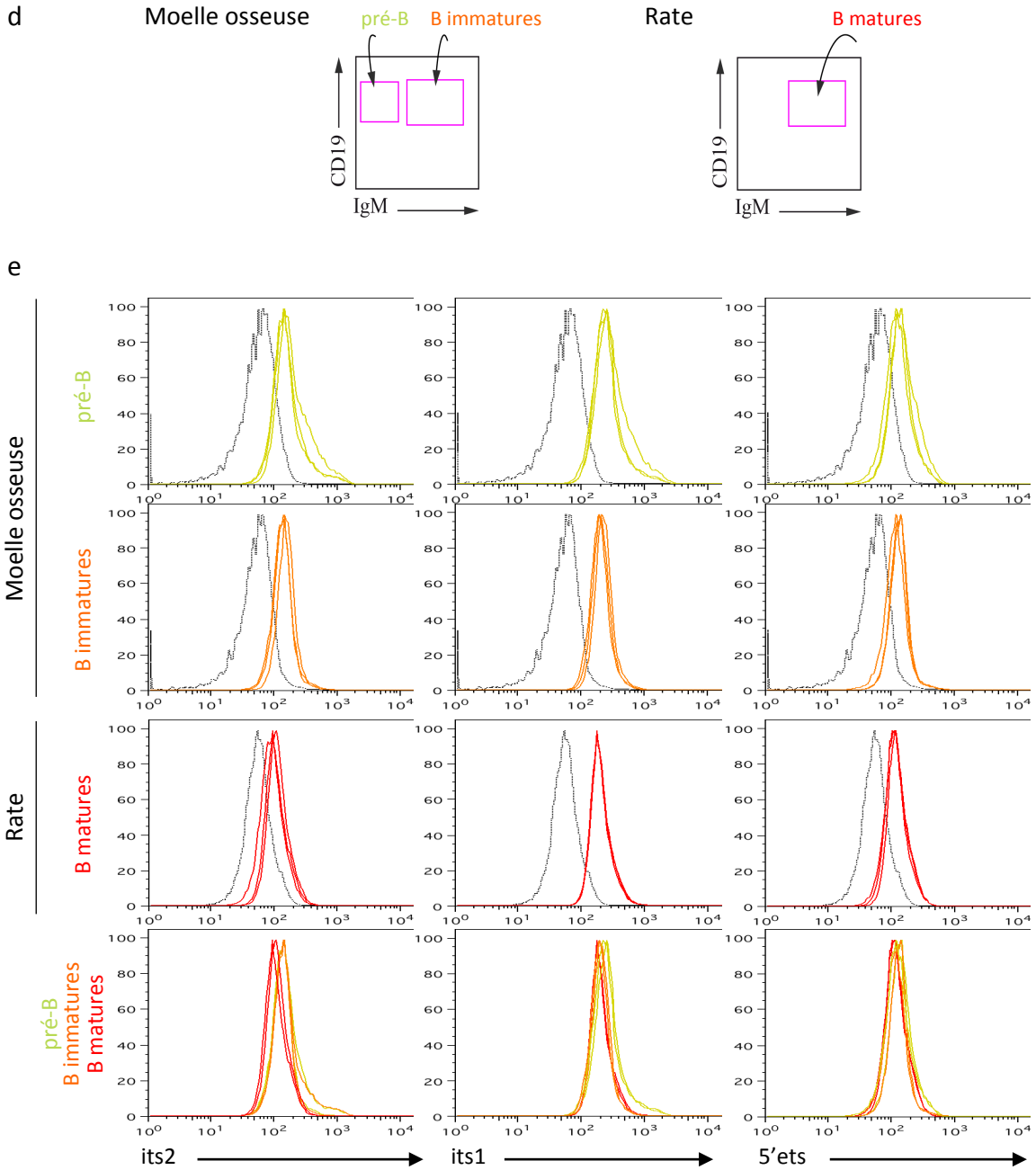


Figure 74. FISH sur différentes populations hématopoïétiques

a. Principales étapes du protocole suivi. **b**. Schéma des différentes populations de la moelle osseuse étudiées. **c**. Quantification par cytométrie de flux des marquages de FISH avec les sondes its2, its1 et 5'ets pour différentes populations de la moelle osseuse de souris contrôles (induites au tamoxifène, exprimant ou pas la recombinase Cre). La courbe en pointillé noir révèle le niveau de détection pour des populations non marquées. Dans les graphes de la dernière ligne sont regroupées les courbes de plusieurs populations pour deux individus. **d**. Schéma de l'identification des cellules du lignage B en fonction des marqueurs CD19 et IgM. **e**. Quantification par cytométrie de flux des marquages de FISH avec les sondes its2, its1, et 5'ets pour différentes populations du lignage B, dans la moelle osseuse ou la rate de souris contrôles (exprimant la Cre sous contrôle du promoteur CD19). La courbe en pointillé noir révèle le niveau de détection pour des populations non marquées. Dans les graphes de la dernière ligne sont regroupées les courbes des différentes populations pour deux individus.

Avec les trois sondes its1, its2 et 5'ets, les intensités ne sont pas très différentes en fonction des populations observées (Figure 74.e).

Les différences des marquages observées dans certaines populations de la moelle osseuse suggèrent des différences de l'état de la biogenèse des ribosomes en fonction des types cellulaires. L'augmentation des intensités des marquages its1 et its2 dans les CSH et les progéniteurs immatures pourraient refléter une biogenèse des ribosomes accrue dans ces cellules. Les progéniteurs immatures sont des cellules qui prolifèrent beaucoup. Etant donné que les besoins en biogenèse des ribosomes sont plus importants dans des cellules en prolifération, je me suis demandée si les différences observées étaient liées à l'état prolifératif des populations étudiées. Cependant, les CSH sont majoritairement quiescentes et les niveaux d'its1 et d'its2 détectés y sont pourtant forts. De plus, parmi les cellules Lin^+, les progéniteurs prolifèrent et certaines cellules différenciées sont post-mitotiques. Les profils de FISH analysés ne semblent pas suggérer qu'une sous-population des cellules Lin^+ ait des niveaux plus forts d'its1 et d'its2. De même, au sein du lignage B, les progéniteurs pré-B prolifèrent alors que les cellules B immatures de la moelle et les cellules B matures de la rate sont quiescentes, en absence d'activation antigénique ; les intensités d'its1 et its2 sont similaires entre ces populations. Ainsi, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le taux de prolifération des cellules et les niveaux d'its1 et its2. Ces résultats pourraient ainsi suggérer que la biogenèse des ribosomes est accrue dans les CSH et les progéniteurs immatures. Est-ce qu'une augmentation de la biogenèse des ribosomes pourrait être nécessaire dans les cellules immatures pour la génération de « stocks » de ribosomes transmis au cours des divisions successives ? Même si le nombre de divisions des différents progéniteurs n'est pas connu, il semble peu probable qu'une CSH, de petite taille, stocke un nombre de ribosomes suffisants pour l'ensemble de sa progénie. Ces questions méritent d'être posées, cependant, le manque d'informations sur la durée de vie des ribosomes dans ces cellules et sur le nombre de ribosomes dans les cellules des différentes populations du système hématopoïétique limite la réflexion. Par ailleurs, il est intéressant de se demander si des ribosomes inactifs pourraient être stockés dans certaines cellules, en attente des divisions cellulaires, ou en prévention de situations de stress. Si effectivement la biogenèse des ribosomes est augmentée dans les cellules immatures, la sonde 5'ets ne le reflète pas. Ceci pourrait être dû à la rapidité du premier clivage de la maturation de l'ARNr. Il faut cependant noter que cette approche expérimentale donne des informations sur la présence à un instant donné, et non sur la dynamique des différentes espèces immatures des ARNr. Alternativement à l'hypothèse d'une biogenèse des ribosomes augmentée dans les CSH et les progéniteurs immatures, on peut envisager que des changements qualitatifs modifient ce processus dans ces cellules : des modifications de la dynamique de la biogenèse des ribosomes en fonction des cellules, comme par exemple l'accumulation de certaines espèces, pourraient en partie expliquer ces différences. Enfin, nous avons noté avec étonnement des différences d'intensités entre les marquages avec les sondes its1 et its2. Plus précisément, le marquage avec la sonde its1 permet une ségrégation plus forte entre les progéniteurs immatures et les cellules différenciées. L'utilisation de la sonde

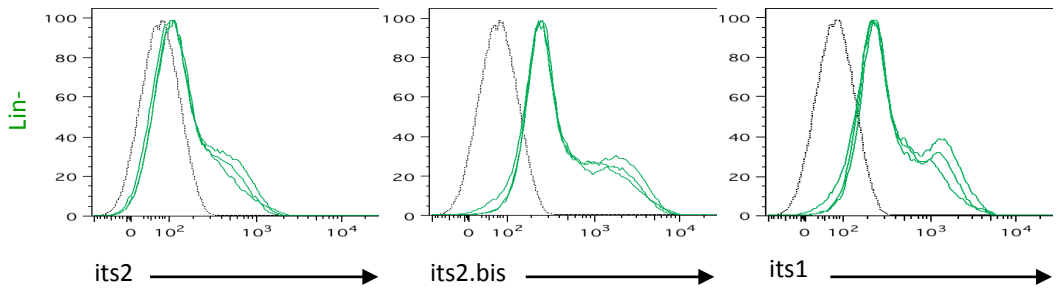


Figure 75. Comparaison des profils de FISH sur des cellules Lin⁻ avec 2 sondes its2 et la sonde its1

Dans une même expérience, des cellules Lin⁻ de souris contrôles ont été marquées avec une des deux sondes its2 ou la sonde its1. La courbe en pointillé noir révèle le niveau de détection pour une population de Lin⁻ non marquée.

its2.bis, une autre sonde dirigée contre une séquence voisine au sein de la région its2, donne des résultats qui sont plutôt similaires aux résultats obtenus avec la sonde its1, suggérant que la nature des sondes, plutôt que des différences entre les deux sous-unités, pourrait expliquer les différences de quantification (Figure 75). Les deux sondes dirigées contre its2 ne détectent pas exactement les mêmes espèces, et ont peut-être des accessibilités différentes aux ARNr (*cf.* Figure 73). Bien que cette variabilité ne soit pas complètement comprise aujourd'hui, cette deuxième sonde its2 permet néanmoins de confirmer les tendances observées, à savoir des intensités de marquage its2 plus fortes dans les CSH et les progéniteurs immatures (non montré). Des comparaisons avec d'autres sondes, dirigées contre différentes séquences, et éventuellement couplées à différents fluorochromes aideront à comprendre les sources de cette variabilité tout en confirmant nos données.

Ces résultats mettent en évidence des spécificités qualitatives ou quantitatives de la biogenèse des ribosomes dans les CSH et les progéniteurs immatures. Je souhaite confirmer ces données en utilisant l'approche complémentaire de la RT-qPCR sur des populations de cellules hématopoïétiques triées. Les localisations relatives des sondes de FISH et des amorces de RT-qPCR seront prises en compte pour l'interprétation des résultats.

Notons que le profil d'expression de *Nle* semble être corrélé avec les intensités des marquages its1 et its2 dans les cellules de la moelle osseuse (*cf.* Figure 1C de l'article). Il serait pertinent de mettre ces données en relation avec les profils d'expression d'autres protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes dans plusieurs populations hématopoïétiques.

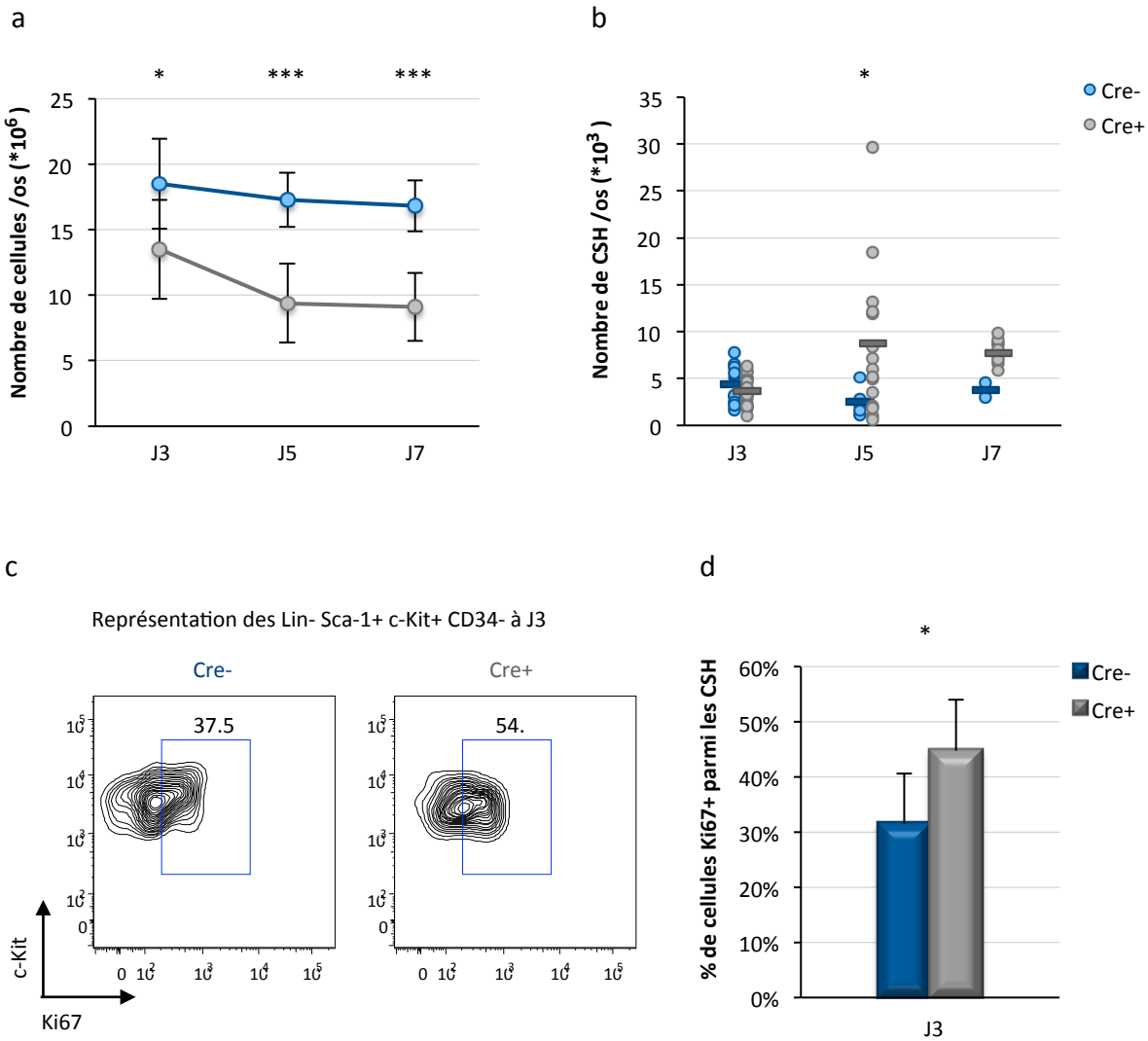


Figure 76. Toxicité de la recombinase Cre dans le système hématopoïétique

Des souris *Rosa26*$^{+/+}$ et des souris *Rosa26*$^{CreERT2/+}$, notées respectivement Cre- et Cre+, ont été traitées au tamoxifène 3 ou 5 jours consécutifs (75mg/kg) et sont analysées 3, 5 ou 7 jours après la première injection de tamoxifène. **a**. Cellularité de la moelle osseuse (n=3 pour Cre- à J7, n ≥ 10 sinon). **b**. Quantification des CSH avec les marqueurs Lin$^-$ Sca-1$^+$ c-Kit$^+$ CD34$^-$. **c-d**. Prolifération des CSH (Lin$^-$ Sca-1$^+$ c-Kit$^+$ CD34$^-$) à J3, les cellules sont marquées au Ki67, 3 expériences indépendantes ont été réalisées. **c**. Profil facs représentatif. **d**. Quantification des CSH Ki67$^+$ (n ≥ 8).

4. Toxicité de la recombinase Cre dans la lignage hématopoïétique : choix du contrôle

Afin d'appréhender la question du rôle de *Nle* chez la souris adulte, l'équipe avait choisi une approche conditionnelle ubiquitaire utilisant la lignée $Rosa26^{CreERT2}$. Les analyses préliminaires ayant suggéré que le système hématopoïétique était, entre autres, fortement affecté, Céline Souilhol, alors en thèse au laboratoire, avait envisagé d'étudier plus précisément le rôle de *Nle* dans le système hématopoïétique. A sa suite, j'ai étudié le phénotype hématopoïétique induit par la délétion ubiquitaire de *Nle*. Nous nous sommes demandés si le phénotype hématopoïétique observé dans cette souris pouvait être dû à des effets indirects liés à des défauts d'autres tissus, notamment de l'intestin, qui est fortement altéré. Une des forces du système hématopoïétique est la possibilité de le greffer relativement facilement, nous avons donc pu répondre à cette question. J'ai montré grâce à des approches de greffes que les défauts liés à la perte de *Nle* dans l'ensemble de la souris n'affectaient pas sensiblement un tissu hématopoïétique sauvage (*cf.* Figure 4A,C de l'article). Nous avons donc pensé qu'il était raisonnable d'utiliser la lignée $Rosa26^{CreERT2}$ pour l'étude du phénotype hématopoïétique. Nous avons alors réfléchi aux différents contrôles que nous pouvions utiliser pour comparer avec les animaux expérimentaux $Rosa26^{CreERT2/+}; Nle^{Flox/null}$ injectés au tamoxifène : des animaux du même génotype non injectés au tamoxifène, des animaux n'exprimant pas la Cre injectés au tamoxifène, des animaux exprimant la Cre injectés avec de l'huile, des animaux exprimant la Cre injectés au tamoxifène mais gardant un ou deux allèle(s) de *Nle* sauvage(s) ($Rosa26^{CreERT2/+}; Nle^{+/+}$, $Rosa26^{CreERT2/+}; Nle^{+/null}$ ou $Rosa26^{CreERT2/+}; Nle^{Flox/+}$). Des données dans la littérature suggéraient qu'activer la Cre pouvait être toxique pour les cellules (Loonstra et al., 2001). En particulier, une étude a analysé récemment les effets toxiques de la recombinase Cre dans le lignage hématopoïétique (Higashi et al., 2009). Les auteurs utilisent deux lignées $Rosa26^{CreERT2/+}$ indépendantes et traitent les souris au tamoxifène par gavage 5 jours consécutifs (175mg/kg). Ils observent de façon transitoire une atrophie du thymus, une hypocellularité de la moelle osseuse (diminution de 50%) ; plusieurs lignages sont atteints, les cellules immatures semblant être plus sensibles à la Cre. La lignée utilisée, le mode, la dose et la fréquence d'administration du tamoxifène, le moment de l'analyse sont autant de paramètres qui peuvent influencer la présence et l'intensité d'effets toxiques de la Cre (Uhmann et al., 2009). Connaissant ces données, j'ai souhaité évaluer les effets de l'induction de la Cre dans le lignage hématopoïétique avec un protocole similaire à celui utilisé pour l'analyse des souris expérimentales (Figure 68.e), et j'ai observé les variations de paramètres critiques pour l'étude du phénotype lié à la perte de fonction de *Nle*. J'ai comparé des souris $Rosa26^{+/+}$ et $Rosa26^{CreERT2/+}$, nommées ici Cre- et Cre+, injectées par voie intra-péritonéale avec du tamoxifène (75mg/kg) 3 ou 5 jours successivement, et analysées à différents points après le début du traitement. L'évaluation de la cellularité de la moelle osseuse révèle des effets toxiques de la Cre sur les cellules hématopoïétiques (Figure 76.a). Une

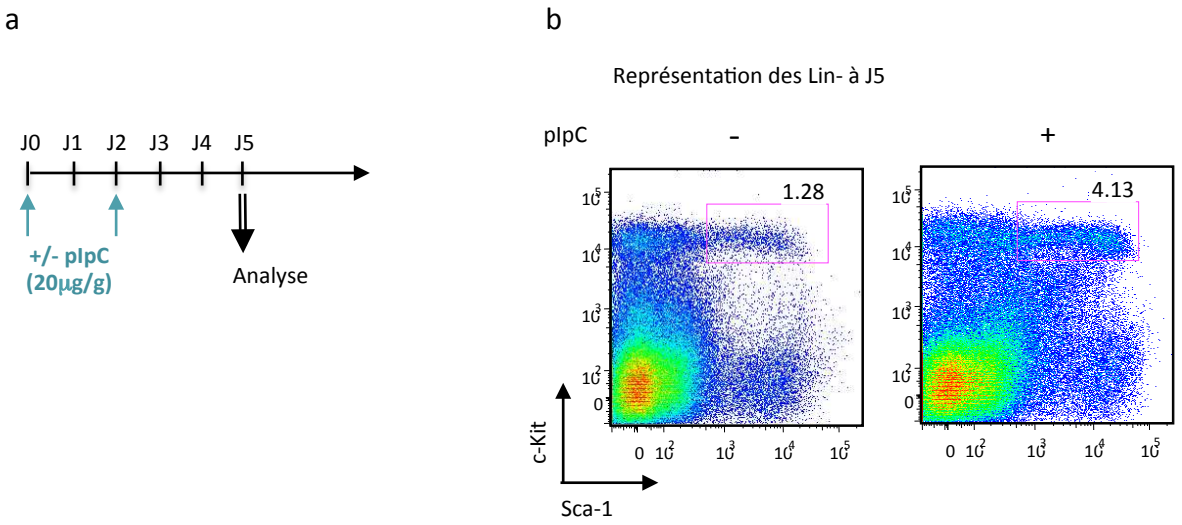


Figure 77. Toxicité du pIpC dans la moelle osseuse

a. Des souris sont traitées ou non au pIpC (20µg/g), à J0 et J3, et sont analysées à J5. **b**. Profil représentatif des cellules Lin^- (n=2).

diminution de 30% du nombre de cellules par os est observée dès 3 jours après l'induction de la Cre ; cette diminution atteint 45% à 5 et 7 jours. Le comptage des cellules Lin$^-$ Sca-1$^+$ c-Kit$^+$ CD34$^-$ révèle une augmentation d'un facteur 2 des CSH phénotypiques, 5 jours après l'induction de la Cre (Figure 76.b). Par ailleurs, j'ai analysé la quiescence des CSH suite à l'induction de la Cre dans des souris Cre- et Cre+ 3 jours après l'induction du traitement au tamoxifène. Le marquage au Ki67 caractérise les cellules en cycle (G1-S-G2/M). Alors que les CSH (Lin$^-$ Sca-1$^+$ c-Kit$^+$ CD34$^-$) des souris Cre- sont majoritairement quiescentes (30% de CSH Ki67$^+$), l'induction de la Cre induit une augmentation de la proportion des CSH Ki67$^+$ (Figure 76.c-d).

Les phénotypes hématopoïétiques sont généralement étudiés en utilisant une invalidation conditionnelle du gène d'intérêt spécifiquement dans le lignage hématopoïétique et le foie en utilisant la lignée Mx1-Cre (Kühn et al., 1995). Le promoteur Mx1 est activé suite à un traitement interféron, ou par l'administration de pIpC, ARN synthétique double-brin capable d'induire une réponse interféron. En parallèle de mon étude, je me suis demandée si des effets toxiques étaient également associés à ce système. J'ai réalisé une analyse du profil des LSK d'une souris traitée au pIpC (Figure 77). J'ai observé une désorganisation sévère du profil des cellules immatures suite au traitement au pIpC. Par ailleurs, deux études ont montré récemment que l'interféron α active les CSH dormantes *in vivo* (Essers et al., 2009; Sato et al., 2009). Ces études indiquent combien il est important de prendre en compte cet effet dans des études où la Cre, sous contrôle du promoteur Mx1, est activée suite à un traitement interféron. D'une part il est important de distinguer les effets liés à la délétion du gène d'intérêt des effets liés à la réponse interféron, et d'autre part, les études sur les CSH dormantes sont alors difficiles à envisager, puisque ces CSH entrent en prolifération au moment de la délétion du gène d'intérêt.

Ces quelques expériences et ces lectures m'ont fait prendre conscience des effets toxiques liés au système expérimental de délétion conditionnelle, qui ne sont pas toujours suffisamment pris en compte. De façon importante, les effets liés à l'activation de la Cre et au traitement interféron sont transitoires, ils affecteront moins les résultats si les analyses peuvent être retardées. Néanmoins, dans le cas de *Nle*, les souris déficientes pour *Nle* meurent en une douzaine de jours, restreignant les cinétiques d'analyse possibles. Il nous a alors paru indispensable d'utiliser une souris contrôle exprimant également la Cre, et traitée au tamoxifène, afin de ne pas attribuer les effets toxiques de la Cre à la délétion de *Nle*. Pour mon travail de thèse, j'ai donc comparé les souris $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$ avec des souris contrôles $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/+}$. La présence d'un allèle Nle^{Flox} dans ces contrôles nous a par ailleurs permis d'évaluer les efficacités de délétion dans notre système (*cf.* Figure S3 de l'article).

Par ailleurs, nous avons été confrontés à la toxicité de la Cre dans des expériences de différenciation *ex vivo* des CSH. Pour observer la délétion de *Nle* directement dans les CSH, j'ai trié et mis en culture des cellules Lin$^-$ Sca-1$^+$ c-Kit$^+$ Flt3$^-$ de souris contrôles et de souris expérimentales. L'induction de la Cre par l'ajout de 4-OHT a empêché systématiquement la culture, dans toutes les

conditions où la Cre était activée, mais pas dans des cultures de cellules n'exprimant pas la Cre. J'ai modifié plusieurs paramètres : les quantités initiales de CSH (de 200 à 1000 cellules/ puits de plaque 24), le nombre de jours de traitements au 4-OHT (1 ou 2), et la concentration du 4-OHT (de 0.15 à 1 μM). Aucune condition n'a été trouvée pour s'affranchir de la toxicité de la Cre dans ces expériences.

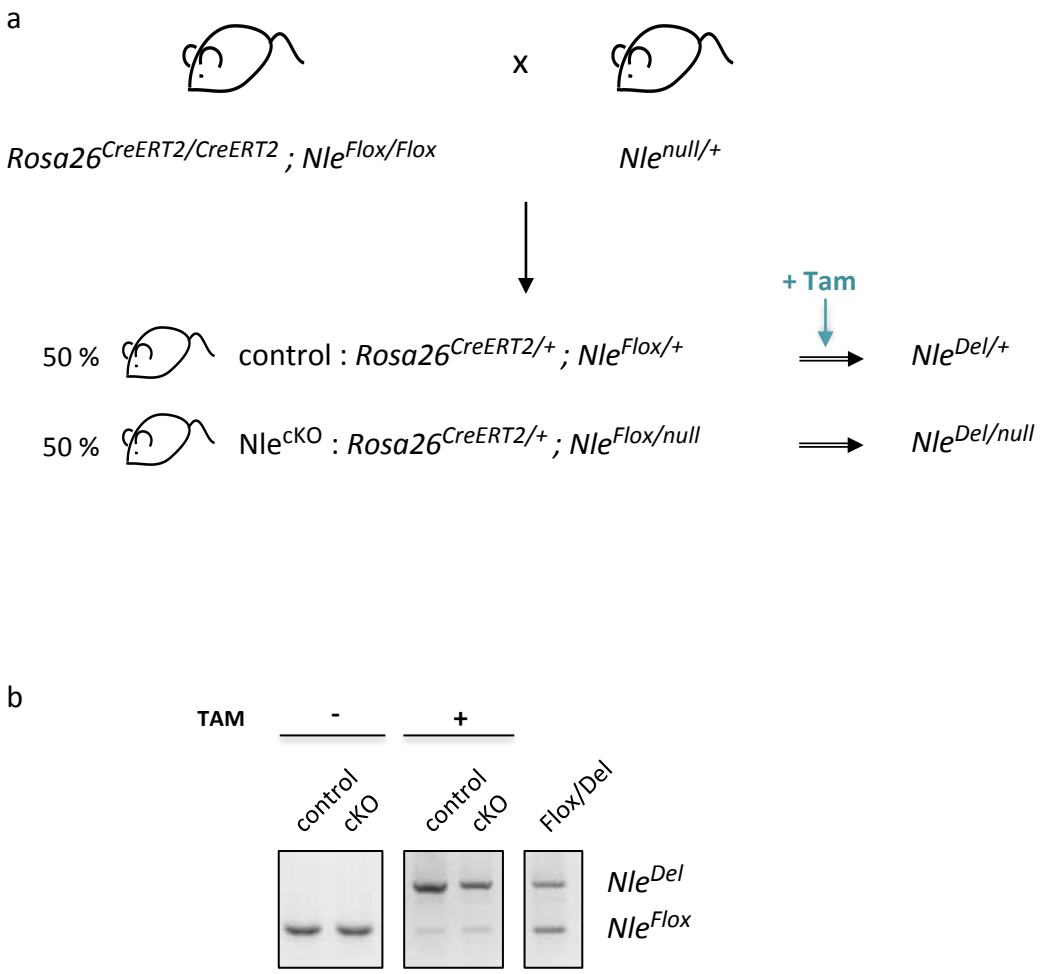


Figure 78. Approche expérimentale pour générer les souris d'intérêt

a. Croisements expérimentaux pour générer les animaux « control » et « cKO ». Le traitement au tamoxifène induit la recombinaison de l'allèle Nle^{Flox} en allèle Nle^{Del} chez les animaux « control » et dans les animaux « cKO ». Les animaux « control » possèdent encore un allèle Nle^{+} après injection de tamoxifène et ne présentent pas de phénotype évident. **b.** PCR réalisée sur de la moelle totale avant ou après injection de tamoxifène dans des souris « control » et « cKO ». Un ADN hétérozygote $Nle^{Flox/Del}$ est utilisé comme contrôle.

5. Article : une voie de biogenèse des ribosomes dépendante de *Nle*, spécifiquement requise pour le maintien des CSH

Une grande partie des résultats de mon travail de thèse est regroupée dans l'article présenté ici. A mon arrivée au laboratoire, j'ai poursuivi le travail commencé par Céline Souilhol sur l'étude du rôle de *Nle* dans le système hématopoïétique. Les expériences préliminaires suggéraient alors que *Nle* était important pour le maintien des CSH. J'ai notamment mis en place des croisements de souris permettant d'obtenir dans une même portée les animaux expérimentaux $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$ et les animaux contrôles $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/+}$ que nous avions choisis, suite à l'étude des perturbations du système hématopoïétique par l'activation de la CreERT2 (Figure 78). J'ai alors refait les analyses commencées par Céline avec ces nouveaux animaux. J'ai montré que l'inactivation ubiquitaire de *Nle* provoquait de graves défauts dans le système hématopoïétique, avec notamment la disparition des CSH et des progéniteurs. Suite à la délétion de *Nle*, j'ai observé que les CSH entraient en cycle, aucune augmentation de l'apoptose n'a été détectée, indiquant que *Nle* pourrait être requis pour le maintien de la quiescence, et pas directement pour la survie des CSH. Des transplantations de moelle osseuse déficiente pour *Nle* ont permis de conclure de façon convaincante que la délétion de *Nle* induisait la disparition de CSH fonctionnelles $Nle^{-/-}$. Des expériences de greffes réciproques et de greffes compétitives ont montré que la déplétion de la moelle osseuse et la perte des CSH étaient dues à des effets intrinsèques aux cellules hématopoïétiques, et que *Nle* était requis dans les CSH de façon autonome cellulaire. L'ensemble de ces données a permis de conclure que *Nle* est un régulateur important du maintien des CSH, à l'homéostasie et en situation de stress. Un petit nombre de facteurs particulièrement critiques pour le maintien des CSH a été identifié jusqu'à aujourd'hui (*APC*, *c-Myc/N-Myc*, *NKAP*, *Cited2*, *Mll*, *Mcl-1*, *Survivin*), nous proposons maintenant d'ajouter *Nle* à cette liste (Jude et al., 2007; Kranc et al., 2009; Laurenti et al., 2008; Leung et al., 2007; Opferman et al., 2005; Pajerowski et al., 2010; Qian et al., 2008). La délétion de *Nle* dans l'ensemble des cellules hématopoïétiques avec la lignée $Rosa26^{CreERT2}$ ne permettait pas d'appréhender le rôle de *Nle* dans des cellules différenciées. En effet, l'ensemble des lignages est atteint, en analysant les cinétiques de disparition des différentes populations, il est difficile d'estimer si les populations différenciées sont affectées directement par la perte de fonction de *Nle*, ou de façon indirecte suite à la disparition des CSH et des progéniteurs. Afin de documenter le rôle de *Nle* dans des cellules différenciées, j'ai utilisé la lignée de souris *CD19-Cre* pour induire la délétion de *Nle* constitutivement dans le lignage B (Rickert et al., 1997). J'ai ainsi montré que *Nle* n'était pas requis pour le développement, la survie, la prolifération et la différenciation des lymphocytes B.

Au vu des résultats connus chez la levure, nous avons voulu savoir si le rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes était conservé chez la souris. J'ai utilisé le modèle des cellules ES pour montrer qu'effectivement, *Nle* est requis pour la maturation et l'export de la grande sous-unité

ribosomique chez la souris. Certains résultats ont été présentés dans des sections précédentes, d'autres sont incorporés dans l'article. Les ribosomes sont nécessaires pour la traduction dans toutes les cellules de l'organisme. Il est alors surprenant de constater que les cellules B ne soient pas affectées par la délétion de *Nle*. Nous avons alors émis l'hypothèse que des voies alternatives de biogenèse des ribosomes indépendantes de *Nle* pourraient être utilisées dans les cellules B. Afin de tester cette hypothèse, j'ai cherché à visualiser d'éventuels défauts de biogenèse des ribosomes, et particulièrement des défauts d'export de la grande sous-unité ribosomique, en utilisant les approches de FISH quantifiées par cytométrie de flux. Ces expériences m'ont permis de corréler les défauts de biogenèse des ribosomes avec le phénotype induit par la délétion de *Nle* : ainsi la biogenèse des ribosomes est affectée dans les CSH et les progéniteurs, alors qu'elle ne semble pas l'être dans les progéniteurs et les cellules plus différenciées. Ce travail met ainsi en évidence des différences jusqu'ici insoupçonnées dans la biogenèse des ribosomes entre les cellules souches et les cellules différenciées du système hématopoïétique.

Notchless dependent ribosome synthesis is required for the maintenance of adult hematopoietic stem cells but is dispensable for committed progenitors

Marie Le Bouteiller[1, 2, 3], Céline Souilhol[1, 2, 3, 4], Sarah Beck-Cormier[1, 2, 5], Aline Stedman[1, 2], Odile Burlen-Defranoux[6], Sandrine Vandormael-Pournin[1, 2], Florence Bernex[7], Ana Cumano[6] & Michel Cohen-Tannoudji[1, 2]

1: Institut Pasteur, Unité de Génétique Fonctionnelle de la Souris, Département de Biologie du Développement, 25 rue du docteur Roux, F-75015 Paris, France
2: CNRS URA 2578, F-75015 Paris, France
3: These authors contributed equally to this work
4: present address: MRC Centre for Regenerative Medicine, University of Edinburgh, Edinburgh EH16 4UU, Scotland, UK.
5: present address: Osteo-Articular and Dental Tissue Engineering Laboratory LIOAD, Department of Periodontology, School of Dental Surgery, INSERM U791, Nantes, France.
6: Lymphocyte Development Unit, Institut Pasteur, Paris, France
7: UMR955 Génétique fonctionnelle et médicale, INRA, ENVA, Maisons-Alfort, F-94700, France.

Corresponding author: Michel Cohen-Tannoudji, Unité de Génétique Fonctionnelle de la Souris, Département de Biologie du Développement, 25 rue du docteur Roux, F-75015 Paris, France E-mail: m-cohen@pasteur.fr; Phone: 33 1 45 68 84 86; Fax: 33 1 45 68 86 34

Keywords: Hematopoietic Stem Cell; Ribosome biogenesis; rRNA maturation; Quiescence; Bone marrow failure; c-Kit; CreERT2; Rsa4; Notchless.

Conflicts of interest: The authors indicate no potential conflicts of interest.

Abbreviations: **Nle**: Notchless; **ES**: Embryonic Stem; **4-OHT**: 4-hydroxy-tamoxifen; **HSC**: Hematopoietic Stem Cell; **MPP**: Multipotent progenitor; **BM**: bone marrow; **PB**: peripheral blood.

Running Title : *Nle* is required for ribosome biogenesis in HSC

Abstract

Stem cells display properties in basal cellular processes that are inherently linked to their identity and function. Here, we identify *Notchless* (*Nle*) as a critical factor for adult Hematopoietic Stem Cells (HSC) maintenance under both homeostatic and stress conditions. *Nle*-deficiency leads to a rapid and drastic exhaustion of HSC and multipotent progenitors (MPP) and failure to maintain quiescence in HSC. In contrast, *Nle* is dispensable for cycling committed progenitors and differentiated cells. In yeast, *Nle* is essential for ribosome biogenesis and we show that its role in pre-60S subunit maturation has been conserved in the mouse. Despite its implication in this basal cellular process, *Nle* deletion affects ribosome biogenesis only in HSC and immature progenitors. Collectively, our findings establish an essential role for *Nle* in HSC/MPP function and uncover previously unsuspected differences in ribosome biogenesis that distinguish stem cells from committed progenitor populations.

Highlights

- *Nle* is critical for HSC function
- Requirement for *Nle* is distinct in HSC and committed progenitors
- *Nle* acts in pre-60S ribosomal subunit maturation in the mouse
- *Nle* is required for ribosome synthesis in HSC but not in cycling committed progenitors

Introduction

Hematopoiesis within the bone marrow (BM) is ensured by hematopoietic stem cells (HSC). This rare population is able to self-renew and to give rise to all mature blood cell types (Orkin and Zon, 2008). HSC are tightly regulated to maintain these properties, and numerous factors have been shown to regulate quiescence, self-renewal, survival and differentiation. The enormous functional demands and striking longevity of HSC raises the question whether they might be uniquely equipped to ensure their renewal. Recent studies have revealed that HSC may indeed differ from their differentiated progenies at the level of constitutive cellular processes such as response to DNA damage or the regulation of energy metabolism. For example, mouse HSC are less prone to DNA damage-induced apoptosis than committed progenitor populations (Mohrin et al., 2010). Control of reactive oxygen species levels is critical for BM homeostasis and it is specifically regulated in HSC by FoxO transcription factors (Tothova et al., 2007). Similarly, Lkb1, a master regulator of energy metabolism is specifically required for HSC maintenance, regulating their function independently of TORC1 (Gan et al., 2010; Gurumurthy et al., 2010; Nakada et al., 2010).

Ribosome assembly in eukaryotic cells is a highly complex and coordinated process, requiring more than 200 protein and RNA molecules (Fromont-Racine et al., 2003). Most of our knowledge of the ribosome biogenesis pathway comes from work performed in yeast and much less is known about ribosome construction in metazoans. Over the past years, a growing body of evidence suggests that ribosome heterogeneity may participate to spatiotemporal regulation of gene expression (reviewed in (Gilbert, 2011; Xue and Barna, 2012)). This raises the question of the mechanisms underlying the production of qualitatively different ribosomes and opens the possibility that ribosome assembly might follow different routes according to the cell type or environmental conditions. In human, defective ribosomal synthesis has been associated with BM failure syndromes and skeletal defects as well as predisposition to cancer (Ganapathi and Shimamura, 2008; Narla and Ebert, 2010). Why such a general cellular defect causes specific developmental and haematopoietic phenotypes in patients and the corresponding animal models is not fully understood. Differential sensitivity and cellular responses to ribosomal stress could explain some of these specificities (Danilova et al., 2011; Dutt et al., 2011).

Nle was originally identified in *Drosophila* during a genetic screen for modifiers of Notch activity although its mechanism of action has since remained elusive (Royet et al., 1998). NLE protein is an evolutionary conserved member of the large WD-repeat proteins family containing a predicted C-terminal β propeller consisting of 8 WD domains and an NH_2-terminal extension. The yeast NLE ortholog RSA4 acts in ribosome large subunit biogenesis (De la Cruz et al., 2005; Ulbrich et al., 2009). The NH_2-terminal domain of Rsa4 interacts with the Metal Ion Dependent Adhesion Site domain of the AAA-ATPase Rea1/Mdn1 and this interaction is essential for removal of pre-60S factors and progression of 60S biogenesis (Ulbrich et al., 2009). Indeed, yeast cells deficient for Rsa4 or expressing a mutated protein unable to interact with Rea1 displayed impaired rRNA processing, nuclear accumulation of pre-60S particles and reduction of mature 60S subunits (la Cruz et al., 2005; Ulbrich et al., 2009). Implication of *Nle* in ribosome biogenesis has not been directly addressed so far in other eukaryotes. Nonetheless, *Solanum chacoense* Nle and Mdn1 were found to interact in yeast two hybrid assay (Chantha and Matton, 2007) and similar phenotypes were obtained after knockdown of *Nle* and orthologs of yeast genes implicated in ribosome biogenesis in *Arabidopsis thaliana* and *Caenorhabditis elegans* (Voutev et al., 2006; Chantha et al., 2010). In the mouse, we previously reported that constitutive *Nle* loss of function results in early embryonic lethality and that *Nle* is mainly required in inner cell mass cells, being instrumental for their survival (Cormier et al., 2006).

Here, we uncover the critical role of *Nle* in mouse adult hematopoiesis using an inducible conditional mutagenesis strategy. Using non-competitive and competitive transplantations, we show that *Nle* is cell autonomously required for the maintenance of functional HSC both under homeostasis and cytopenic conditions. Upon *Nle* deletion, HSC entered the cell cycle, indicating that *Nle* is essential for maintaining HSC quiescent. In contrast, *Nle* is dispensable for cycling committed progenitors and differentiated cells. We also demonstrate that the role of *Nle* in ribosome biogenesis is conserved in the mouse and show that *Nle* deficiency affects ribosome biogenesis in HSC/MPP but not committed progenitors. Collectively, our findings establish an essential role for *Nle* in HSC/MPP function and uncover previously unsuspected differences in ribosome biogenesis between stem cells and committed progenitor populations within the same lineage.

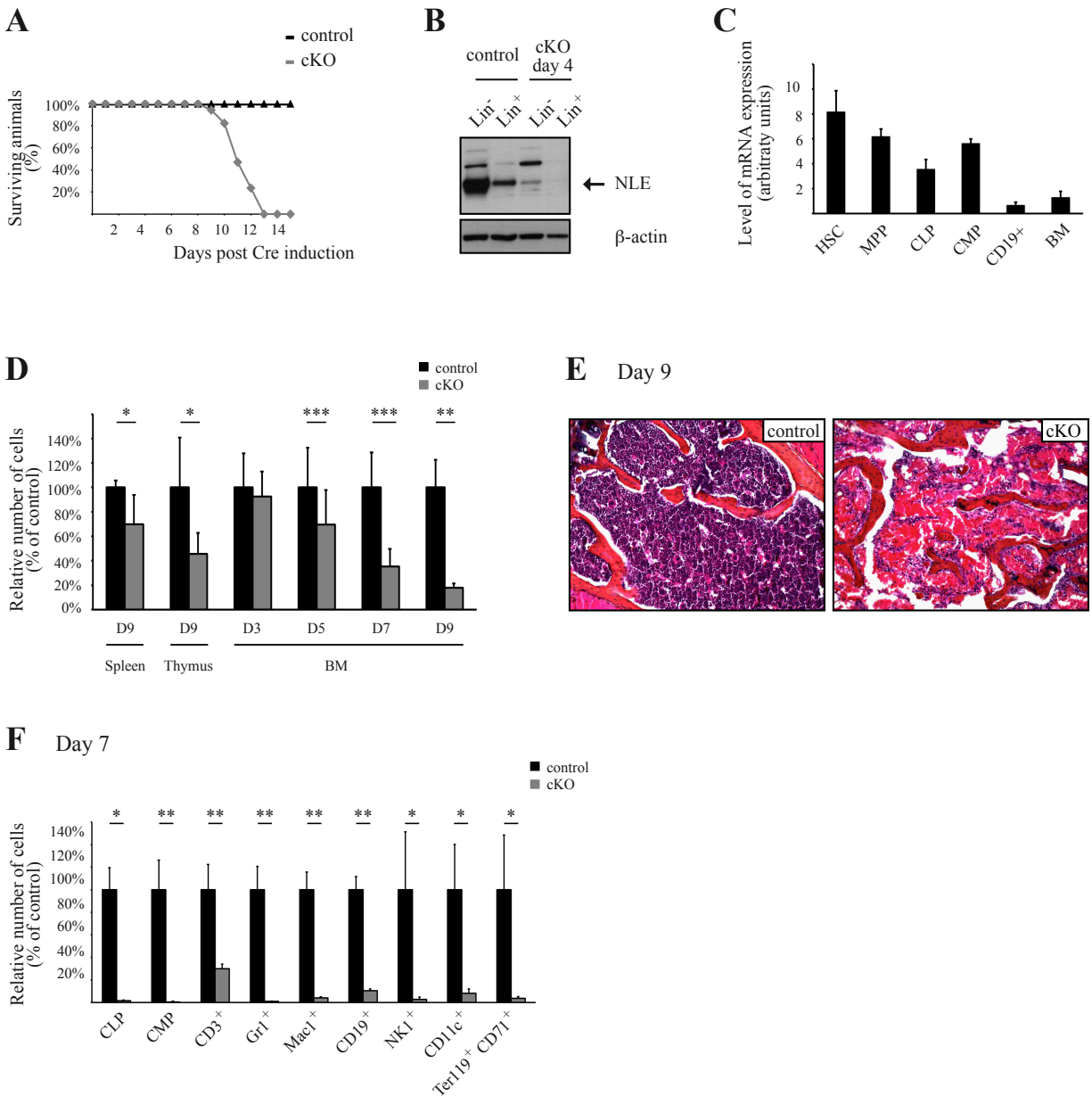


Figure 1. *Nle* inactivation induces rapid bone marrow failure

(A) Survival curve of Nle^{cKO} mice after Cre induction (n ≥ 13). (B) Western blot analysis of sorted Lin$^-$ and Lin$^+$ BM cells from control or Nle^{cKO} mouse 4 days after Cre induction. (C) RT-qPCR analysis of *Nle* mRNA expression levels in various sorted BM populations (n=3). (D) BM, spleen and thymus cellularity at different time points after Cre induction (n ≥ 5). (E) Hematoxylin-eosin staining of transversal sections of the femur from control and Nle^{cKO} mice 9 days after Cre induction. 10x magnification. (F) Count of various BM hematopoietic cell populations 7 days post Cre induction (n ≥ 4).

Results

Ubiquitous *Nle* inactivation induces bone marrow failure

To address *Nle* function in the adult, we generated a conditional allele of *Nle* (Figure S1) and performed acute conditional inactivation using the $Rosa26^{CreERT2}$ line (Hameyer et al., 2007). Control ($Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/+}$) and Nle^{cKO} ($Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$) littermates were injected five consecutive days with tamoxifen. Efficient conversion of Nle^{Flox} into Nle^{Del} allele was observed in all organs except brain. Noticeably, all Nle^{cKO} mice died within 10 to 13 days after the first injection (Figure 1A). Examination of Nle^{cKO} mice euthanized on day 7 to 9 revealed alterations of intestinal gut epithelium histology (not shown) and major defects in BM and secondary lymphoid organs (see below). This led us to analyze in more details the role of *Nle* in hematopoiesis.

First, we monitored *Nle* expression in hematopoietic cells by Western blot and real-time RT-PCR. NLE protein was detected in BM and spleen (Figure S3D). In the BM, lineage-negative (Lin^-) immature cells expressed higher levels of protein than lineage-positive (Lin^+) cells (Figure 1B). Lin^- cells were sorted into HSC (Lin^- Sca-1^+ c-Kit^+ $CD34^-$), multipotent progenitors (Lin^- Sca-1^+ c-Kit^+ $CD34^+$, MPP), common myeloid (Lin^- Sca-1^- c-Kit^+ $CD34^+$, CMP) and lymphoid (Lin^- Sca-1^{low} c-Kit^{low} Il7rα$^+$, CLP) progenitors (see the gating strategy on Figure S2). Higher *Nle* mRNA levels were found in HSC, MPP, CMP and CLP compared to $CD19^+$ B cells or total BM containing a majority of Lin^+ cells (Figure 1C). We then verified that in our experimental setting, *Nle* deletion was effective in the hematopoietic tissue. Control and Nle^{cKO} mice were injected with tamoxifen and PCR analysis was performed on BM and peripheral blood (PB) genomic DNA at various time points after Cre induction. Efficiency of recombination was estimated through comparison with samples containing different ratios of Nle^{Flox} and Nle^{Del} alleles (Figure S3A). After Cre induction, high deletion efficiency was detected in BM, thymic and splenic cells from control and Nle^{cKO} mice (Figure S3B-C). This was further confirmed by the dramatic decrease in NLE protein levels in Nle^{cKO} BM and spleen (Figure S3D). When hematopoietic cells from control mice were analyzed at later time points (up to 9 months), Nle^{Del}/Nle^{Flox} ratio remained constant (Figure S3C) indicating that *Nle* deletion mediated by the $Rosa26^{CreERT2}$ allele was effective in HSC.

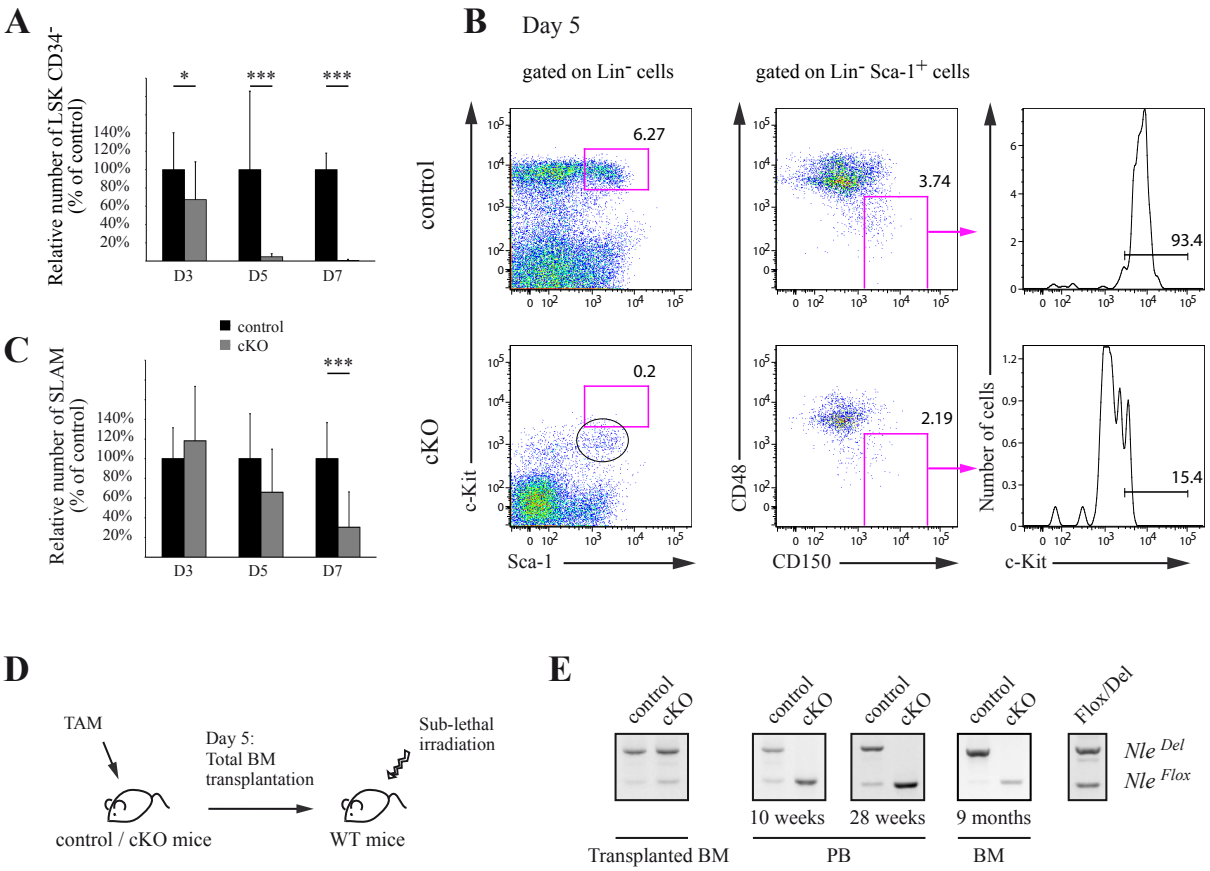


Figure 2. *Nle* deletion provokes HSC disappearance

(A) Count of LSK CD34- cells per hindlimb at different time points after Cre induction (n ≥ 13). (B) Representative FACS profile of BM cells from control or Nle^{cKO} mice at day 5. Cells were labeled with LSK (left) or SLAM (middle) markers. Nle^{cKO} SLAM cells express lower levels of c-Kit (right). (C) Count of SLAM cells per hindlimb at different time points after Cre induction (n ≥ 6). (D) Schematic representation of the transplantation strategy. Both control and Nle^{cKO} mice were injected five consecutive days before transplantation. (E) PCR analysis was performed on BM, at the time of transplantation and after 9 months, and on PB cells at 10 and 28 weeks after transplantation.

During the autopsy, we noticed a marked reduction in size of hematopoietic and lymphoid organs from Nle^{cKO} mice. At day 9, the numbers of cells in thymus, spleen and BM were strongly reduced (Figure 1D). In addition, hematoxylin and eosin staining of bone sections revealed severe hypocellularity in Nle^{cKO} BM showing capillaries saturated with erythrocytes (Figure 1E). Flow cytometry of Nle^{cKO} BM revealed that all hematopoietic lineages were severely affected (Figure 1F). These results show that *Nle* inactivation is critically required for hematopoiesis.

HSC are rapidly compromised following *Nle* inactivation

The observation that both lymphoid and myeloid lineages were affected upon *Nle* inactivation suggested that *Nle* may play a critical role in HSC and MPP. Flow cytometry analysis showed a rapid and dramatic decrease in the number of immature Lin^- $Sca\text{-}1^+$ c-Kit^+ (LSK) cells following *Nle* inactivation. Both HSC-enriched LSK $CD34^-$ and multipotent progenitors LSK $CD34^+$ cell populations were virtually undetectable as early as 5 days after the first tamoxifen treatment (Figure 2A; data not shown). We noticed on the Nle^{cKO} FACS profiles, a transitory Lin^- $Sca\text{-}1^+$ c-Kit^{low} cell population (see the cells within the black circle on Figure 2B) suggesting that, in the absence of *Nle,* HSC and MPP downregulate c-Kit expression at their surface. A similar situation was previously reported in 5-FU treated mice, where HSC activation following abrupt loss of hematopoietic mature cells and precursors is associated with low c-Kit expression at their membranes (Randall and Weissman, 1997). We therefore decided to reanalyzed HSC in Nle^{cKO} BM irrespectively of c-Kit expression, using the SLAM family receptors CD48 and CD150 (Kiel, 2005). Although less pronounced than for LSK $CD34^-$ cells, we observed a rapid decrease in the number of HSC-enriched Lin^- $Sca\text{-}1^+$ $CD150^+$ $CD48^-$ cells (SLAM) in Nle^{cKO} BM compared to control (Figure 2C). Strikingly, while a vast majority of control SLAM expressed high levels of c-Kit receptor at their surface, the proportion of c-Kit^{high} SLAM was drastically reduced in Nle^{cKO} 5 and 7 days after Cre induction (17% and 2% of controls, respectively). We also monitored Nle^{cKO} 5 days after Cre induction for the presence of Lin^- PB cells and did not find any signs of increase HSC mobilization (not shown). Altogether, these data show that phenotypic HSC are rapidly lost following *Nle* deficiency.

To address the possibility that functional HSC with a modified phenotype may nevertheless persist in Nle^{cKO} BM, we performed total BM transplantation experiments.

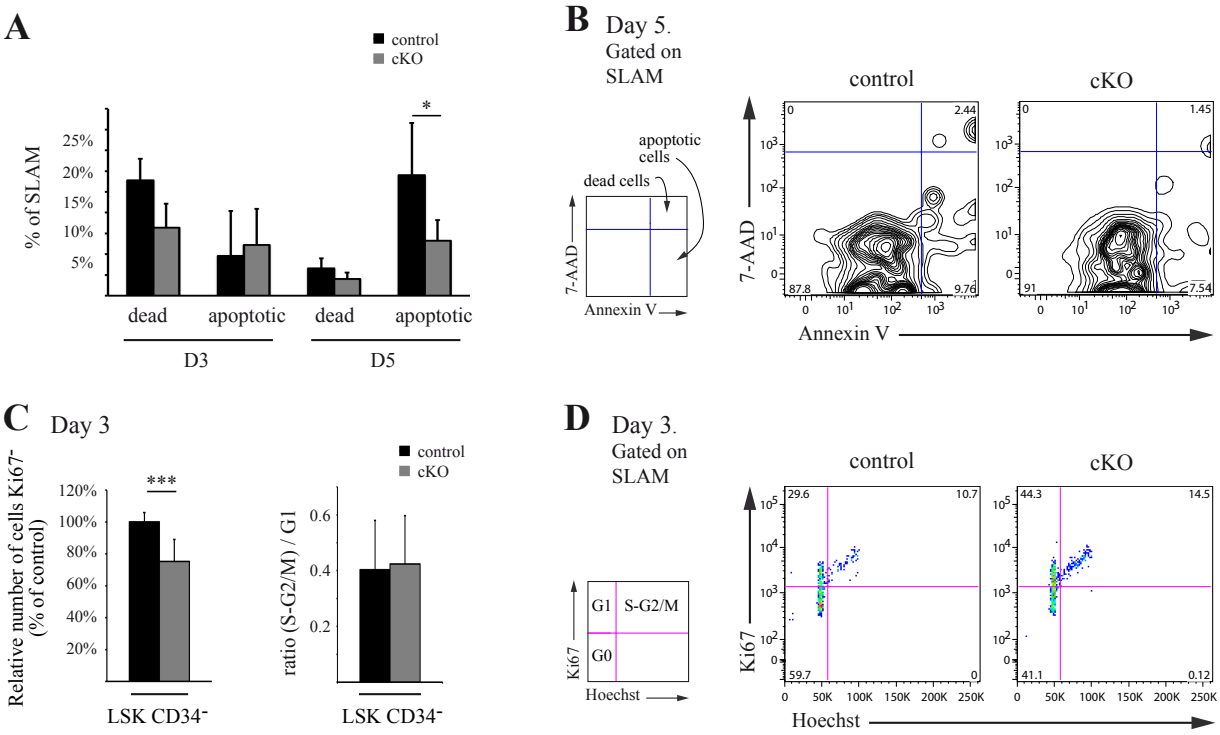


Figure 3. Normal survival and reduced quiescence of *Nle*-deficient HSC and progenitors

(A-B) SLAM cells were stained with AnnexinV/7AAD. Quantitative results for dead and apoptotic cells (A, n=3) and representative FACS profile (B) are shown. (C-D) BM cells were stained for Ki67 and Hoechst 3 days following Cre induction. The Ki67 levels in LSK CD34$^-$ is indicated (C, left panel, n ≥ 14), as well as the ratio (S-G2/M)/G1 amongst LSK CD34$^-$ cells (C, right panel, n=3). Representative FACS profiles are shown (D). Similar results were obtained independently for LSK CD34$^-$ and SLAM cells.

BM cells were recovered from control and Nle^{cKO} mice five days after Cre induction and transferred into sub-lethally irradiated mice (Figure 2D). By the time of transplantation, efficient deletion of the *Nle^{Flox}* allele was observed in both control and Nle^{cKO} donor cells (Figure 2E, first panel). In contrast to the control, *Nle^{Del}* allele could neither be detected in the blood of mice transplanted with Nle^{cKO} BM 10 and 28 weeks after engraftment, nor in the BM after 9 months (Figure 2E). This indicates that reconstituting activity of Nle^{cKO} BM was limited to *Nle*-proficient non-recombined cells. These data show that *Nle* function is critically required for HSC activity and function.

Reduced quiescence of *Nle*-deficient HSC and MPP

To determine the mechanisms by which *Nle* deletion induces stem and progenitor cell loss, we analyzed Nle^{cKO} BM cells shortly after Cre induction. Because *Nle* has previously been shown to play a role in cell survival (Cormier et al., 2006), we first examined whether increased cell death could be responsible for the rapid exhaustion of HSC and MPP in Nle^{cKO} mice. Using Annexin V/7AAD labeling, we analyzed freshly isolated Nle^{cKO} BM cells at day 3 and 5, when no or moderate defects in BM homeostasis was observed (Figure 1D, 2A-B). At either time points, no increase in the frequency of AnnexinV^{+}7AAD^{-} (apoptotic) or AnnexinV^{+}7AAD^{+} (dead) cells amongst total BM cells, SLAM and progenitors (LSK CD34^{+}, CLP and CMP at day 3 or Lin^{-} Sca-1^{+} CD150^{+} CD48^{+} at day 5) was detected (Figure 3A-B; data not shown). Similar results were obtained using TUNEL assay on control and Nle^{cKO} mice at day 4 (data not shown). Altogether, these data suggest that *Nle* is not primarily acting on HSC survival. We then examined the cell-cycle status of control and Nle^{cKO} BM cells using Ki67 and Hoeschst staining. Importantly, as early as 3 days after Cre induction, there was a significant decrease in the frequency of G_0 cells between control and Nle^{cKO} SLAM or LSK CD34^{-} and MPP (Figure 3C, left panel, 3D; data not shown). In all populations, cycling Ki67+ cells were identically distributed amongst G1 and S-G2/M between control and Nle^{cKO} mice (Figure 3C, right panel and data not shown) indicating that *Nle*-deficient BM cells were not affected in their cycling capabilities. Altogether, these data indicate that *Nle* regulates quiescence in immature hematopoietic cells.

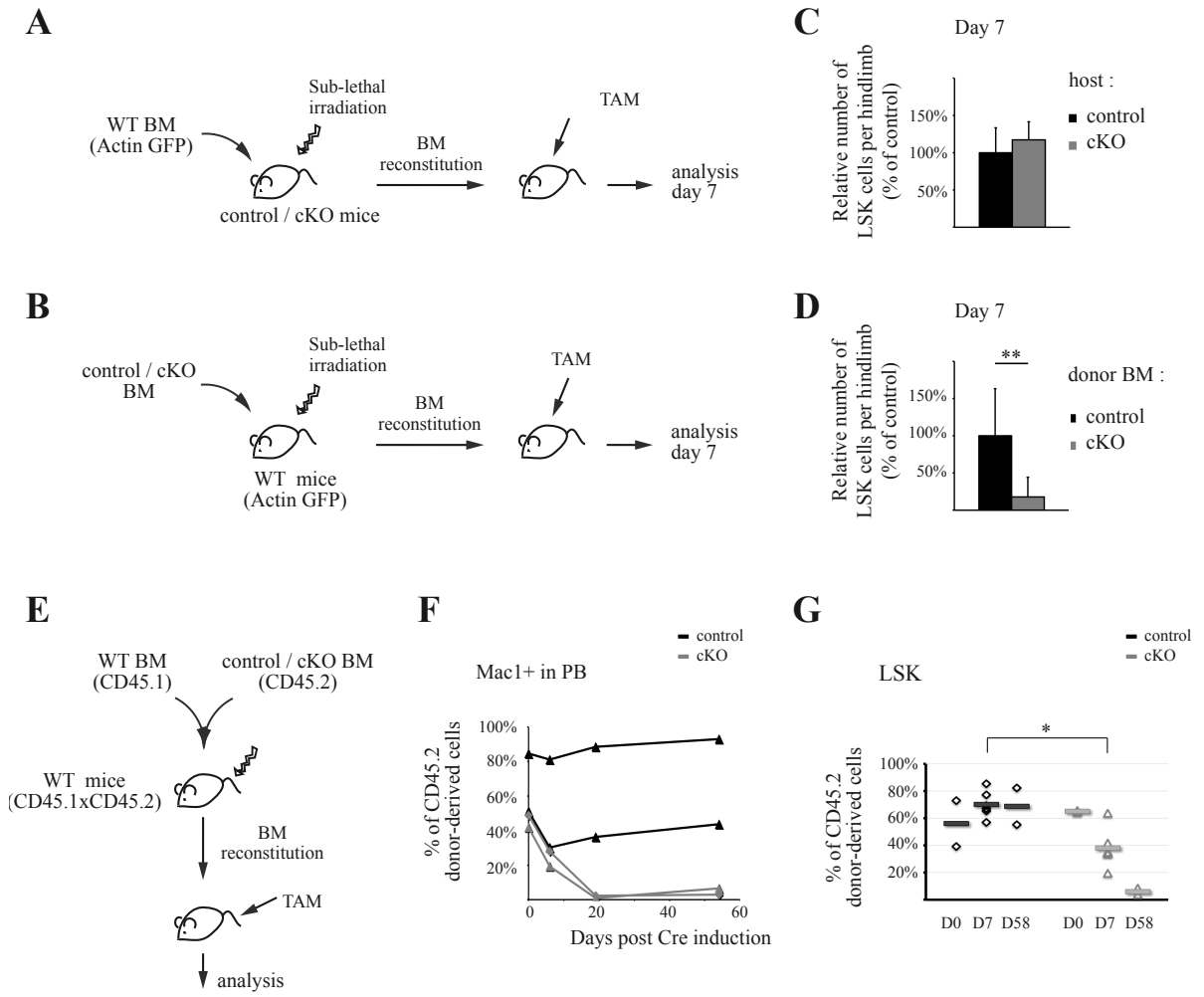


Figure 4. *Nle* acts in a cell autonomous manner to maintain hematopoiesis

(A-B) Schematic representation of the non competitive transplantation strategy. Wild-type BM was transplanted into irradiated control or Nle^{cKO} mice (A) and conversely (B). After two months, mice were treated with tamoxifen for 5 days. 7 days after the first injection, the number of LSK cells in the BM of grafted mice was measured (C-D, n ≥ 8). (E) Scheme of the competitive transplantation experiment. Wild type CD45.1xCD45.2 mice were irradiated and engrafted with a mix of CD45.2 control or Nle^{cKO} and CD45.1 wild-type BM cells (ratio 1:3). After 2 months, mice were injected with tamoxifen. (F) The percentage of CD45.2 donor-derived cells amongst Mac1-positive PB cells was measured at different time points. One mice transplanted with control donor cells displayed higher reconstitution level. (G) The percentage of CD45.2 donor-derived cells amongst LSK population was measured before (n=2), 7 (n=6) or 58 (n=2) days after Cre induction. Individual measures and means (dashes) are shown.

Nle acts in a cell autonomous manner to maintain hematopoiesis

In Nle^{cKO} mice, systemic *Nle* inactivation might contribute to BM failure. To examine this possibility, we performed non-competitive transplantation between wild type GFP and untreated control or Nle^{cKO} mice (see scheme Figure 4A-B). Two months after grafting, efficiently reconstituted (>80%) mice were injected with tamoxifen and their BM were analyzed after seven days. The number of wild-type LSK cells was not modified in a *Nle*-deficient environment compared to control (Figure 4C). In contrast, wild-type mice reconstituted with Nle^{cKO} BM exhibited a reduced number of LSK cells. This supports the notion that loss of HSC and progenitors was caused by *Nle* loss of function in BM cells. Death of Nle^{cKO} mice reconstituted with wild-type BM after tamoxifen injection indicates that *Nle* function is also required in non-hematopoietic tissues for mice survival (Figure S4).

To address whether *Nle* also acts in a cell-autonomous manner in hematopoietic cells under homeostatic condition, we adopted a competitive chimeras approach. Either control or Nle^{cKO} CD45.2 donor BM cells were transplanted with an excess (1:3 ratio) of competitor wild-type CD45.1 BM cells into irradiated (CD45.1×CD45.2)F1 recipient mice (Figure 4E). In such chimeras, hematopoiesis can be sustained by competitor cells, therefore preventing secondary effects due to the severe BM cytopenia that occurs both in Nle^{cKO} mice and non-competitive chimeras. After reconstitution, mice were injected with tamoxifen and PB and BM cells were analyzed at various time points. We verified that efficient deletion of *Nle^{Flox}* allele was obtained in chimeric mice (Figure S5A). In PB, Nle^{cKO} CD45.2 Mac1^{+} myeloid cells were no longer detected from 20 days after injection onwards (Figure 4F). Long-lived CD3^{+} T and CD19^{+} B lymphoid cells were also affected although with a delayed kinetics (Figure S5B). In agreement with these data, Nle^{cKO} CD45.2 cells rapidly disappeared in the BM. However, no differences in BM cellularity were observed between mice engrafted with Nle^{cKO} and control cells (Figure S5C). Indeed, one week after Cre induction, a significant decrease in Nle^{cKO} CD45.2 LSK cells was observed (Figure 4G). After 2 months and contrary to control CD45.2 cells, virtually no Nle^{cKO} CD45.2 cells were detected in BM and within the LSK compartment (Figure 4G; data not shown), indicating that *Nle*-deficient HSC were not maintained even in a wild-type microenvironment and during homeostasis. Altogether, our data show that *Nle* is cell autonomously required for the maintenance of functional HSC both under

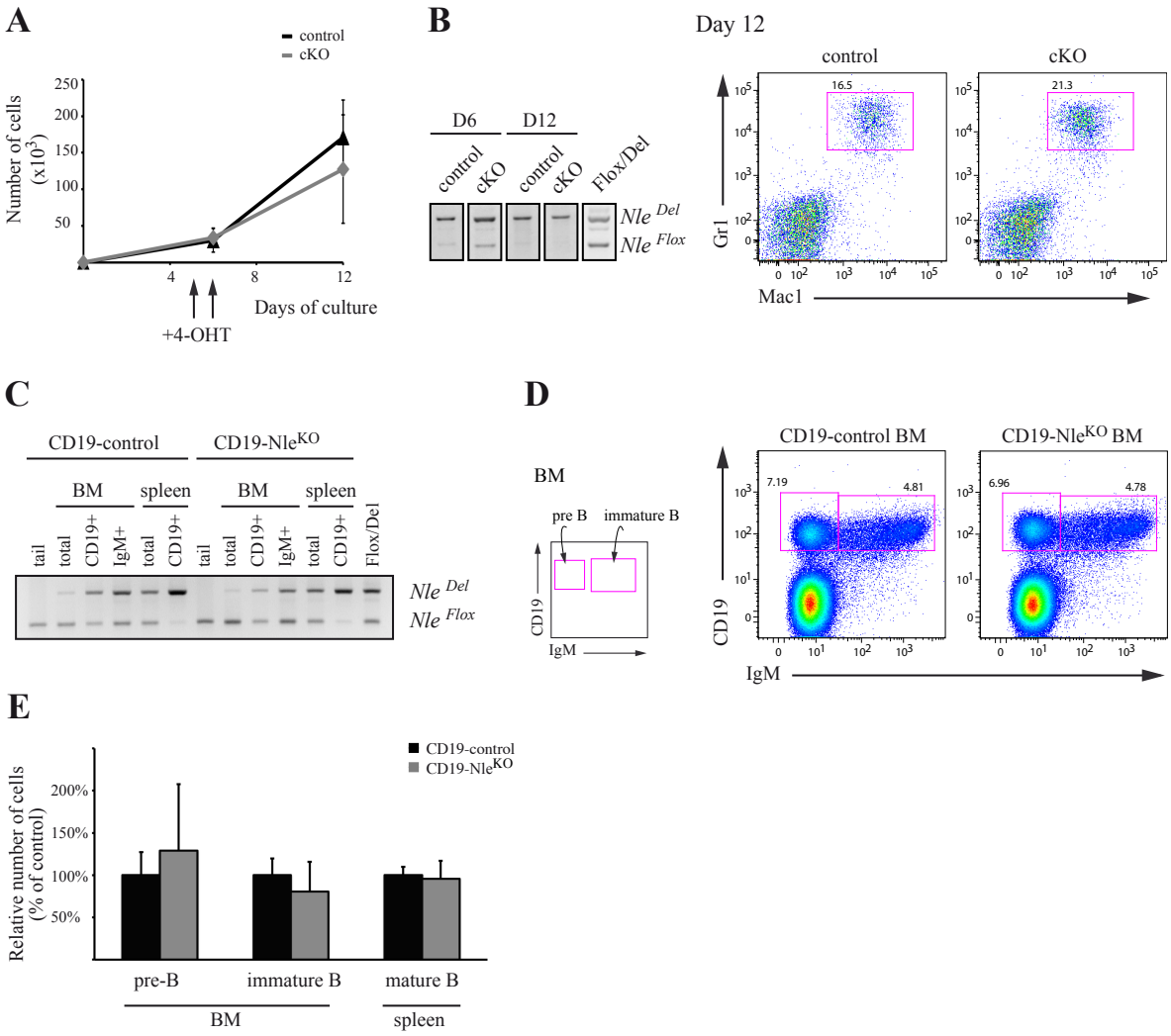


Figure 5. *Nle* is dispensable during myeloid and B cells differentiation

(A-B) 200 sorted LSK Flt3$^-$ cells per well were plated onto OP9 cells. After 5 days, 4-OHT was added to the culture medium. (A) Proliferation curves (n≥ 4). (B) At day 12, deletion was evaluated by PCR and myeloid differentiation was assessed by flow cytometry after staining with Mac1 and Gr1 markers. (C-E) Analysis of CD19-control and CD19-Nle^{KO} mice. (C) PCR analysis on IgM$^+$ and CD19$^+$ cells sorted from BM and spleen. Data are representative of 3 individuals. (D) FACS profile of CD19-control and CD19-Nle^{KO} BM, stained with IgM and CD19 markers. (E) Counts of pre-B cells (CD19$^+$ IgM$^-$), immature B cells (CD19$^+$ IgM$^+$) from BM and mature B cells (CD19$^+$ IgM$^+$) from spleen of CD19-control and CD19-Nle^{KO} mice (n≥ 4).

homeostasis (competitive chimeras) and cytopenic conditions (Nle^{cKO} and non-competitive chimeras).

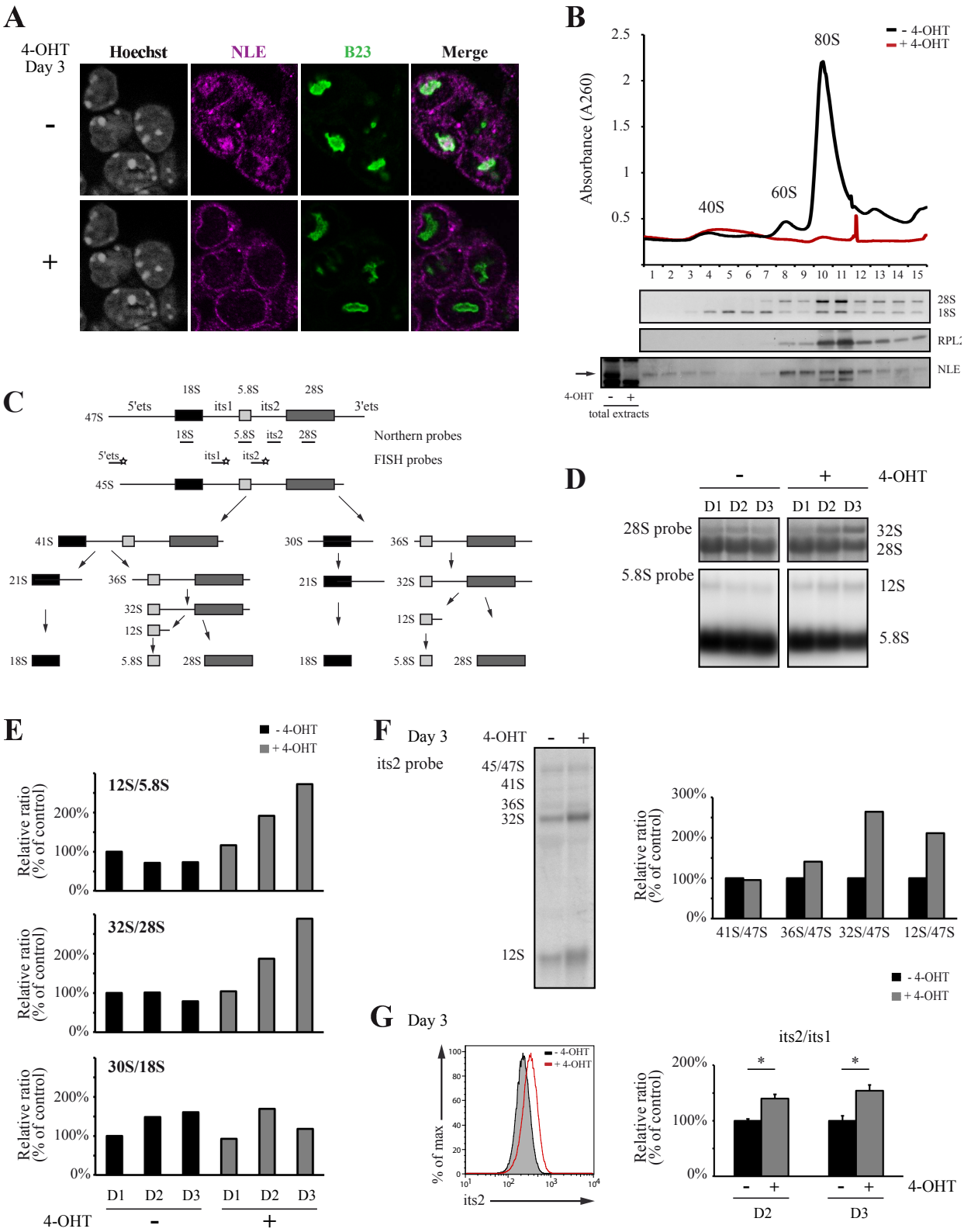
Nle is dispensable for more committed progenitors

Since hematopoietic cells are continuously and actively fueled by the HSC/MPP compartment, the rapid exhaustion of HSC and immature progenitors in Nle^{cKO} mice could preclude the detection of a more direct role of *Nle* in committed progenitors and differentiated cells. To examine this possibility, we first used an ex vivo differentiation assay. Control and Nle^{cKO} HSC-enriched (Lin^- $Sca\text{-}1^+$ $c\text{-}Kit^+$ $Flt3^-$) cells were FACS-sorted and plated on OP9 stromal cells. After 5 days of culture, immature LSK cells were no longer detected (not shown) and a pulse of 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT) was added to the culture medium to induce loss of *Nle* function in progenitor cells. During the following days, both control and *Nle*-deficient cells underwent massive expansion (Figure 5A). Cells were harvested after a total of 12 days in culture and analyzed for differentiation markers. Under the conditions used, differentiation was biased towards myeloid lineage but control and Nle^{cKO} cells were undistinguishable in their ability to give rise to $Mac1^+Gr1^+$ granulocytes (Figure 5B) suggesting that myeloid progenitors were able to actively proliferate and differentiate in the absence of *Nle*.

We also evaluated the role of *Nle* in vivo during B cell development using the *CD19-Cre* mouse line (Rickert et al., 1997). We generated $CD19^{Cre/+}$ $Nle^{Flox/+}$ and $CD19^{Cre/+}$ $Nle^{Flox/null}$ mice, named respectively CD19-control and CD19-Nle^{KO} mice. As already observed for other flox alleles, $CD19^{Cre}$-mediated *Nle* inactivation was an on-going process along B cell maturation (Figure 5C). Comparison of CD19-control and CD19-Nle^{KO} mice revealed no significant differences in the deletion efficiency of Nle^{Flox} allele and in the numbers of BM pre-B cells, immature B cells and splenic mature B cells (Figure 5C-E). Moreover, CD19-Nle^{KO} B cells were able to secrete seric IgM (data not shown) indicating that *Nle*-deficient mature B cells were not functionally impaired. Altogether, these data strongly suggest that contrary to HSC and MPP, *Nle* is dispensable for survival, proliferation and maturation of more committed progenitors.

NLE is required for large ribosomal subunit biogenesis

In yeast, NLE ortholog RSA4 acts as a pre-60S maturation factor, being essential for progression of ribosomal large subunit biogenesis and nuclear export (la Cruz et al.,


A
4-OHT
Day 3
Hoechst
NLE
B23
Merge
-
+
B
Absorbance (A260)
80S
60S
40S
- 4-OHT
+ 4-OHT
28S
18S
RPL1
NLE
4-OHT
total extracts
C
47S
5'ets
18S
its1
5.8S
its2
28S
3'ets
Northern probes
FISH probes
45S
41S
30S
36S
21S
32S
12S
D
28S probe
5.8S probe
D1 D2 D3
32S
28S
12S
5.8S
E
12S/5.8S
32S/28S
30S/18S
Relative ratio (% of control)
D1 D2 D3 D1 D2 D3
4-OHT
F
Day 3
its2 probe
45/47S
41S
36S
32S
12S
41S/47S
36S/47S
32S/47S
12S/47S
G
Day 3
% of max
its2
its2/its1

2005; Ulbrich et al., 2009; Baßler et al., 2010). Based on its high degree of conservation amongst eukaryotes (Cormier et al., 2006; Gazave et al., 2009), we hypothesized that NLE might also participate in pre-60S maturation in mouse cells. To address this possibility, we took advantage of *Rosa26*$^{CreERT2/+}$; *Nle*$^{Flox/null}$ embryonic stem (ES) cells, in which *Nle* loss of function can be induced by addition of 4-OHT in the culture medium (Figure S6A-B). In ES cells, NLE localized to the nucleolus as evidenced by the specific nucleolar immunostaining that partially colocalized with B23/nucleophosmin and was undetectable following 4-OHT treatment (Figure 6A). To investigate the involvement of *Nle* in ribosome biogenesis, total cellular extracts from treated and untreated ES cells were fractionated on a sucrose gradient. As illustrated on Figure 6B, the sedimentation profile was modified in *Nle*-deficient ES cells with a dramatic decrease in the amount of 60S subunit and 80S ribosomes. Immunoblot of wild-type ES cells fractions indicated that NLE sedimented in fractions covering 60S and 80S peaks consistent with a role in pre-60S maturation (Figure 6B).

In yeast, *Rsa4*-deficiency has been shown to interfere with pre-60S nuclear export. We thus expected to observe a similar phenotype leading to accumulation of 5.8S and 28S rRNA precursors and decrease of the corresponding mature rRNA species in *Nle*-deficient ES cells (Figure S6C). We monitored the levels of different rRNA species in control and mutant ES cells by Northern blot analysis (Figure 6C-F). Total RNA recovered from the same number of treated and untreated cells was probed with sequences specific for 5.8S, 18S, 28S and its2 (Figure 6C). We observed a progressive reduction in the steady state levels of 5.8S and 28S mature rRNA concomitantly with the accumulation of 12S and 32S rRNA precursors in mutant cells (Figure 6D-F). In contrast,

Figure 6. *Nle* is involved in ribosome biogenesis in mouse ES cells

(A) Immunostaining of NLE and B23 in *Rosa26*$^{CreERT2/+}$; *Nle*$^{Flox/null}$ ES cells treated or not with 4-OHT. (B) RNA profiles measured by absorbance at 260 nm in a sucrose gradient loaded with extracts from untreated and treated cells. In each fraction of untreated cells, 28S and 18S rRNAs, NLE and Rpl24 protein levels were assessed by ethidium bromide staining and immunoblotting respectively. (C) Schematic representation of the two major pre-rRNA processing pathways in mammalian cells. Localization of probes is indicated under the 47S primary transcript. (D-F) Northern blot analysis of total RNA from ES cells. Quantification of 12S/5.8S, 32S/28S and 30S/18S (E) and 41S/47S, 36S/47S, 32S/47S and 12S/47S (F) intensity ratio relative to untreated cells is shown. (G) Representative FACS profiles of its1 and its2 FISH signal in untreated and treated ES cells. Quantification of the its2/its1 intensity ratio relative to untreated cells is shown (n=3).

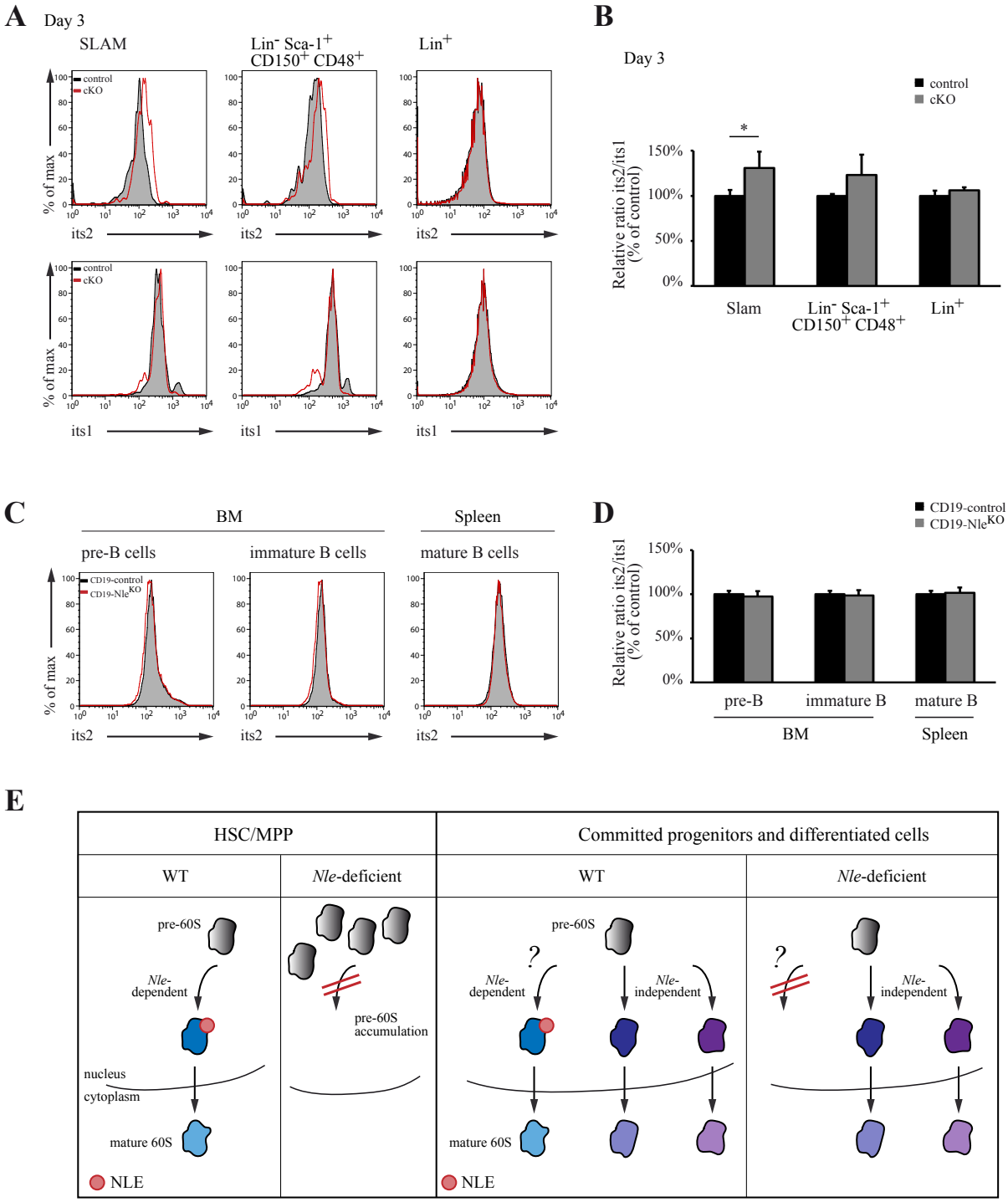


Figure 7. *Nle* is required for pre-60S export in HSC/MPP but not in B cells

(A) Representative histograms for its2 and its1 labeling in SLAM (left panel), Lin- Sca-1+ CD150+ CD48+ (middle panel) and Lin+ cells (right panel), at day 3 post Cre induction. (B) Quantification of its2/its1 intensity ratio in these populations (n=3). (C) Representative histograms for its2 labeling for BM pre-B and mature B cells and splenic B cells. (D) Quantification of its2/its1 intensity ratio in these populations (n=3). (E) Model for the role of *Nle* in hematopoietic cells.

processing of 18S rRNAs was not affected (Figure 6E). Analysis of the intensity profiles obtained with the its2 probe, recognizing 47S, 45S, 36S, 32S and 12S precursors, confirmed that late steps of 5.8S and 28S maturation were affected by *Nle*-deficiency although the initial steps of rRNA maturation were not (Figure 6F). We confirmed these observations by RNA FISH using 5'ets, its1 and its2 probes recognizing various combinations of nucleolar rRNA species (Figure 6C and S6D). By flow cytometry, we measured an increase of the its2/its1 ratio, indicating a specific accumulation of rRNA precursors of the large subunit (Figure 6G). Importantly, its2 levels were not affected following 4-OHT treatment of control ES cells (Figure S6E) demonstrating that the accumulation of immature rRNA precursors is caused by *Nle* loss of function. Altogether, these data demonstrate that *Nle* is required in mouse ES cells for the maturation and the export of the large ribosomal subunit.

Nle deletion affects ribosome biogenesis specifically in HSC and immature progenitors

Having established the role of *Nle* in ES cells, we next wondered whether defects in ribosome biogenesis could be responsible for the BM phenotype observed in Nle^{cKO} mice. We combined cell surface antibody staining with intracellular RNA FISH and used flow cytometry to measured steady-state levels of rRNA precursors in several BM cell populations. We first checked that as in ES cells, RNA FISH with its2 probes labeled subnuclear structures, poor in chromatin, likely to correspond to nucleoli in immature cells and B cells (Figure S7A). Three days after Cre induction, we measured a shift in its2 intensity in *Nle*-deficient SLAM, Lin-Sca-$1^+$$CD150^+$$CD48^+$ immature progenitors but not in more committed Lin^+ cells (Figure 7A). Importantly, neither its1 nor 5'ets levels were modified in stem cells and immature progenitors pointing to defective large ribosomal subunit maturation in HSC/MPP (Figure 7A, B; data not shown). Five days after Cre induction, a similar situation was observed (Figure S7B). We performed similar analysis on B cell lineage populations from CD19-control and CD19-Nle^{KO} mice. Consistent with the lack of a phenotype in CD19-Nle^{KO} mice, no changes in the level of its2, its1 or 5'ets were observed in BM and spleen B cells (Figure 7C-D; data not shown). We thus conclude from these experiments that *Nle* is differentially required for 60S ribosomal subunit biogenesis between HSC/MPP and more committed or differentiated hematopoietic cells.

Discussion

In this study, we show that *Nle* is critically required for the maintenance of adult HSC. Collectively, our data demonstrate that *Nle* is an intrinsic regulator, acting in a cell autonomous manner and necessary for HSC self-renewal. By demonstrating that *Nle* function in the pre-60S ribosomal subunit maturation has been conserved during evolution, we underscore the importance of ribosome biogenesis as a critical pathway for HSC maintenance. In contrast, *Nle* function is dispensable in committed progenitors and differentiated hematopoietic cells indicating that ribosome biogenesis is differentially regulated during differentiation.

Nle is a key regulator of HSC maintenance

Strikingly, *Nle*-deficient cells were rapidly eliminated from the HSC population. While several factors have been shown to participate in HSC regulation, rapid loss of HSC pool has been reported after the disruption of only a few genes: *N-Myc/c-Myc, NKAP, Cited2, Mll, Survivin, Mcl-1* or *APC* (Opferman et al., 2005; Jude et al., 2007; Leung et al., 2007; Laurenti et al., 2008; Qian et al., 2008; Kranc et al., 2009; Pajerowski et al., 2010). Of note, one of the primordial function of *Myc* is the regulation of ribosome biogenesis (van Riggelen et al., 2010; Ji et al., 2011). Combined deficiency of *c-Myc* and *N-Myc* has been shown to severely impair HSC function and, interestingly, downregulation of 31 ribosomal proteins coding genes has been reported in mutant HSC (Laurenti et al., 2008). However, contribution of defective ribosome biogenesis to the phenotype of *c-Myc /N-Myc* double deficient HSC has not been investigated.

Concomitantly with HSC loss, we observed the downregulation of c-Kit expression at the cell surface of Nle^{cKO} immature hematopoietic cells. c-Kit is a major regulator of HSC survival and proliferation and its downregulation may therefore participate to defective maintenance of Nle^{cKO} HSC. In *Gfi1*$^{-/-}$ mice, a slight decrease of c-Kit in LSK cells correlates with progressive loss of HSC self-renewal activity (Hock et al., 2004). Reduced c-Kit expression might also reflect HSC activation consecutive to BM depletion (Randall and Weissman, 1997; Laurenti et al., 2008). How c-Kit expression is regulated in HSC is not fully understood. Recently, the Shp2 tyrosine phosphatase was shown to promote *Kit* gene expression and HSC pool maintenance through a positive Kit-Shp2-Kit feedback

loop (Zhu et al., 2011). Future work will be necessary to understand the mechanisms underlying c-Kit downregulation in *Nle*-deficient HSC.

Nle acts in ribosome biogenesis and is likely not a direct regulator of Notch

Based on genetic study in Drosophila, *Nle* has been proposed to code for a modulator of Notch signalling. Absence of canonical Notch signalling does not impact on HSC maintenance at homeostasis (Maillard et al., 2008). Conversely, sustained Notch activity promotes HSC expansion ex vivo and enhanced self-renewal of hematopoietic progenitors. Thus, modulation of Notch signalling cannot simply account for the failure of *Nle*-deficient HSC/MPP. Contrary to genes coding for key components of the Notch pathway that are specific to metazoans, *Nle* is an ancient eukaryotic gene (Gazave et al., 2009) and its ancestral function as a ribosome biogenesis factor has been deciphered in yeast (De la Cruz et al., 2005; Ulbrich et al., 2009). Here, we show that *Nle* function has been conserved during evolution. Although we cannot formally exclude the possibility that NLE has acquired additional non-ribosomal functions during evolution, it seems more likely that Notch activity modulation by NLE is related to its role in ribosome biogenesis. Genetic interactions between Notch and Minute mutations, which affect a class of ribosomal genes, have been reported very long time ago. More recently, genetic screens for modifiers of Notch activity have identified several ribosomal proteins (Hall et al., 2004; Mourikis et al., 2010). In particular genetic and cellular contexts, Notch signalling activity must therefore be sensitive to variations in ribosome supply as previously discussed for the Hedgehog signalling pathway (Nybakken et al., 2005).

Mechanisms responsible for the rapid exhaustion of HSC/MPP and BM failure

Using a cellular system, we showed that *Nle* loss of function induced defective pre-60S subunit maturation and export leading to the rapid diminution of free ribosomes. In vivo, by combining rRNA FISH and flow cytometry, we were able to detect alterations in ribosome biogenesis in HSC and immature progenitors at early time points after *Nle* inactivation. This suggests that these defects cause HSC/MPP exhaustion in Nle^{cKO} mice (Figure 7). Defective ribosome biogenesis might cause HSC elimination through several mechanisms. A shortage of ribosomes would affect translation at a global level although IRES-mediated translation may be more sensitive to ribosome insufficiency that cap-dependent one (Horos et al., 2012). Preferential translation of mRNAs with a 5' terminal

oligopyrimidin tract has also been reported upon defective ribosome biogenesis (Fumagalli et al., 2009). In addition, suppressed translation of a specific subset of mRNAs has been observed upon ribosomal protein haploinsufficiency/knockdown (Kondrashov et al., 2011; Horos et al., 2012). Therefore, altered translation of transcripts essential for HSC function might contribute to the phenotype of Nle^{cKO} mice. Activation of a ribosome biogenesis checkpoint might also be involved. Indeed, impaired ribosome biogenesis is known to efficiently trigger the upregulation of p53 function through binding of MDM2 by free ribosomal proteins Rpl11, Rpl23, Rpl5 or Rps7 (reviewed in (Zhang and Lu, 2009)). Classical response to p53 activation such as apoptosis or cell cycle arrest were not observed in *Nle*-deficient HSC/MPP. Of note, p53 plays specific functions in HSC regulation. p53 promotes HSC quiescence and in its absence, HSC more easily enter the cell cycle (Liu et al., 2009). p53 negatively regulates self-renewal of HSC and MPP although how p53 regulates this process is not precisely known (Akala et al., 2008; Chen et al., 2008). Interestingly, p53 activation was shown to both affect self-renewal through transcriptional repression of pluripotency-associated genes and promote differentiation by activation of differentiation-associated genes in ES cells (Li et al., 2012). While upregulation of p53 function might certainly not be responsible for the reduced quiescence of Nle^{cKO} HSC, it might contribute to their exhaustion through reduced self-renewal. Another possibility is that, as recently shown for DNA damage (Wang et al., 2012), a p53-independent differentiation checkpoint might limit HSC self-renewal in response to ribosomal stress.

Differential requirement of NLE function

Considering its conserved and critical role in large ribosomal subunit biogenesis, our observation that NLE is dispensable in committed progenitors was unexpected. Importantly, we did not detect accumulation of rRNA intermediates in *Nle*-deficient B and Lin^+ cells suggesting that pre60S maturation occurs normally in absence of NLE in these cells. Notably, normal proliferation, differentiation and maturation of B cell lineage following constitutive inactivation of *Nle* with the CD19-Cre driver strengthens this conclusion and argues against the hypothesis that long lasting inherited ribosomes could compensate for a defective ribosome biogenesis. Collectively our findings support the hypothesis that alternative *Nle*-independent pathways can assure 60S subunit production in committed progenitors but not in HSC/MPP (Figure 7E). A NLE-related

WD-repeat protein WDR12/Ytm1 containing a NH_2-terminal domain homologous to NLE NH_2-terminal domain is present in all eukaryotes and also participates in pre-60S maturation (Nal et al., 2002; Baßler et al., 2010). However, WDR12/Ytm1 and NLE/Rsa4 has been shown to act sequentially and in a non-redundant manner during pre-60S subunit maturation in yeast (Ulbrich et al., 2009; Baßler et al., 2010). Ribosome biogenesis has been extensively studied in yeast, but is yet poorly described in higher eukaryotes. Several differences have been reported between yeast and higher eukaryotic cells in term of rRNA maturation steps or composition of pre-ribosomal particles (see for example (Turner et al., 2009; Srivastava et al., 2010)). Whether ribosome biogenesis is qualitatively modulated during development or between cell types in a pluricellular organism is still an open question. This study is to our knowledge the first in vivo demonstration that differences in ribosome biogenesis exist between cells type in mammals. Recently, the ribosomal filter hypothesis postulating that differences in composition of ribosomal subunit or postranslational modifications of ribosomal proteins may differentially affect the translation of particular transcripts has received support from studies performed in budding yeast and mouse embryo (Komili et al., 2007; Kondrashov et al., 2011). If this is true, ribosome heterogeneity implies some degrees of plasticity during pre-ribosomal subunit assembly. Differential activities of alternative pathways for 60S subunit maturation between HSC/MPP and committed progenitors could thus lead to the generation of qualitatively distinct ribosomes and therefore would represent an additional mode of gene expression regulation.

Concluding remarks

The expression of several genes involved in ribosome biogenesis is highly enriched in *Drosophila* ovarian stem cells (Kai et al., 2005) and fish neural stem cells (J.-S. Joly personal communication). A genome-wide gain-of-function screen in mouse ES cells identified multifunctional nucleolar proteins involved notably in ribosome biogenesis as novel regulators of self-renewal (Abujarour et al., 2010). Similarly, genetic screens for mutants that affect neuroblast and ovarian germline stem cells maintenance in drosophila identified genes involved in ribosome biogenesis (Fichelson et al., 2009; Neumüller et al., 2011). Together with our findings, these observations link ribosome biogenesis with stem cell biology. Beyond overall protein synthesis and cell growth, specificities in pre-ribosomal factors or ribosomal proteins expression may contribute

to stem cell/immature progenitor identity. In the future, it will be important to address whether such specificities and in particular dependency on NLE pre-60S maturation pathway contribute to self-renewal capacity of malignant cells.

Experimental procedures

Mice

Experiments on live mice were conducted according to the French and European regulations on care and protection of the Laboratory Animals (EC Directive 86/609, French Law 2001-486 issued on June 6, 2001) and the NIH Animal Welfare (Insurance #A5476-01 issued on 02/07/2007). Control and experimental animals were obtained by crossing mice harbouring *Nle*^{Flox} (Figure S7), *Nle*^{null} (Cormier et al., 2006), *Rosa26*^{CreERT2} (Hameyer et al., 2007) or *CD19*^{Cre} (Rickert et al., 1997) alleles. Mice were injected intraperitoneally with tamoxifen (75mg/kg) for three or five consecutive days. Nle^{cKO} mice were systematically compared to control littermates treated under the same conditions.

Flow cytometry analysis

Single cell suspensions of BM, spleen and PB were stained with different combinations of antibodies described in supplemental experimental procedures. Marker combinations and FACS gating strategy used to define the various BM cell populations are indicated on Fig S2. Apoptosis was monitored using 7-AAD and Annexin V (Roche) according to manufacturer's instructions. For proliferation analysis, cells were incubated with fixation/permeabilization solution (eBioscience) and stained with anti-Ki67 (B56, BD Pharmingen) antibody and Hoechst 33342 (10µg/ml). CyAn ADP, MoFlo (Beckman Coulter), FACSCanto and LSR Fortessa (BD Biosciences) flow cytometers were used for analysis and sorting. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star).

Transplantation assays

For non-competitive transplantations, about 8.10^5 Lin$^-$ cells from control or Nle^{cKO} mice (129Sv/C57Bl6 mixed background) were injected into the retro orbital sinus of sublethally irradiated (11 Grays) (129Sv×C57Bl6)F1 mice carrying the Act-GFP transgene (Okabe et al., 1997). BM was depleted from lineage-positive cells to avoid graft versus host reaction. The converse transplantation was performed similarly using donor and recipient mice selected for histocompatibility matching through genotyping of the chromosome 17 region encompassing major MHC class I loci. For competitive transplantations, Lin$^-$ control or Nle^{cKO} cells (CD45.2, 129Sv/C57Bl6 mix) were mixed

with an excess (3:1) of competitor cells (CD45.1, C57Bl6) and grafted into a sublethally irradiated recipient (CD45.1×CD45.2, (129Sv×C57Bl6)F1). Two months after grafting, the reconstitution rate was assayed by flow cytometry analysis of PB cells.

Northern Blot analysis

Generation of control and Nle^{cKO} ES cell lines is described in the supplemental experimental procedures. Total RNA from ES cells was prepared with TRIzol reagent following the supplier's instructions (Sigma). Migration and hybridization were performed as previously described (Fichelson et al., 2009). The probes used in this study were 5.8S (GCGTTCGAAGTGTCGATGATCAATGTGTCCTGCAATTCAC), 18S (ACGGTATCTGATCGTCTTCGAACC), 28S (GTTCCCTTGGCTGTGGTTTCGCTAGATA) and its2 (ACTGGTGAGGCAGCGGTCCGGGAGGCGCCGACG).

Sucrose density gradient

Cells were treated for 10min with 10mg/ml cycloheximide (Sigma) in cell culture medium, collected and then resuspended in buffer lysis (50mM Tris-Hcl pH7.4, 50mM Kcl, 10mM MgAc, 1mM DTT (Invitrogen), 200U/ml RNasin (Promega), 1 tablet/10ml proteases inhibitors (Roche), cycloheximide 10mg/ml (Sigma)). 200µl glass beads were added to cell suspension and lysis was performed by vortexing cells at 4°C, for 1min, 5 times. After centrifugation, supernatants were layered on a 15-50% sucrose gradient and centrifuged for 15h at 33000rpm in a SW41 rotor (Beckman). The gradient was fractionated with a fractions collector system coupled to a UV detector to monitor absorbance at 260nm. Half of each fraction was treated with trichloroacetic acid to recover proteins while the remaining half was treated with phenol-chloroform to extract RNA.

FISH analysis

ES cells or stained hematopoietic cells were fixed for 30 minutes with PFA 4%, rinsed in PBS and placed in 70% ethanol at 4°C. The hybridization was performed as previously described (O'Donohue et al., 2010). Cy3 conjugated probes were purchased at Eurogentec (Its1 : TAGACACGGAAGAGCCGGACGGGAAAGA ; its2 : GCGATTGATCGTCAACCGACGCTC 5'ets : AGAGAAAAGAGCGGAGGTTCGGGACTCCAA).

Statistical analysis

For all bar graphs with pooled data, means (SD) are shown. Statistical analyses were performed using the Mann-Withney Wilcoxon test. Significance is indicated on the figures with the following convention : * : $p<0.05$, ** : $p<0.005$, *** : $p<0.005$.

Acknowledgements

Imaging and cell sorting analyses were performed at the Institut Pasteur Imagopole. We are grateful to P.-H. Commere for his assistance with FACS analysis and sorting. We thank J. Jonker and A. Berns for the *Rosa26CreERT2* targeting vector and mouse line, K. Rajewsky for the CD19-Cre mouse line, M. Fromont-Racine, M.-F. O'Donohue, P.-E. Gleizes, C. Moch, J.-R. Huyn, , A. Mougin, F. Morlé, S. Tajbakhsh and all members of the lab for technical advices and helpful discussions. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Institut Pasteur, the Agence Nationale de la Recherche (contract n° JC05_41835) and the Institut National du Cancer (INCa 2007-1-COL-6-IC-1 and PLBIO09-070). M.L.B. received fellowship from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie and the Ligue Nationale Contre le Cancer.

References

Abujarour, R., Efe, J., and Ding, S. (2010). Genome-wide gain-of-function screen identifies novel regulators of pluripotency. Stem Cells *28*, 1487–1497.

Akala, O.O., Park, I.-K., Qian, D., Pihalja, M., Becker, M.W., and Clarke, M.F. (2008). Long-term haematopoietic reconstitution by Trp53-/-p16Ink4a-/-p19Arf-/- multipotent progenitors. Nature *453*, 228–232.

Baßler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M., and Hurt, E. (2010). The AAA-ATPase Rea1 Drives Removal of Biogenesis Factors during Multiple Stages of 60S Ribosome Assembly. Molecular Cell *38*, 712–721.

Chantha, S.-C., and Matton, D.P. (2007). Underexpression of the plant NOTCHLESS gene, encoding a WD-repeat protein, causes pleitropic phenotype during plant development. Planta *225*, 1107–1120.

Chantha, S.C., Gray-Mitsumune, M., Houde, J., and Matton, D.P. (2010). The MIDASIN and NOTCHLESS genes are essential for female gametophyte development in Arabidopsis thaliana. Physiology and Molecular Biology of Plants *16*, 3–18.

Chen, J., Ellison, F.M., Keyvanfar, K., Omokaro, S.O., Desierto, M.J., Eckhaus, M.A., and Young, N.S. (2008). Enrichment of hematopoietic stem cells with SLAM and LSK markers for the detection of hematopoietic stem cell function in normal and Trp53 null mice. Exp. Hematol. *36*, 1236–1243.

Cormier, S., Le Bras, S., Souilhol, C., Vandormael-Pournin, S., Durand, B., Babinet, C., Baldacci, P., and Cohen-Tannoudji, M. (2006). The murine ortholog of notchless, a direct regulator of the notch pathway in Drosophila melanogaster, is essential for survival of inner cell mass cells. Mol. Cell. Biol. *26*, 3541–3549.

Danilova, N., Sakamoto, K.M., and Lin, S. (2011). Ribosomal protein L11 mutation in zebrafish leads to haematopoietic and metabolic defects. British Journal of Haematology *152*, 217–228.

De la Cruz, de, J., Sanz-Martínez, E., and Remacha, M. (2005). The essential WD-repeat protein Rsa4p is required for rRNA processing and intra-nuclear transport of 60S ribosomal subunits. Nucleic Acids Research *33*, 5728–5739.

Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F.H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., et al. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. Blood *117*, 2567–2576.

Fichelson, P., Moch, C., Ivanovitch, K., Martin, C., Sidor, C.M., Lepesant, J.-A., Bellaiche, Y., and Huynh, J.-R. (2009). Live-imaging of single stem cells within their niche reveals that a U3snoRNP component segregates asymmetrically and is required for self-renewal in Drosophila. Nature Cell Biology *11*, 685–693.

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

Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P., and Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpL11-translation-dependent mechanism of p53 induction. Nature Cell Biology *11*, 501–508.

Gan, B., Hu, J., Jiang, S., Liu, Y., Sahin, E., Zhuang, L., Fletcher-Sananikone, E., Colla, S., Wang, Y.A., Chin, L., et al. (2010). Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. Nature *468*, 701–704.

Ganapathi, K.A., and Shimamura, A. (2008). Ribosomal dysfunction and inherited marrow failure. British Journal of Haematology *141*, 376–387.

Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G.S., Brunet, F., Ereskovsky, A.V., Degnan, B.M., Borchiellini, C., Vervoort, M., and Renard, E. (2009). Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. BMC Evol Biol *9*, 249.

Gilbert, W.V. (2011). Functional specialization of ribosomes? Trends in Biochemical Sciences *36*, 127–132.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Ozsolak, F., Milos, P., Ferrari, F., et al. (2010). The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. Nature *468*, 659–663.

Hall, L., Alexander, S., Chang, M., Woodling, N., and Yedvobnick, B. (2004). An EP overexpression screen for genetic modifiers of Notch pathway function in Drosophila melanogaster. Genet Res *83*, 71–82.

Hameyer, D., Loonstra, A., Eshkind, L., Schmitt, S., Antunes, C., Groen, A., Bindels, E., Jonkers, J., Krimpenfort, P., Meuwissen, R., et al. (2007). Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. Physiological Genomics *31*, 32–41.

Hock, H., Hamblen, M.J., Rooke, H.M., Schindler, J.W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2004). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 1002–1007.

Horos, R., Ijspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I.P., et al. (2012). Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. Blood *119*, 262–272.

Ji, H., Wu, G., Zhan, X., Nolan, A., Koh, C., De Marzo, A., Doan, H.M., Fan, J., Cheadle, C., Fallahi, M., et al. (2011). Cell-type independent MYC target genes reveal a primordial signature involved in biomass accumulation. PLoS ONE *6*, e26057.

Jude, C.D., Climer, L., Xu, D., Artinger, E., Fisher, J.K., and Ernst, P. (2007). Unique and Independent Roles for MLL in Adult Hematopoietic Stem Cells and Progenitors. Cell Stem Cell *1*, 324–337.

Kai, T., Williams, D., and Spradling, A.C. (2005). The expression profile of purified Drosophila germline stem cells. Developmental Biology *283*, 486–502.

Komili, S., Farny, N.G., Roth, F.P., and Silver, P.A. (2007). Functional Specificity among Ribosomal Proteins Regulates Gene Expression. Cell *131*, 557–571.

Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011). Ribosome-Mediated Specificity in Hox mRNA Translation and Vertebrate Tissue Patterning. Cell *145*, 383–397.

Kranc, K.R., Schepers, H., Rodrigues, N.P., Bamforth, S., Villadsen, E., Ferry, H., Bouriez-Jones, T., Sigvardsson, M., Bhattacharya, S., Jacobsen, S.E., et al. (2009). Cited2 is an essential regulator of adult hematopoietic stem cells. Cell Stem Cell *5*, 659–665.

Laurenti, E., Varnum-Finney, B., Wilson, A., Ferrero, I., Blanco-Bose, W.E., Ehninger, A., Knoepfler, P.S., Cheng, P.-F., MacDonald, H.R., and Eisenman, R.N. (2008). Hematopoietic Stem Cell Function and Survival Depend on c-Myc and N-Myc Activity. Cell Stem Cell *3*, 611–624.

Leung, C.G., Xu, Y., Mularski, B., Liu, H., Gurbuxani, S., and Crispino, J.D. (2007). Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. J. Exp. Med. *204*, 1603–1611.

Li, M., He, Y., Dubois, W., Wu, X., Shi, J., and Huang, J. (2012). Distinct Regulatory Mechanisms and Functions for p53-Activated and p53-Repressed DNA Damage Response Genes in Embryonic Stem Cells. Molecular Cell *46*, 30–42.

Liu, Y., Elf, S.E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee, J.M., Deblasio, A., Menendez, S., et al. (2009). p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence. Cell Stem Cell *4*, 37–48.

Maillard, I., Koch, U., Dumortier, A., Shestova, O., Xu, L., Sai, H., Pross, S.E., Aster, J.C., Bhandoola, A., Radtke, F., et al. (2008). Canonical Notch Signaling Is Dispensable for the Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell *2*, 356–366.

Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M.R., Barry-Holson, K., Le Beau, M.M., Morrison, C.G., and Passegué, E. (2010). Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. Cell Stem Cell *7*, 174–185.

Mourikis, P., Lake, R.J., Firnhaber, C.B., and DeDecker, B.S. (2010). Modifiers of notch transcriptional activity identified by genome-wide RNAi. BMC Developmental Biology *10*, 107.

Nakada, D., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2010). Lkb1 regulates cell cycle and energy metabolism in haematopoietic stem cells. Nature *468*, 653–658.

Nal, B., Mohr, E., Silva, M.-I.D., Tagett, R., Navarro, C., Carroll, P., Depetris, D., Verthuy, C., Jordan, B.R., and Ferrier, P. (2002). Wdr12, a Mouse Gene Encoding a Novel WD-Repeat Protein with a Notchless-like Amino-terminal Domain. Genomics *79*, 77–86.

Narla, A., and Ebert, B.L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. Blood *115*, 3196–3205.

Neumüller, R.A., Richter, C., Fischer, A., Novatchkova, M., Neumüller, K.G., and Knoblich,

J.A. (2011). Genome-wide analysis of self-renewal in Drosophila neural stem cells by transgenic RNAi. Cell Stem Cell *8*, 580–593.

Nybakken, K., Vokes, S.A., Lin, T.-Y., McMahon, A.P., and Perrimon, N. (2005). A genome-wide RNA interference screen in Drosophila melanogaster cells for new components of the Hh signaling pathway. Nat Genet *37*, 1323–1332.

O'Donohue, M.F., Choesmel, V., Faubladier, M., Fichant, G., and Gleizes, P.-E. (2010). Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. The Journal of Cell Biology *190*, 853–866.

Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. (1997). "Green mice" as a source of ubiquitous green cells. FEBS Letters *407*, 313–319.

Opferman, J., Iwasaki, H., Ong, C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., and Korsmeyer, S. (2005). Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. Science *307*, 1101–1104.

Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. Cell *132*, 631–644.

Pajerowski, A.G., Shapiro, M.J., Gwin, K., Sundsbak, R., Nelson-Holte, M., Medina, K., and Shapiro, V.S. (2010). Adult hematopoietic stem cells require NKAP for maintenance and survival. Blood *116*, 2684–2693.

Qian, Z., Chen, L., Fernald, A.A., Williams, B.O., and Le Beau, M.M. (2008). A critical role for Apc in hematopoietic stem and progenitor cell survival. Journal of Experimental Medicine *205*, 2163–2175.

Randall, T.D., and Weissman, I.L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. Blood *89*, 3596–3606.

Rickert, R.C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. Nucleic Acids Research *25*, 1317–1318.

Royet, J., Bouwmeester, T., and Cohen, S.M. (1998). Notchless encodes a novel WD40-repeat-containing protein that modulates Notch signaling activity. The EMBO Journal *17*, 7351–7360.

Srivastava, L., Lapik, Y.R., Wang, M., and Pestov, D.G. (2010). Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA. Mol. Cell. Biol. *30*, 2947–2956.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B.J., Lee, B.H., Castrillon, D.H., Cullen, D.E., McDowell, E.P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I.R., Sears, C., et al. (2007). FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. Cell *128*, 325–339.

Turner, A.J., Knox, A.A., Prieto, J.-L., McStay, B., and Watkins, N.J. (2009). A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4. Mol. Cell. Biol. *29*, 3007–3017.

Ulbrich, C., Diepholz, M., Baszligler, J., Kressler, D., Pertschy, B., Galani, K., BOttcher, B., and Hurt, E. (2009). Mechanochemical Removal of Ribosome Biogenesis Factors from Nascent 60S Ribosomal Subunits. Cell *138*, 911–922.

van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsher, D.W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. Nat Rev Cancer *10*, 301–309.

Voutev, R., Killian, D.J., Hyungsoo Ahn, J., and Hubbard, E.J.A. (2006). Alterations in ribosome biogenesis cause specific defects in C. elegans hermaphrodite gonadogenesis. Developmental Biology *298*, 45–58.

Wang, J., Sun, Q., Morita, Y., Jiang, H., Groß, A., Lechel, A., Hildner, K., Guachalla, L.M., Gompf, A., Hartmann, D., et al. (2012). A Differentiation Checkpoint Limits Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal in Response to DNA Damage. Cell *148*, 1001–1014.

Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. Nat Rev Mol Cell Biol *13*, 355–369.

Zhang, Y., and Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. Cancer Cell *16*, 369–377.

Zhu, H.H., Ji, K., Alderson, N., He, Z., Li, S., Liu, W., Zhang, D.E., Li, L., and Feng, G.S. (2011). Kit-Shp2-Kit signaling acts to maintain a functional hematopoietic stem and progenitor cell pool. Blood *117*, 5350–5361.

Inventory of Supplemental Information

Supplemental Experimental Procedures

Supplemental References

Figure S1 (related to experimental procedure): describes the generation of *Nle*^{Flox} allele by homologous recombination in ES cells.

Figure S2 (related to experimental procedure): shows hierarchical relations of various hematopoietic cell populations defined by marker combinations and illustrates FACS gating strategy used for analysis.

Figure S3 (related to Figure 1): illustrates *Nle* gene deletion and protein depletion in hematopoietic cells.

Figure S4 (related to Figure 4): shows survival curves of non competitive chimeras.

Figure S5 (related to Figure 4): shows complementary analyses performed on competitive chimeras.

Figure S6 (related to Figure 6): presents complementary data on Nle^{cKO} ES cells.

Figure S7 (related to Figure 7): shows additional data from FISH staining in hematopoietic cells.

Supplemental Experimental Procedures

Nle Gene targeting and ES cells culture

ES cells were cultured in DMEM +Glutamax-I (Gibco) supplemented with 15% FCS, 100μM β-mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin and 10^3U/ml of LIF. A 10.5-kb NdeI-HincII 129/Sv genomic DNA fragment, containing *Nle* exons 1 to 13 from CITB-4B7 BAC (GenBank accession no. AL713882) was subcloned into pBKS(+) plasmid. Using a recombineering approach (Liu et al., 2003), we generated a targeting vector containing *Nle* 5' and 3'-homologous arms (4,9 kb and 2,3 kb respectively), a neomycin resistance (neo) cassette flanked by frt sites in intron 9 and 5' and 3' loxP sites 528 bp downstream from exon 3 and 785 bp upstream from exon 10 respectively (Figure S1). The final vector containing a diphtheria toxin negative selection cassette (MC1-DTA) was verified by sequencing. CK35 129/Sv ES cells (Kress et al., 1998) were electroporated with 20 μg of linearized targeting vector and cultured in presence of G418. Homologous recombination events were identified by Southern blot analysis of BstEII digested genomic DNA using *Nle* 5' and 3' external probes. Out of 38 $G418^R$ clones analyzed, five correctly targeted ES clones were shown to carry single copy integration at the *Nle* locus. Three clones were then amplified and transfected with the pCAG-Flp vector (Genebridge) in order to delete the neo cassette. Deletion of the cassette was verified by PCR. Two independent clones were injected into C57BL/6 blastocysts and resulting chimera males were mated with 129Sv females. Germ-line transmission of the Nle^{Flox} allele was confirmed by southern blot analysis and PCR. The conditional Nle^{Flox} allele was recombined into Nle^{Del} allele in the germ line of female breeders using ZP3Cre transgenic mice (de Vries et al., 2000). Males and females heterozygous for the Nle^{Del} allele were indistinguishable from wild-type mice. $Nle^{Del/+}$ mice were intercrossed to obtain $Nle^{Del/Del}$ blastocysts. As previously described for the non functional Nle^{nLacZ} allele (Cormier et al., 2006), these embryos failed to hatch or to develop and exhibited death of inner cell mass cells indicating that the Nle^{Del} allele is indeed non functional.

Control and Nle^{cKO} ES cells were obtained by iterative gene targeting. $Nle^{Flox/+}$ ES cells were electroporated with the Nle^{nLacZ} targeting vector (Cormier et al., 2006) to generate $Nle^{Flox/null}$ ES clones. Then, SfiI-linearized pRosaCreERT2 targeting vector (Hameyer et al., 2007) was electroporated into $Nle^{Flox/+}$ and $Nle^{Flox/null}$ ES cells to generate control ($Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/+}$) and Nle^{cKO} ($Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$) ES cells

respectively. The deletion of the *Nle*^{Flox} allele in culture was induced by treatment with 1µM of 4-OHT two consecutive days.

Antibodies

For flow cytometry, antibodies either biotinylated or directly coupled to fluorochromes (FITC, PE, PE-Cy7, APC, APC-Cy7) were used : anti-B220 (RA3-6B2), anti-NK1.1 (PK136), anti-Gr1 (RB6-8C5), anti-Ter119 (TER-119), anti-CD3 (145-2C11), anti CD11c (HL3 or N418), anti-Mac1 (M1/70), anti-Sca-1 (D7 or E13-161.7), anti-c-Kit (2B8), anti-CD34 (RAM34), anti-IL-7Rα (A7R34), anti-CD150 (TC15-12F12.2), anti-CD48 (HM48-1), anti-CD19 (1D3 or 6D5), anti-IgM (RMM-1), anti-Flt3 (A2F10), anti-CD45.1 (A20), anti-CD45.2 (104). All antibodies were from BD Pharmingen, eBioscience or Biolegend. Streptavidin coupled to Pacific blue (Invitrogen) or APC-Cy7 (Biolegend) were used.

We raised an anti-NLE polyclonal antibody in rabbit. Recombinant fusion peptide corresponding to amino acids 1 to 174 of the NLE protein was produced in *Escherichia coli* as a His tagged protein from pET15b expression vector (Novagen) and purified using immobilized metal ion affinity chromatography. Purified peptide was then used as an immunogen for the production of rabbit antiserum (Agro-Bio, France). Antibody was used at 1/50 and 1/500 dilutions for immunofluorescence and immunoblotting respectively.

Other primary antibodies used are anti-B23 (Sigma, 1/500), RPL24 (Sigma**,** 1/1000) and β-actin (clone AC-40, 1/1000, Sigma). Secondary antibodies used were anti-mouse and anti-rabbit cy3 (1/800, Invitrogen) and anti-rabbit and anti-mouse HRP (1/20000 and 1/10000 respectively, GE healthcare).

OP9 culture

For *ex vivo* differentiation assay, HSC were cultured in Optimem, 10% FCS, 100µM β-mercaptoethanol, 100U/ml penicillin, 0.1mg/ml streptomycin, Il-7, Flt3 ligand, GM-CSF (supernatants of cell lines transfected with expression vectors for IL-7, Flt3 ligand and GM-CSF repectively, a kind gift from F.Melchers, Basel).

Genotyping of mice and ES cells

Genotyping was performed by PCR after lysis of tissue and ES cells pellet in the following buffer: 50mM Tris pH8.5, 100mM NaCl, 0.5% tween20, 100mg/ml proteinase K at 56°C ON followed by a 10 min incubation at 96°C. PCR amplification protocol consisted of an initial incubation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 60 s and 72°C for 60 s, and a final incubation at 72°C for 5 min. For *Nle*, PCR amplification with primers 1 (5'- CAGACTTTCTTATTGGGGTTTGGT), 2 (5'- TCCCCTCGAGGGACCTAATA) and 3 (5'- ATGCCCGGCGTGTTAAGATT) allowed to discriminate Nle^{Flox} (439 bp, primers 1 and 2) and Nle^{Del} (773 bp, primers 1 and 3) alleles. D17mit24 and D17Mit135 polymorphic markers were used to discriminate between 129Sv and C57Bl6 alleles around MCH class I loci.

Real-Time RT-PCR

mRNA from sorted cells was purified using Dynabeads mRNA direct kit (Invitrogen) and reverse-transcribed using the SuperScript Vilo cDNA synthesis kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The amount of RNA was evaluated by real-time PCR using SYBR green PCR master mix on a StepOne instrument (Applied Biosystems). The expression of *Nle* was normalized with *TBP*, *Tubulin beta 5*, *Aldolase* and *Rrm* (StepOne software v2.2). The primers used were the following ones : *Nle*, forward : ATCATCTACCAGCCCCAAGC, reverse : ATGTGAAGTGCGGTGTCTCA ; *Tubulin beta 5*, forward : GATCGGTGCTAAGTTCTGGGA, reverse : AGGGACATACTTGCCACCTGT ; *TBP*, forward : AGAACAATCCATACTAGCAGC, reverse : GGGAACTTCACATCACAGCTC ; *Aldolase*, forward : AGCAGAATGGCATTGTACCC, reverse : ACAGGAAAGTGACCCCAGTG ; *Rrm*, forward : CCGAGCTGGAAAGTAAAGCG, reverse : ATGGGAAAGACAACGAAGCG

Western Blot and immunofluorescence

Proteins extracts were migrated on Criterion XT 10% gel (BioRad) and were transferred to a nitrocellulose membrane (BioRad). The membrane was blocked 1 hour in TBS-T 10% milk and incubated overnight with primary antibodies. Membranes were washed in TBS-T and incubated for 1 hour at room temperature with an HRP-coupled secondary antibody. ECL plus western blotting detection system (GE Healthcare) allowed the revelation of the signal, which was detected on a hyperfilm MP (GE Healthcare). Immunofluorescence on ES cells were performed as previously described

(Houlard et al., 2011) except for fixation that was performed in methanol for 20 min at -20°C.

Supplemental References

Cormier, S., Le Bras, S., Souilhol, C., Vandormael-Pournin, S., Durand, B., Babinet, C., Baldacci, P., and Cohen-Tannoudji, M. (2006). The murine ortholog of notchless, a direct regulator of the notch pathway in Drosophila melanogaster, is essential for survival of inner cell mass cells. Mol. Cell. Biol. *26*, 3541–3549.

de Vries, W.N., Binns, L.T., Fancher, K.S., Dean, J., Moore, R., Kemler, R., and Knowles, B.B. (2000). Expression of Cre recombinase in mouse oocytes: a means to study maternal effect genes. Genesis *26*, 110–112.

Hameyer, D., Loonstra, A., Eshkind, L., Schmitt, S., Antunes, C., Groen, A., Bindels, E., Jonkers, J., Krimpenfort, P., Meuwissen, R., et al. (2007). Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. Physiological Genomics *31*, 32–41.

Houlard, M., Artus, J., Léguillier, T., Vandormael-Pournin, S., and Cohen-Tannoudji, M. (2011). DNA-RNA hybrids contribute to the replication dependent genomic instability induced by Omcg1 deficiency. Cell Cycle *10*, 108–117.

Kress, C., Vandormael-Pournin, S., Baldacci, P., Cohen-Tannoudji, M., and Babinet, C. (1998). Nonpermissiveness for mouse embryonic stem (ES) cell derivation circumvented by a single backcross to 129/Sv strain: establishment of ES cell lines bearing the Omd conditional lethal mutation. Mamm Genome *9*, 998–1001.

Liu, P., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2003). A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. Genome Research *13*, 476–484.

Supplemental Figures

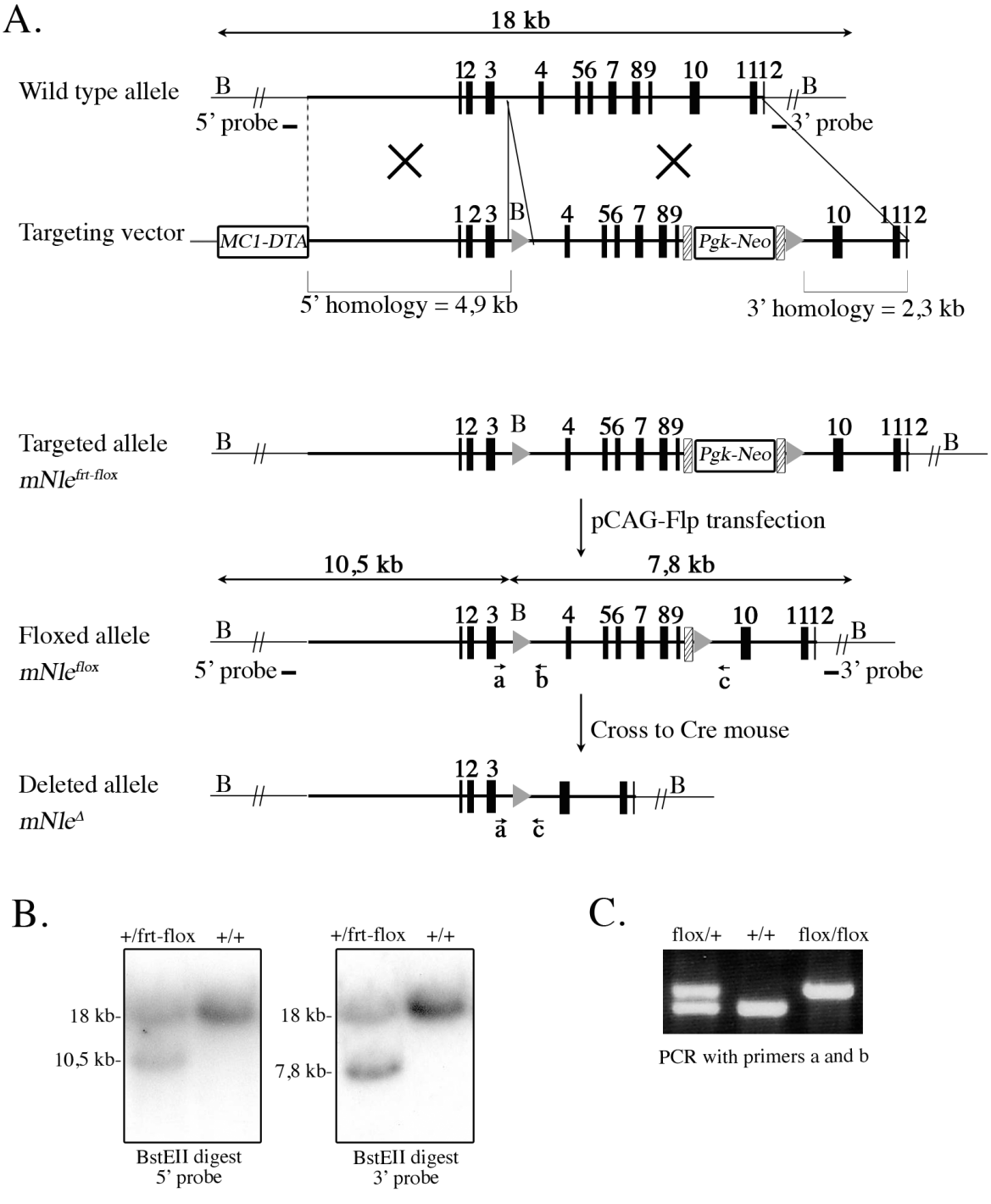


Figure S1. Generation of a conditional null allele of *Nle*.

(A) Targeting strategy. Exons (solid boxes), LoxP sequences (triangles), and positions of primers used for genotype analysis (a, b and c, arrows), probes used for Southern blot analysis (bars), and MC1-DTA and *FRT*-flanked Pgk-Neo cassettes used for negative and positive selection are indicated. B: BstEII restriction sites relevant to the screening strategies. (B) Southern blot analysis of genomic DNA obtained from wild-type and heterozygous *Nle*^{Flox} ES cells containing the Pgk-Neo cassette.

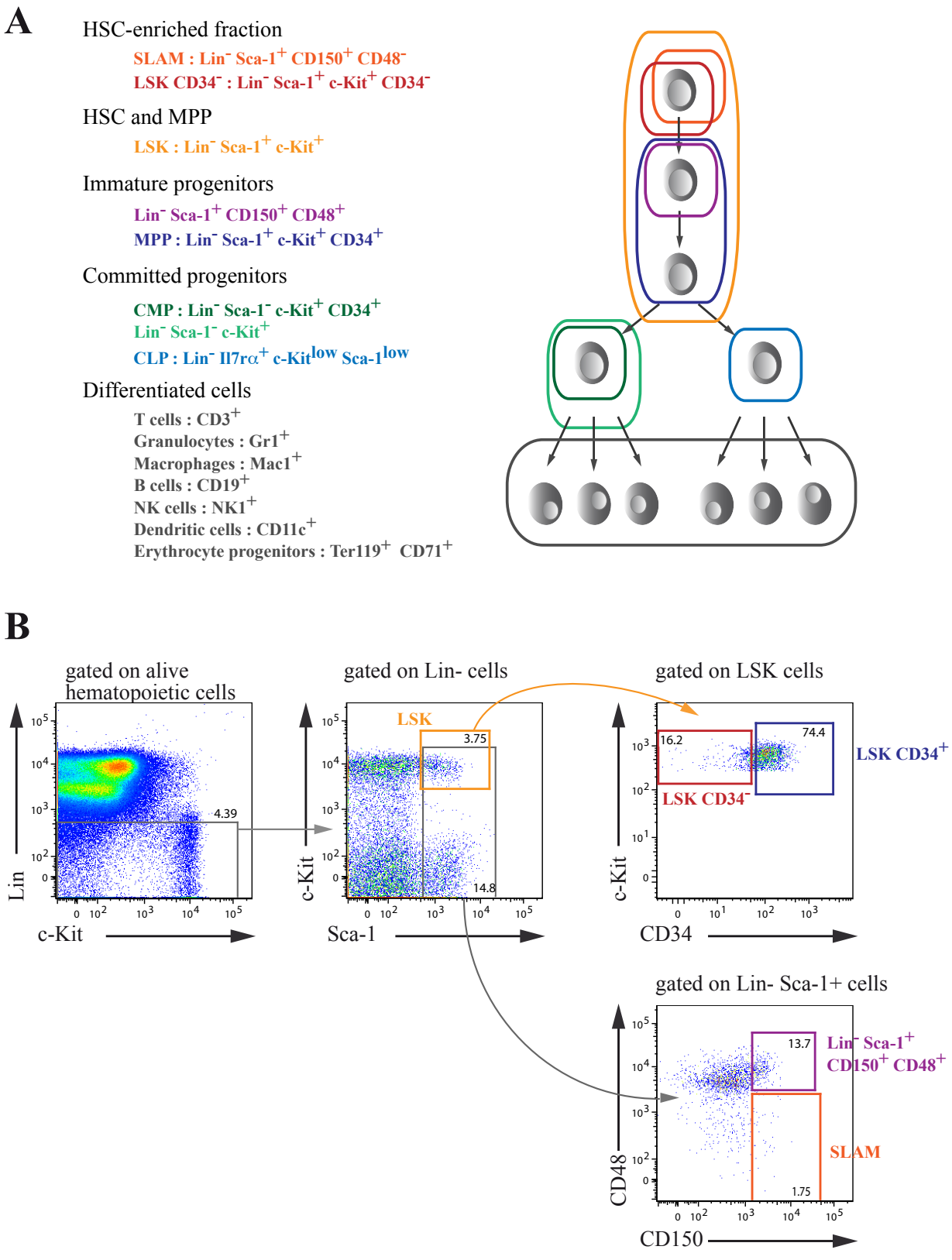


Figure S2. Hematopoietic cells gating strategy

(A) Schematic representation of the hematopoietic system with the populations referred in this study. (B) Representative example of the gating strategy used for BM hematopoietic cells.

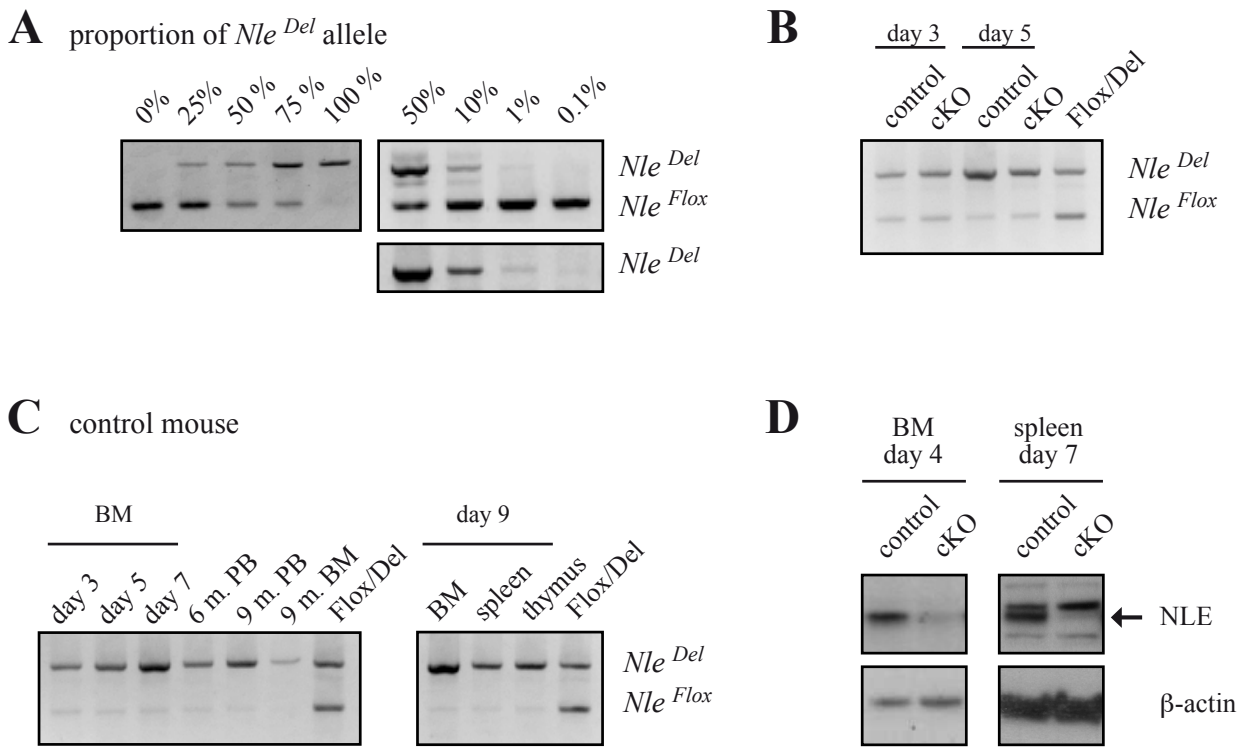


Figure S3. Efficient deletion of *Nle* in hematopoietic cells

(A) PCR analysis on DNA mix with different ratios of Nle^{Flox} and Nle^{Del} alleles. A three primers PCR reaction allows the amplification of both Nle^{Flox} (439 bp) and Nle^{Del} (773 bp) alleles. When only two primers were used Nle^{Del} allele was detectable up to a 1/1000 fold dilution. (B) PCR analysis on BM cells from control and Nle^{cKO} mice 3 and 5 days following Cre induction. Heterozygous DNA $Nle^{Flox/Del}$ was used as a control (lane Flox/Del). (C) PCR analysis on hematopoietic cells from control mice at different time points after Cre induction. (D) Western Blot analysis for BM or spleen cells from control and Nle^{cKO} mice 4 or 7 days following Cre induction. The same number of cells (BM) or the same amount of protein (spleen) was loaded.

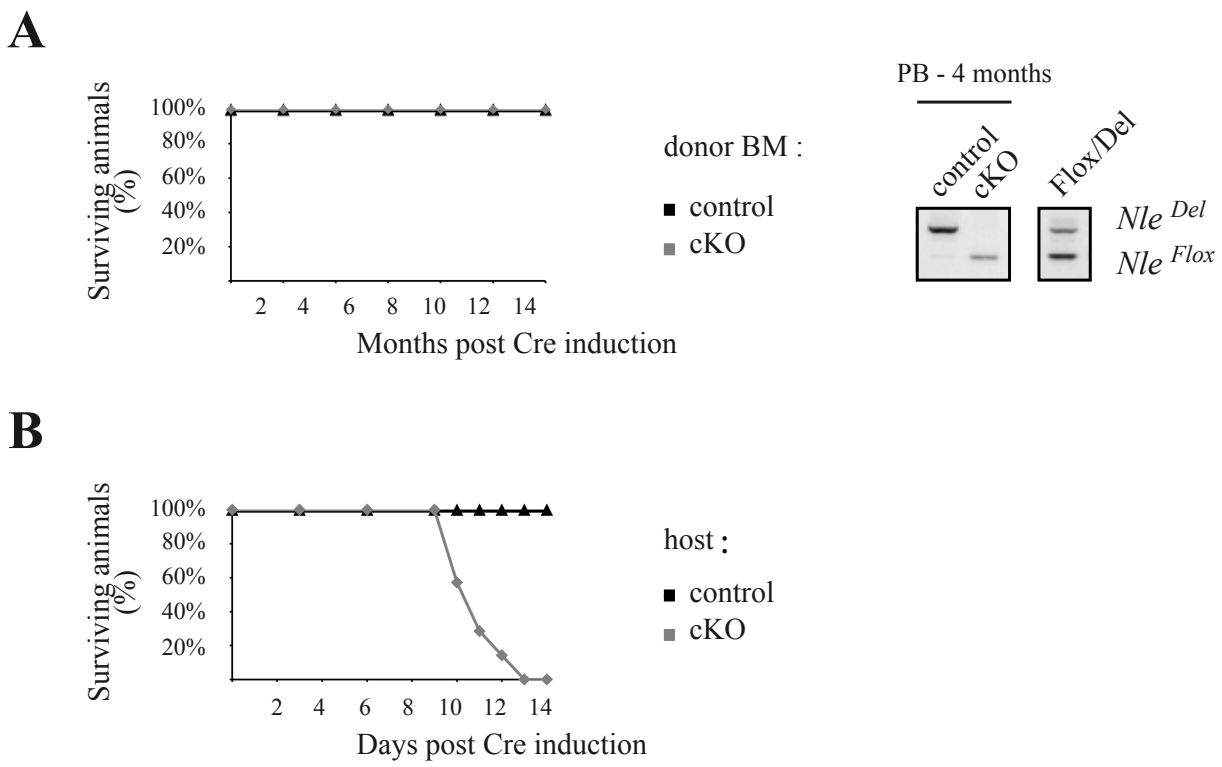


Figure S4. Survival curves of non-mixed chimeras following *Nle* inactivation

Non-competitive chimeras were injected with tamoxifen and their survival was assessed. Survival curves for chimeras with control or Nle^{cKO} BM in a wild-type environment (A, n ≥ 7), or for chimeras with wild-type BM in a control or Nle^{cKO} environment (B, n ≥ 5). Notably, wild-type mice reconstituted with Nle^{cKO} BM do not die after tamoxifen injection, but display high counter selection of *Nle*-deleted cells in BM and PB as illustrated by PCR analysis of PB cells.

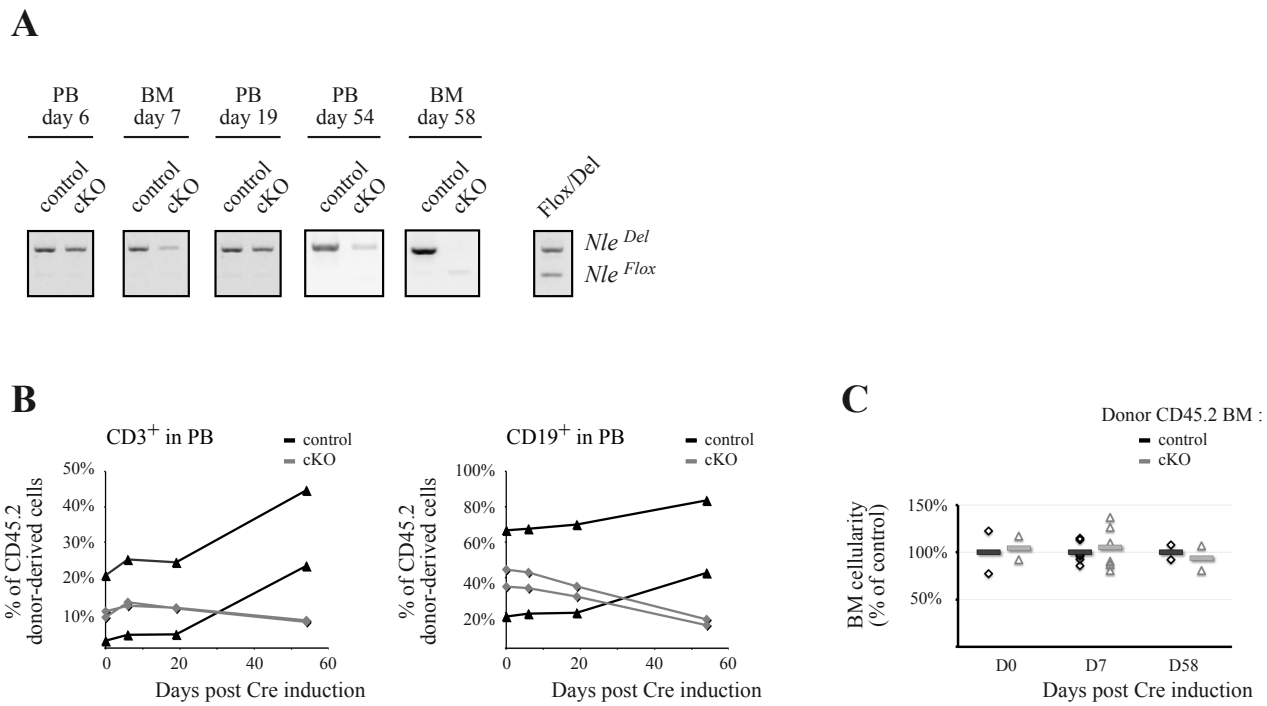


Figure S5. Deletion of *Nle* and kinetics of elimination of *Nle*-deficient cells in lymphoid populations from PB of competitive chimeras

(A) PCR analysis on BM or PB cells from competitive chimeras, at different time points after Cre induction. (B) Percentage of CD45.2 donor-derived in T and B lymphoid populations from PB after Cre induction (left and right panel respectively). (C) BM cellularity in competitive chimeras before Cre induction (D0, n=2), 7 days (n=6) or 58 days (n=2) after Cre induction. Individual measures and means (dashes) are shown. Control means were reported to 100%.

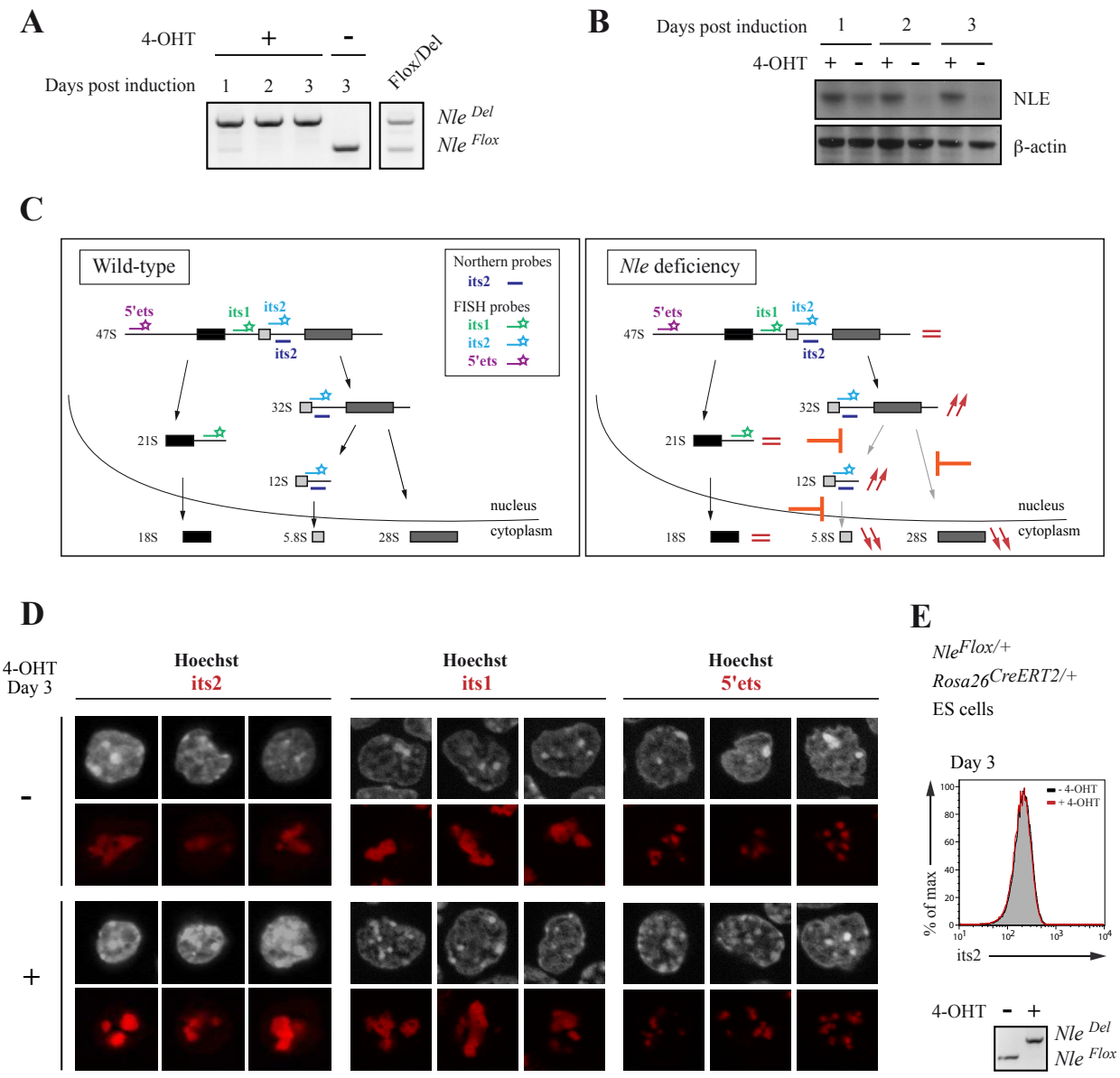


Figure S6. Detection of defects in ribosome biogenesis in Nle^{cKO} ES cells

(A-D) Nle^{cKO} ES cells were untreated or treated with 4-OHT. PCR analysis (A) and Western blot analysis (B) reveal the efficient deletion of *Nle*. (C) Predictions based on the known function of NLE ortholog in yeast of ribosomal RNA maturation defects in *Nle*-deficient mouse ES cells. If its function is conserved, *Nle* inactivation should induce a block in the last steps of maturation of the large pre-ribosomal subunit, leading to an accumulation in the nucleolus of the 32S and 12S pre-rRNA species and the decreased export in the cytoplasm of mature 28S and 5.8S rRNAs. 32S and 12S pre-rRNA can be detected by Northern Blot or FISH analysis using probes directed against the pre-rRNA internal sequence its2 (blue). Maturation of the small subunit should not be directly affected. Thereby, the levels of the corresponding 21S pre-rRNA detected with an its1 probe (green) should remain unchanged. Similarly, levels of 47S primary rRNA transcript detected with a 5'ets probe (purple) should not be directly affected. (D) Representative images of FISH experiment with its2, its1 or 5'ets performed on Nle^{cKO} ES cells untreated or treated with

4-OHT at day 3. Cells were labeled with Hoechst (magnification x40). (E) Control (*Rosa26*$^{CreERT2/+}$ *Nle*$^{Flox/+}$) ES cells were treated or not with 4-OHT. At day 3, FISH experiment using its2 probe and PCR analysis were performed showing that in presence of a functional *Nle* allele, large ribosomal subunit maturation was not affected.

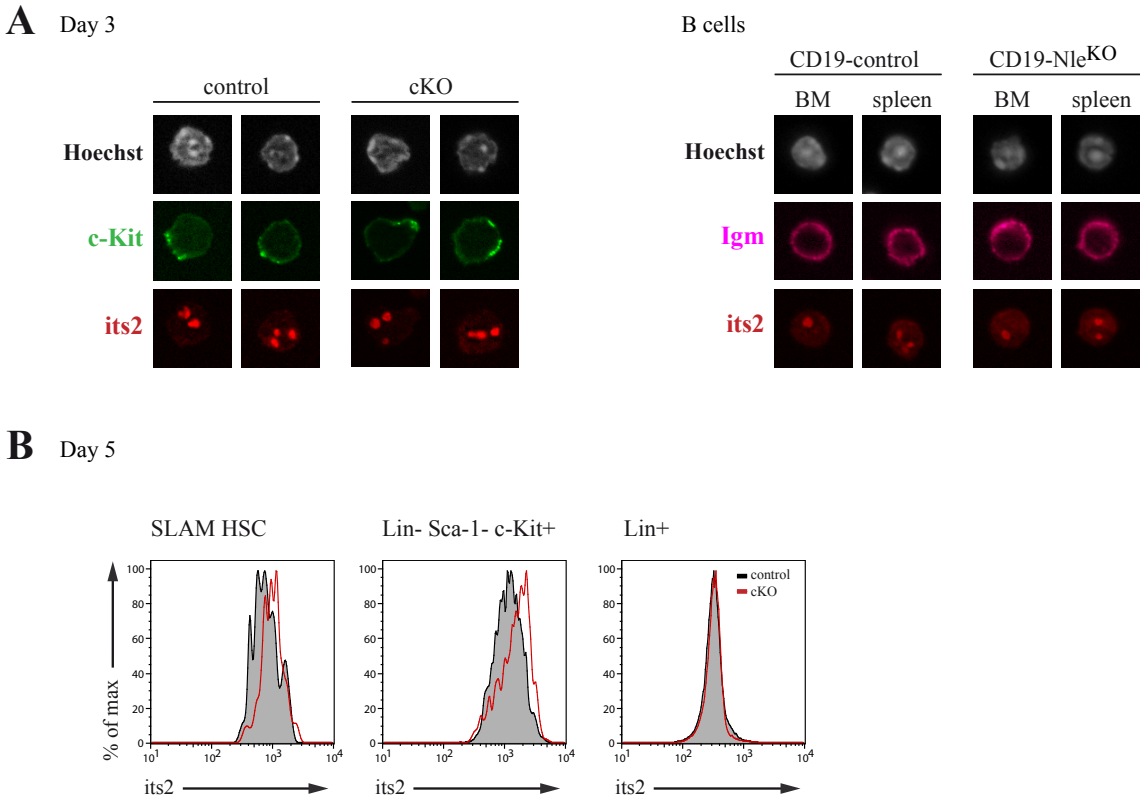


Figure S7. Its2 labeling in hematopoietic cells

(A) At day 3, control and Nle^{cKO} hematopoietic cells were stained with c-Kit or IgM antibodies and its2 probe. (B) Histograms for its2 labeling in SLAM (left panel), Lin$^-$ Sca-1$^-$ c-Kit$^+$ (middle panel) and Lin$^+$ cells (right panel), at day 5 post Cre induction. Results are representative of n=3 individual mice.

Discussion générale

1. Comment les CSH déficientes pour *Nle* disparaissent-elles ?

Une des questions récurrentes que je me suis posée tout au long de ma thèse a été de savoir comment les CSH déficientes pour *Nle* disparaissaient. Le phénotype, autonome cellulaire, est surprenant par sa rapidité. Nos résultats nous ont amenés à penser que les défauts de biogenèse des ribosomes pourraient être la cause de la disparition des CSH. En effet, des défauts dans la biogenèse des ribosomes sont observés très tôt (dès J3), et la corrélation entre les phénotypes observés et les défauts de biogenèse des ribosomes mise en évidence dans les CSH et dans les cellules différenciées soutient cette hypothèse. Dans le cas où effectivement les défauts de biogenèse des ribosomes seraient responsables de la perte des CSH, quels seraient les mécanismes mis en jeu suite à la délétion de *Nle* ? Comment serait induite la disparition des CSH ? Il est raisonnable d'imaginer que des défauts de la biogenèse des ribosomes suite à la délétion de *Nle* puissent induire des défauts de la traduction. Il n'est pas évident de savoir si les CSH déficientes pour *Nle* à J3 manquent de ribosomes matures. Si l'on admet, d'après les expériences de FISH, que la biogenèse de la grande sous-unité est altérée, nos expériences ne permettent pas de conclure si la synthèse de la grande sous-unité est complètement bloquée ou seulement perturbée. Il n'existe pas de données sur la quantité et la durée de vie des ribosomes dans les CSH qui pourraient nous aider à appréhender ces questions. De façon indirecte, les analyses dans les cellules ES, et notamment l'immunofluorescence dirigée contre RPL19 ou les profils de polysomes, suggèrent que la délétion de *Nle* pourrait induire une diminution sensible de la quantité de grandes sous-unités matures. Il serait intéressant de déterminer si c'est le cas également dans les CSH. D'un point de vue fonctionnel, je me suis demandée si la traduction était affectée dans les CSH suite à la délétion de *Nle*. Des marquages métaboliques radioactifs seront nécessaires pour déterminer si le niveau global de la traduction est affecté, et à partir de quel moment. Récemment, une approche de marquage non radioactif combinée à une quantification par cytométrie de flux a été décrite et pourrait être particulièrement adaptée à notre l'étude dans le système hématopoïétique (Schmidt et al., 2009). Par ailleurs, la délétion de *Nle* pourrait induire des défauts qualitatifs de la traduction, comme cela a été montré dans d'autres systèmes. En effet, des défauts de biogenèse des ribosomes peuvent modifier la traduction dépendante des séquences IRES ou la traduction des ARNm 5'-TOP (Horos et al., 2012; Fumagalli et al., 2009). Des modifications dans la traduction de gènes particulièrement critiques pour les CSH pourraient participer au phénotype observé dans notre étude.

Une autre possibilité non exclusive serait que la délétion de *Nle* induise une réponse spécifique dans les CSH avant l'apparition de la diminution de la synthèse protéique. Des réponses à des défauts de synthèse des ribosomes ont ainsi été décrites dans plusieurs types cellulaires, principalement *ex vivo*. Cependant, l'induction d'un stress ribosomique et les réponses activées n'ont pas été étudiées dans les CSH. Dans le laboratoire, des résultats récents montrent que la délétion de *Nle* dans les cellules ES induit des défauts de prolifération, la mort des cellules par apoptose, une stabilisation de

p53 et une activation des gènes cibles *p21* et *Bax*. De façon intéressante, l'activation de p53 semble être dépendante de la présence de RPL11. Ces résultats décrivent, de façon préliminaire, la réponse au stress ribosomique induit par la délétion de *Nle* dans les cellules ES (Léonard Jarzebowski, données non publiées). On peut se demander si des mécanismes similaires sont activés dans les CSH déficientes pour *Nle*. La souris $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$ est alors un modèle tout à fait intéressant pour regarder comment les CSH répondent à un stress ribosomique *in vivo,* et quels sont les facteurs impliqués. Est-ce que notamment la voie p53 est activée, comme c'est le cas dans les cellules ES déficientes pour *Nle*, et dans de nombreux types de cellules soumises à un stress ribosomique ? Afin de répondre à cette question, je souhaite regarder l'activation de p53 dans les CSH. D'autre part, l'implication de p53 dans le phénotype induit pourra être analysée par des approches génétiques, grâce à l'étude des souris $Rosa26^{CreERT2/+}$; $Nle^{Flox/null}$; $p53^{-/-}$ que nous sommes en train de générer. Notons cependant que p53 peut jouer des rôles variés dans les CSH, et que son activation n'est pas spécifique à la réponse à un stress ribosomique. Afin de regarder plus spécifiquement si une voie RP-Mdm2-p53 est activée dans les CSH suite à la délétion de *Nle*, nous pourrons nous intéresser à l'interaction RP-MDM2. Une souris portant une mutation ponctuelle dans le site de liaison de MDM2 avec RPL5 ou RPL11 a été décrite récemment : dans cette souris, MDM2 conserve son activité E3-ubiquitine ligase sur p53, p53 peut donc être activé en réponse à des dommages à l'ADN, mais pas suite à des perturbations de la biogenèse des ribosomes (Macias et al., 2010). Il sera intéressant de regarder si l'introduction de cet allèle de *Mdm2* dans les souris Nle^{cKO} modifie ou non le phénotype lié à la délétion de *Nle* dans le système hématopoïétique.

Il est également envisageable que la protéine p53 ne soit pas stabilisée dans les CSH suite à la délétion de *Nle*. En effet, nous avons vu que des voies de réponses au stress ribosomique indépendantes de p53 pouvaient être activées dans certaines cellules : d'autres cibles de MDM2, dont le facteur de transcription E2F-1, ou des interactions entre RPL11 et c-Myc pourraient également participer au phénotype observé dans les CSH déficientes pour *Nle*. Si p53 est un acteur majeur de la réponse à divers types de stress chez les vertébrés, il est intéressant de remarquer que ce n'est pas le cas chez tous les eucaryotes. p53 est présent chez les métazoaires : exprimé au cours de la gamétogenèse, son rôle de protection contre les dommages à l'ADN dans les gamètes est conservé depuis plus d'un milliard d'années. Au cours de l'évolution, des duplications et d'autres fonctions de p53 sont apparues : la famille p53 a acquis un rôle de protection du génome également dans les cellules somatiques chez les vertébrés. Au sein des organismes pluricellulaires, la préservation des cellules souches est particulièrement importante. En tant qu'acteur de la réponse à divers types de stress, la voie p53 a pu être sélectionnée pour participer au maintien des cellules souches et donc de l'organisme (pour revue, voir (Belyi et al., 2010)). Dans quelles espèces p53 participe à des voies de réponse au stress ribosomique n'est pas bien connu aujourd'hui. Néanmoins, p53 n'existe pas chez la levure, les défauts de biogenèse des ribosomes y sont gérés nécessairement par des voies indépendantes de p53. Chez la levure, un point de contrôle à la fin de la phase G1, appelé « point de

restriction », permet la régulation coordonnée de la croissance et du cycle cellulaire, de façon dépendante de la biogenèse des ribosomes. Des observations en parallèle chez la levure et chez les vertébrés pourraient mettre au jour l'existence de voies de réponse communes suite à des perturbations de la synthèse des ribosomes.

Au-delà des voies moléculaires impliquées, il est intéressant de regarder les réponses cellulaires des CSH suite à la délétion de *Nle* : les CSH entrent en cycle, ne sont pas arrêtées en G1, et ne meurent pas par apoptose, contrairement aux phénotypes classiquement observés dans les cellules en culture soumises à un stress ribosomique. Rappelons-nous que les CSH sont majoritairement quiescentes : les voies de réponse à un stress ribosomique ne pourraient-elles pas être différentes en fonction de l'état de prolifération des cellules ? On peut se demander si la perte des CSH observée suite à la délétion de *Nle* pourrait être expliquée par l'induction de leur différenciation de façon prématurée, comme cela a été montré dans le cas d'un stress irradiant (Wang et al., 2012). Nous essaierons de valider cette hypothèse, par exemple en utilisant un rapporteur de la différenciation lymphoïde, ou en analysant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation dans les CSH déficientes pour *Nle*. Nous pourrons regarder si des mécanismes moléculaires similaires à ceux décrits dans l'étude de J.Wang entrent en jeu, à savoir l'activation d'un point de contrôle dépendant du facteur de transcription *Batf*, de façon indépendante de p53. L'ensemble de ces projets pourra permettre de documenter la réponse à des perturbations de la biogenèse des ribosomes dans les CSH. En parallèle avec les études récentes mettant en évidence l'existence d'une réponse différentielle des cellules souches et des cellules différenciées suite à des dommages à l'ADN, il est possible qu'au sein du système hématopoïétique, les cellules souches soient équipées de systèmes de réponses au stress ribosomique qui leur seraient spécifiques afin de maintenir leurs propriétés de cellules souches.

2. Des cellules qui semblent non affectées par la délétion de *Nle*

Etant donnés le rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes chez la souris, et le fait que c'est un acteur unique et essentiel chez la levure, il est très surprenant de constater que certaines cellules ne semblent pas affectées par la délétion de *Nle*. Ainsi, l'embryon précoce, déplété de stocks maternels et zygotiques de *Nle* se développe jusqu'au moment de l'implantation, suggérant que les cellules de l'embryon précoce n'ont pas besoin de *Nle*. De plus, lorsque ces embryons sont mis en culture à E3.5, les cellules du trophectoderme ne semblent pas affectées. *In vivo*, ces cellules sont capables de s'implanter et d'induire la réaction décidiuale, suggérant qu'elles sont bien fonctionnelles. De plus, l'invalidation de *Nle* au début de la phase de croissance de l'ovocyte n'empêche pas la formation d'ovocytes matures et fécondables. Par ailleurs, *ex vivo*, la délétion de *Nle* dans des fibroblastes embryonnaires murins ou dans des cellules ES en cours de différenciation ne semble pas affecter qualitativement ces cellules. Des caractérisations moléculaires et des analyses de la prolifération et de

la traduction seront nécessaires pour confirmer l'absence de phénotype dans ces cellules. Dans le système hématopoïétique, j'ai également montré que les progéniteurs myéloïdes *ex vivo* et les cellules du lignage B *in vivo* pouvaient survivre, proliférer, et se différencier en absence de *Nle*. La persistance sur plusieurs semaines des cellules lymphoïdes B et T matures déficientes pour *Nle* dans le sang des chimères compétitives indiquent également que ces cellules différenciées peuvent survivre sans *Nle*.

Suite à l'observation de l'absence de phénotype drastique dans ces cellules, je me suis demandée si la délétion de *Nle* pouvait conférer un désavantage sélectif à ces cellules, de façon similaire aux phénotypes « minute ». Chez la drosophile, les phénotypes « minute » sont induits par l'haploinsuffisance de certaines RP et sont caractérisés par des retards de développement et une réduction de la viabilité et de la fertilité. Au niveau cellulaire, une diminution de la synthèse protéique est observée, avec un ralentissement du cycle cellulaire. Dans des situations de chimères somatiques, les cellules haploinsuffisantes pour des RP sont désavantagées par rapport à des cellules contrôles (Lambertsson, 1998). Des phénotypes similaires ont été observés chez la souris *Bst/+* porteuse à l'état hétérozygote d'une délétion du gène *Rpl24* (Oliver et al., 2004). Il serait intéressant de savoir si la délétion de *Nle* pourrait induire des phénotypes similaires chez la souris, par exemple en comparant le cycle cellulaire et les niveaux de traduction des cellules B sauvages et déficientes pour *Nle*. Des approches de chimères compétitives dans le système hématopoïétique pourront permettre de tester de façon plus spécifique le comportement des cellules B déficientes pour *Nle* en présence de cellules sauvages.

Néanmoins, dans une situation non compétitive, ces cellules ne semblent pas affectées par la délétion de *Nle*. A partir de nos résultats, quelques réflexions peuvent nous aider à développer des hypothèses pour expliquer les différences de sensibilité à la délétion de *Nle* en fonction du type cellulaire. Tout d'abord, il n'est pas possible d'exclure formellement l'existence de fonctions extra-ribosomiques pour *Nle*, qui pourraient être indispensables spécifiquement dans certains types cellulaires. Néanmoins, les défauts de biogenèse des ribosomes et l'induction d'une réponse au stress ribosomique bien décrits dans les cellules ES Nle^{cKO}, et suggérés dans les CSH indiquent que le rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes peut être essentiel. Pour la suite, je chercherai donc à comprendre comment le rôle de *Nle* dans la biogenèse des ribosomes peut être différentiellement requis en fonction du type cellulaire.

Il est tout d'abord essentiel d'analyser en parallèle le rôle de *Nle* et la prolifération cellulaire. La biogenèse des ribosomes et la prolifération sont des processus régulés de façon coordonnée. On peut s'attendre de façon raisonnable à ce que *Nle* et donc la biogenèse des ribosomes soient plus particulièrement importants dans des cellules en prolifération que dans des cellules post-mitotiques. Les CSH sont majoritairement quiescentes et sont affectées par la délétion de *Nle*, alors que les progéniteurs myéloïdes et les progéniteurs B semblent proliférer normalement sans *Nle*, *ex vivo* et *in vivo* respectivement, suggérant que le rôle essentiel de *Nle* n'est pas forcément associé à la prolifération. En ce qui concerne les progéniteurs B, la délétion de *Nle* par la Cre exprimée sous le

contrôle du promoteur CD19 est un processus progressif au cours de la différenciation, comme il a été décrit par exemple pour le gène de l'ADN polymérase β (Rickert et al., 1997). Les progéniteurs pré-B commencent à exprimer le gène *Cd19*, néanmoins, la délétion n'est pas totale à ce stade fortement prolifératif (*cf.* PCR sur la Figure 5C de l'article). La PCR ne révèle pas une contre sélection forte des cellules ayant échappé à la délétion à ce stade et le nombre de cellules B immatures dans la moelle osseuse n'est pas diminué dans les souris CD19-Nle^{KO}. Dans le but de confirmer que les cellules du lignage B peuvent proliférer en absence de *Nle*, nous pourrons induire la prolifération de ces cellules, soit par stimulation des progéniteurs à l'IL7 *ex vivo*, soit par immunisation de la souris avec un antigène *in vivo* : l'expansion clonale des cellules B matures pourra alors être suivie dans la rate. Ces expériences devraient permettre de renforcer notre affirmation que le rôle de *Nle* n'est pas associé avec la prolifération des cellules. En parallèle, la biogenèse des ribosomes et la croissance cellulaire sont également intimement liées. Même si cette étude doit être approfondie, l'observation que l'ovocyte en croissance semble se passer de *Nle* suggère aussi que le rôle de *Nle* n'est pas associé rigoureusement à la croissance cellulaire.

Nous nous sommes demandés si les cellules non affectées par la délétion de *Nle* ne présentaient pas de défauts de biogenèse des ribosomes, ou si elles n'étaient pas sensibles à ces défauts. Les expériences de FISH sur les cellules B ne m'ont pas permis de détecter une accumulation du marquage its2 dans ces cellules, suggérant que la délétion de *Nle* n'induit pas de défauts de la synthèse de la grande sous-unité ribosomique dans ces cellules. Il est toutefois important de considérer que des défauts pourraient avoir lieu, mais ne pas être détectés par cette approche, peut-être à cause d'un plus faible niveau basal d'its2 dans ces cellules. La délétion de *Nle* pourrait induire des défauts plus légers dans les cellules B que dans les CSH, ou des défauts ne provoquant pas l'accumulation d'its2. L'analyse du statut de p53 pourrait nous aider à compléter cette étude. En effet, on peut imaginer que la détection de l'activation de p53 soit plus sensible que la détection de l'accumulation d'its2, ou que l'analyse de p53 nous permette de détecter la présence de défauts n'induisant pas une accumulation d'its2. Si néanmoins, comme nous le supposons, la délétion de *Nle* n'induit pas de perturbations de la biogenèse des ribosomes, une accumulation de p53 ne sera pas attendue dans les cellules B déficientes pour *Nle*.

Nous favorisons alors l'hypothèse de l'existence d'une biogenèse de la grande sous-unité ribosomique indépendante de *Nle* dans les cellules B et dans les cellules non affectées par la délétion de *Nle*. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que des cellules en prolifération (les progéniteurs B par exemple) et des cellules à forte croissance (l'ovocyte) ont très probablement une biogenèse des ribosomes active et semblent pouvoir se passer de *Nle*. Nous nous sommes demandés dans un premier temps si une redondance fonctionnelle avait lieu dans certaines cellules, et notamment dans les cellules B. *Nle* ne présente pas d'homologue, cependant, nous nous sommes intéressés au gène *Wdr12* codant pour une protéine à domaines WD40, et présentant un domaine N-terminal proche de celui de *Nle*. Une compensation fonctionnelle entre *Nle* et *Wdr12* est peu probable si l'on considère

les données décrites chez la levure : en effet, il a été montré chez cette espèce que Ytm1/WDR12 et Rsa4/NLE interviennent de façon successive et non redondante au cours de la maturation de la grande sous-unité. Cependant, ce point mérite d'être examiné chez la souris. Des analyses précises sur les niveaux d'expression de *Nle* et de *Wdr12* au niveau transcriptionnel et protéique dans les cellules B pourront dans un premier temps indiquer si la délétion de *Nle* induit une surexpression de *Wdr12*. Une approche fonctionnelle de surexpression de *Wdr12* dans des cellules ES déficientes pour *Nle* est par ailleurs actuellement envisagée au laboratoire. Enfin, une souris portant un allèle conditionnel de *Wdr12* sera bientôt disponible *via* le consortium EUCOMM. Il sera très intéressant de comparer les phénotypes induits par la perte de fonction de *Wdr12* et de *Nle* dans le système hématopoïétique et dans le lignage B. Au-delà d'une stricte redondance fonctionnelle, des voies alternatives indépendantes de *Nle* pourraient être mises en place dans les cellules B. Il faut noter ici que la protéine NLE est très probablement exprimée dans les cellules B, des questions peuvent se poser alors sur son rôle dans ces cellules (*cf.* le western blot sur des cellules de la rate, Figure S3D de l'article). Est-ce qu'une voie de biogenèse des ribosomes dépendante de *Nle* est active dans les cellules B ? Vérifier si la protéine NLE est associée aux particules pré-ribosomiques aidera à répondre à cette question. Est-ce que d'autres fonctions sont attribuables à NLE, et quelles pourraient-elles être ? L'hypothèse de voies alternatives de synthèse des ribosomes peut être mise en relation avec les données récentes suggérant l'existence de ribosomes hétérogènes, auxquels pourraient être attribuées des spécificités fonctionnelles pour leur rôle dans la traduction. Si cette hypothèse se confirme, nous serons alors amenés à nous interroger sur la synthèse de ces ribosomes hétérogènes. Il serait alors intéressant de se demander si des voies alternatives de biogenèse des ribosomes pourraient permettre la génération de ribosomes différents. Dans ce cadre-là, nous pourrons nous intéresser aux ribosomes formés par des voies de synthèse dépendantes ou indépendantes de *Nle*. Des approches protéiques pourraient être envisagées au niveau cellulaire pour documenter la composition des ribosomes dans différents types cellulaires, et par exemple dans des cellules affectées ou non par la délétion de *Nle*.

3. Des relations particulières entre cellules souches et ribosomes ?

Comme nous venons d'en discuter, nos résultats présentés dans l'article suggèrent que des voies de biogenèse des ribosomes dépendantes de *Nle* sont spécifiquement requises dans les CSH et les progéniteurs, alors que des voies alternatives indépendantes de *Nle* pourraient être utilisées dans des cellules plus différenciées. De plus, les quantifications des marquages its1 et its2 en FISH dans des souris contrôles suggèrent également l'existence de différences quantitatives ou qualitatives dans la biogenèse des ribosomes dans les CSH et les progéniteurs. Ces résultats pourraient refléter des spécificités de la biogenèse des ribosomes dans les CSH et les progéniteurs. D'une façon plus générale, ces données nous amènent à nous demander si des relations particulières existent entre la

régulation des cellules souches et la biogenèse des ribosomes. Nous avons vu dans l'introduction que des données parcellaires dans la littérature suggèrent que certains acteurs de la biogenèse des ribosomes sont plus fortement exprimés dans les cellules souches. Cependant, *in vivo*, et notamment dans les CSH, la biogenèse des ribosomes est très peu décrite. Des spécificités intrinsèques aux CSH ont été mises en évidence ces dernières années, et certaines nous intéressent particulièrement ici. Les régulations par la voie Akt/mTOR et par le facteur de transcription Myc sont essentielles pour le maintien des CSH. Les voies mTOR et Myc interviennent dans des régulations croisées de la croissance et de la biogenèse des ribosomes, on peut donc s'interroger sur le rôle de la biogenèse des ribosomes dans les régulations des CSH induites par mTOR et Myc.

Des données obtenues dans le laboratoire ou en collaboration indiquent que *Nle* pourrait être requis pour le maintien d'autres types de cellules souches. Chez l'adulte, des approches d'invalidation conditionnelle dans l'épithélium intestinal, dans le lignage mélanocytaire ou dans les cellules satellites du muscle squelettique ont été entreprises. La délétion conditionnelle de *Nle in vivo* dans l'épithélium intestinal provoque des perturbations très rapides du compartiment des cellules souches avec en particulier des modifications de l'expression des marqueurs des cellules souches. Dans un deuxième temps, une apoptose accrue, une diminution de la prolifération et un biais de la différenciation vers le lignage sécrétoire ont été observés dans la crypte, suggérant une atteinte de l'homéostasie des progéniteurs immatures (Sarah Beck-Cormier, Aline Stedman). Dans le lignage mélanocytaire, *Nle* est important pour le développement et le maintien des mélanoblastes. Au cours de la vie embryonnaire, une apoptose accrue dans le lignage mélanocytaire induit des défauts de pigmentation. Chez l'adulte, les souris sont sujettes à un blanchiment accéléré, suggérant des défauts de maintien des cellules souches des mélanocytes. Une différenciation prématurée des cellules souches pourrait expliquer une partie de ce phénotype (Geneviève Aubin-Houzelstein). Enfin, des études préliminaires dans les cellules du muscle squelettique indiquent que la délétion de *Nle* dans des fibres musculaires en culture induit des défauts de prolifération et un retard dans la différenciation des cellules satellites activées (Barbara Gayraud-Morel). Ainsi, *Nle* semble jouer un rôle essentiel dans les cellules immatures de plusieurs lignages. Est-ce que *Nle* joue un rôle dans la biogenèse des ribosomes dans ces cellules ? Est-ce qu'un stress ribosomique est induit suite à la délétion de *Nle* ? Comment ces cellules y répondent-elles ? En parallèle à la réponse à un stress irradiant, on peut supposer qu'en fonction du tissu, les cellules souches répondent différemment à un stress ribosomique. Enfin, au vu des résultats obtenus dans le système hématopoïétique, il serait intéressant de regarder si les cellules différenciées peuvent se passer de *Nle*, et en particulier si des progéniteurs différenciés peuvent survivre et proliférer en absence de *Nle*. Dans les cultures *ex vivo* de cellules du muscle squelettique, la délétion de *Nle* dans des myoblastes ne perturbe pas leur différenciation ; il n'est pas clair aujourd'hui si la prolifération des progéniteurs engagés dans la différenciation est affectée suite à la délétion de *Nle*. Des études *in vivo* viendront compléter ces résultats. Enfin, la présence de tâches pigmentées dans les souris invalidées pour *Nle* dans le lignage mélanocytaire suggère que certains mélanocytes sont

présents. Vérifier que ces cellules sont effectivement délétées pour *Nle* serait important pour conclure que des mélanocytes peuvent survivre en absence de *Nle*.

De plus en plus de données suggèrent que les ribosomes peuvent avoir un rôle régulateur et pas seulement constitutif dans la cellule. L'analyse de nos données suggère que la biogenèse des ribosomes également pourrait participer à la régulation des cellules, et particulièrement dans les cellules souches. Cette idée n'est peut être pas étonnante : il est connu que d'autres grandes machineries cellulaires, au-delà de leur rôle basique, participent à la régulation de l'expression génique. C'est le cas de la machinerie d'épissage, ou du remodelage de la chromatine *via* des modifications des histones. Les modèles disponibles au laboratoire et les résultats obtenus sur le rôle du gène *Nle* aideront à approfondir ces hypothèses.

4. Conclusion

En conclusion, je souhaite revenir à la définition de la cellule souche proposée au début de ce manuscrit. Mon travail de thèse suggère qu'au sein du système hématopoïétique, des cellules souches, des progéniteurs ou des cellules différenciées pourraient mettre en place des voies de biogenèse des ribosomes différentes ou des voies de réponses à des stress ribosomiques différentes. L'ensemble de ces propriétés intrinsèques pourraient participer à la régulation, et ainsi à la définition des CSH. Des travaux à venir permettront d'analyser plus en profondeur la réponse des CSH au stress induit par la délétion de *Nle*. Il est toujours délicat de découpler la régulation de la biogenèse des ribosomes de celles de la croissance et de la prolifération ; toutefois, l'étude des relations entre la biogenèse des ribosomes et les propriétés de quiescence, de métabolisme, d'auto-renouvellement, de multipotentialité des CSH permettra de définir plus précisément des particularités de la biogenèse des ribosomes dans les CSH. Les études sur la régulation de la biogenèse des ribosomes *in vivo* sont récentes. La biogenèse des ribosomes commence à être étudiée chez les mammifères, mais très peu de données sont disponibles sur la régulation de ce processus *in vivo*, et en particulier dans des types cellulaires différents. L'approche de FISH sur des ARNr couplée à des marquages hématopoïétiques que j'ai développée peut être un outil pour appréhender ces questions *in vivo* dans le système hématopoïétique. De façon complémentaire, des études sur l'expression des différents acteurs de la biogenèse des ribosomes, l'analyse des temps de demi-vie des ribosomes, et des données protéomiques sur la composition des ribosomes en fonction des types cellulaires pourront apporter de nouvelles informations sur la gestion de la biogenèse des ribosomes dans les cellules souches.

Références bibliographiques

Abbas, H. A., Maccio, D. R., Coskun, S., Jackson, J. G., Hazen, A. L., Sills, T. M., You, M. J., Hirschi, K. K., and Lozano, G. (2010). Mdm2 Is Required for Survival of Hematopoietic Stem Cells / Progenitors via Dampening of ROS-Induced p53 Activity. Cell Stem Cell *7*, 606–617.

Abujarour, R., Efe, J., and Ding, S. (2010). Genome-wide gain-of-function screen identifies novel regulators of pluripotency. Stem Cells *28*, 1487–1497.

Akala, O. O., and Clarke, M. F. (2006). Hematopoietic stem cell self-renewal. Current Opinion in Genetics & Development *16*, 496–501.

Akala, O. O., Park, I.-K., Qian, D., Pihalja, M., Becker, M. W., and Clarke, M. F. (2008). Long-term haematopoietic reconstitution by Trp53-/-p16Ink4a-/-p19Arf-/- multipotent progenitors. Nature *453*, 228–232.

Allsopp, R. C., Morin, G. B., DePinho, R., Harley, C. B., and Weissman, I. L. (2003). Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. Blood *102*, 517–520.

Alter, B. P., Baerlocher, G. M., Savage, S. a, Chanock, S. J., Weksler, B. B., Willner, J. P., Peters, J. a, Giri, N., and Lansdorp, P. M. (2007). Very short telomere length by flow fluorescence in situ hybridization identifies patients with dyskeratosis congenita. Blood *110*, 1439–1447.

Amsterdam, A., Sadler, K. C., Lai, K., Farrington, S., Bronson, R. T., Lees, J. A., and Hopkins, N. (2004). Many Ribosomal Protein Genes Are Cancer Genes in Zebrafish. PLoS biology *2*, e139.

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

Ayrault, O., Andrique, L., Larsen, C.-J., and Seite, P. (2004). Human Arf tumor suppressor specifically interacts with chromatin containing the promoter of rRNA genes. Oncogene *23*, 8097–8104.

Ball, S. (2011). Diamond Blackfan anemia. American Society of Hematology *2011*, 487–491.

Barlow, J. L., Drynan, L. F., Hewett, D. R., Holmes, L. R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A. L., Jolin, H. E., Pannell, R., Middleton, A. J., Wong, S. H., et al. (2010). A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. Nature medicine *16*, 59–66.

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

Bassler, J., Grandi, P., Gadal, O., Leßmann, T., Petfalski, E., Tollervey, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S Preribosomal Particle that Is Closely Linked to Nuclear Export. Molecular cell *8*, 517–529.

Bassler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M., and Hurt, E. (2010). The AAA-ATPase Rea1 drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly. Molecular Cell *38*, 712–721.

Beerman, I., Bhattacharya, D., Zandi, S., Sigvardsson, M., Weissman, I. L., Bryder, D., and Rossi, D. J. (2010). Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. PNAS *107*, 5465–5470.

Belin, S., Beghin, A., Solano-Gonzàlez, 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.

Bellodi, C., Kopmar, N., and Ruggero, D. (2010). Deregulation of oncogene-induced senescence and p53 translational control in X-linked dyskeratosis congenita. The EMBO journal *29*, 1865–1876.

Belyi, V. a, Ak, P., Markert, E., Wang, H., Hu, W., Puzio-Kuter, A., and Levine, A. J. (2010). The origins and evolution of the p53 family of genes. Cold Spring Harbor perspectives in biology *2*, a001198.

Bender, C. F., Sikes, M. L., Sullivan, R., Huye, L. E., Le Beau, M. M., Roth, D. B., Mirzoeva, O. K., Oltz, E. M., and Petrini, J. H. J. (2002). Cancer predisposition and hematopoietic failure in Rad50(S/S) mice. Genes & development *16*, 2237–2251.

Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D., and Iscove, N. N. (2010). Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cells with Extended but Time-Limited Reconstitution Potential. Cell Stem Cell *6*, 48–58.

Bertwistle, D., Sugimoto, M., and Sherr, C. J. (2004). Physical and Functional Interactions of the Arf Tumor Suppressor Protein with Nucleophosmin / B23. Molecular and cellular biology *24*, 985–996.

Betschinger, J., Mechtler, K., and Knoblich, J. A. (2006). Asymmetric Segregation of the Tumor Suppressor Brat Regulates Self-Renewal in Drosophila Neural Stem Cells. Cell *124*, 1241–1253.

Bhat, K. P., Itahana, K., Jin, A., and Zhang, Y. (2004). Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. The EMBO journal *23*, 2402–2412.

Bondar, T., and Medzhitov, R. (2010). p53-Mediated Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Competition. Cell stem cell *6*, 309–322.

Bonnet, D., and Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nature medicine *3*, 730–737.

Bortoluzzi, S., D'Alessi, F., Romualdi, C., and Danieli, G. a (2001). Differential expression of genes coding for ribosomal proteins in different human tissues. Bioinformatics *17*, 1152–1157.

Brack, A. S., and Rando, T. A. (2012). Tissue-Specific Stem Cells: Lessons from the Skeletal Muscle Satellite Cell. Cell Stem Cell *10*, 504–514.

Brunori, M., and Gilson, E. (2005). Télomère et cancer: quoi de plus à la fin? M/S: médecine sciences *21*, 37–42.

Byrne, M. E. (2009). A role for the ribosome in development. Trends in plant science *14*, 512–519.

Calvi, L. M., Adams, G. B., Weibrecht, K. W., Weber, J. M., Olson, D. P., Knight, M. C., Martin, R. P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F. R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature *425*, 841–846.

Carlone, D. L., and Breault, D. T. (2012). Tales from the crypt: the expanding role of slow cycling intestinal stem cells. Cell stem cell *10*, 2–4.

Challen, G. A., Boles, N. C., Chambers, S. M., and Goodell, M. A. (2010). Distinct Hematopoietic Stem Cell Subtypes Are Differentially Regulated by TGF-b1. Cell Stem Cell *6*, 265–278.

Challen, G. a, and Little, M. H. (2006). A side order of stem cells: the SP phenotype. Stem cells *24*, 3–12.

Challen, G. a, Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J. S., Bock, C., Vasanthakumar, A., Gu, H., Xi, Y., et al. (2012). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nature genetics *44*, 23–31.

Chantha, S., Gray-mitsumune, M., Houde, J., and Matton, D. P. (2010). The MIDASIN and NOTCHLESS genes are essential for female gametophyte development in Arabidopsis thaliana. Physiology and Molecular Biology of plants *16*, 3–18.

Chantha, S., and Matton, D. P. (2007). Underexpression of the plant NOTCHLESS gene , encoding a WD-repeat protein , causes pleitropic phenotype during plant development. Planta *225*, 1107–1120.

Chantha, S.-C., Emerald, B. S., and Matton, D. P. (2006). Characterization of the plant Notchless homolog, a WD repeat protein involved in seed development. Plant molecular biology *62*, 897–912.

Chen, C., Liu, Y., Liu, R., Ikenoue, T., Guan, K.-L., Liu, Y., and Zheng, P. (2008a). TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. The Journal of experimental medicine *205*, 2397–2408.

Chen, J., Ellison, F. M., Keyvanfar, K., Omokaro, S. O., Desierto, M. J., Eckhaus, M. A., and Young, N. S. (2008b). Enrichment of hematopoietic stem cells with SLAM and LSK markers for the detection of hematopoietic stem cell function in normal and Trp53 null mice. Experimental Hematology *36*, 1236–1243.

Cheng, T. (2000). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Maintained by p21cip1/waf1. Science *287*, 1804–1808.

Cheshier, S. H., Morrison, S. J., Liao, X., and Weissman, I. L. (1999). In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. PNAS *96*, 3120–3125.

Chow, D. C., Wenning, L. a, Miller, W. M., and Papoutsakis, E. T. (2001). Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. Biophysical journal *81*, 685–696.

Cicalese, A., Bonizzi, G., Pasi, C. E., Faretta, M., Ronzoni, S., Giulini, B., Brisken, C., Minucci, S., Di Fiore, P. P., and Pelicci, P. G. (2009). The Tumor Suppressor p53 Regulates Polarity of Self-Renewing Divisions in Mammary Stem Cells. Cell *138*, 1083–1095.

Colón-Ramos, D. a, Shenvi, C. L., Weitzel, D. H., Gan, E. C., Matts, R., Cate, J., and Kornbluth, S. (2006). Direct ribosomal binding by a cellular inhibitor of translation. Nature structural & molecular biology *13*, 103–111.

Cormier, S., Le Bras, S., Souilhol, C., Vandormael-Pournin, S., Durand, B., Babinet, C., Baldacci, P., and Cohen-Tannoudji, M. (2006). The Murine Ortholog of Notchless , a Direct Regulator of the Notch Pathway in Drosophila melanogaster , Is Essential for Survival of Inner Cell Mass Cells. Molecular and cellular biology *26*, 3541–3549.

Cormier, S., Vandormael-Pournin, S., Babinet, C., and Cohen-Tannoudji, M. (2004). Developmental expression of the Notch signaling pathway genes during mouse preimplantation development. Gene expression patterns : GEP *4*, 713–717.

de la Cruz, J., Sanz-martinez, E., and Remacha, M. (2005). The essential WD-repeat protein Rsa4p is required for rRNA processing and intra-nuclear transport of 60S ribosomal subunits. Nucleic Acids Research *33*, 5728–5739.

Dai, M.-S., Arnold, H., Sun, X.-X., Sears, R., and Lu, H. (2007). Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. The EMBO journal *26*, 3332–3345.

Danet, G. H., Pan, Y., Luongo, J. L., Bonnet, D. A., and Simon, M. C. (2003). Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. The Journal of Clinical Investigation *112*, 126–135.

Danilova, N., Sakamoto, K. M., and Lin, S. (2008). Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family. Blood *112*, 5228–5237.

Deisenroth, C., and Zhang, Y. (2010). Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. Oncogene *29*, 4253–4260.

Derenzini, M., Montanaro, L., Chillà, A., Tosti, E., Vici, M., Barbieri, S., Govoni, M., Mazzini, G., and Treré, D. (2005). Key role of the achievement of an appropriate ribosomal RNA complement for G1-S phase transition in H4-II-E-C3 rat hepatoma cells. Journal of cellular physiology *202*, 483–491.

Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Montanaro, L., Sirri, V., and Ochst, R. L. (1998). Nucleolar Function and Size in Cancer Cells. American Journal of Pathology *152*, 1291–1297.

Ding, L., Saunders, T. L., Enikolopov, G., and Morrison, S. J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. Nature *481*, 457–462.

Donati, G., Bertoni, S., Brighenti, E., Vici, M., Treré, D., Volarevic, S., Montanaro, L., and Derenzini, M. (2011a). The balance between rRNA and ribosomal protein synthesis up- and downregulates the tumour suppressor p53 in mammalian cells. Oncogene *30*, 3274–3288.

Donati, G., Brighenti, E., Vici, M., Mazzini, G., Treré, D., Montanaro, L., and Derenzini, M. (2011b). Selective inhibition of rRNA transcription downregulates E2F-1: a new p53-independent mechanism linking cell growth to cell proliferation. Journal of cell science *124*, 3017–3028.

Dowling, R. J. O., Topisirovic, I., Alain, T., Bidinosti, M., Fonseca, B. D., Petroulakis, E., Wang, X., Larsson, O., Selvaraj, A., Liu, Y., et al. (2010). mTORC1-mediated cell proliferation, but not cell growth, controlled by the 4E-BPs. Science *328*, 1172–1176.

Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T. N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., et al. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. Nature genetics *21*, 169–175.

Drygin, D., Rice, W. G., and Grummt, I. (2010). The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. Annual review of pharmacology and toxicology *50*, 131–156.

Du, Y.-C. N., and Stillman, B. (2002). Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. Cell *109*, 835–848.

Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., Wilson, F. H., Currie, T., Khanna-Gupta, A., Berliner, N., et al. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. Blood *117*, 2567–2576.

Dykstra, B., Kent, D., Bowie, M., Mccaffrey, L., Hamilton, M., Lyons, K., Lee, S., Brinkman, R., and Eaves, C. (2007). Long-Term Propagation of Distinct Hematopoietic Differentiation Programs In Vivo. Cell stem cell *1*, 218–229.

Dykstra, B., Olthof, S., Schreuder, J., Ritsema, M., and de Haan, G. (2011). Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. The Journal of experimental medicine *208*, 2691–2703.

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.

Essers, M. A. G., Offner, S., Blanco-bose, W. E., Waibler, Z., Kalinke, U., Duchosal, M. A., and Trumpp, A. (2009). IFNa activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. Nature *458*, 904–908.

Fichelson, P., Moch, C., Ivanovitch, K., Martin, C., Sidor, C. M., Lepesant, J., Bellaiche, Y., and Huynh, J.-R. (2009). Live-imaging of single stem cells within their niche reveals that a U3snoRNP component segregates asymmetrically and is required for self-renewal in Drosophila. Nature cell biology *11*, 685–693.

Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., and Cavazzana-Calvo, M. (2010). 20 years of gene therapy for SCID. Nature immunology *11*, 457–460.

Forsberg, E. C., Passegué, E., Prohaska, S. S., Wagers, A. J., Koeva, M., Stuart, J. M., and Weissman, I. L. (2010). Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells. PloS one *5*, e8785.

Fortunel, N. O., Otu, H. H., Ng, H.-H., Chen, J., Mu, X., Chevassut, T., Li, X., Joseph, M., Bailey, C., Hatzfeld, J. a, et al. (2003). Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". Science *302*, 393; author reply 393.

Foudi, A., Hochedlinger, K., Buren, D. V., Schindler, J. W., Jaenisch, R., Carey, V., and Hock, H. (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. Nature Biotechnology *27*, 84–90.

Fromont-racine, M., Senger, B., Saveanu, C., and Fasiolo, F. (2003). Ribosome assembly in eukaryotes. Gene *313*, 17–42.

Fuchs, G., Diges, C., Kohlstaedt, L. a, Wehner, K. a, and Sarnow, P. (2011). Proteomic analysis of ribosomes: translational control of mRNA populations by glycogen synthase GYS1. Journal of molecular biology *410*, 118–130.

Fumagalli, S., Cara, A. D., Neb-gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G. F., Bernardi, R., Pandolfi, P. P., and Thomas, G. (2009). Absence of nucleolar disruption after impairment of 40s ribosome biogenesis reveals an rpl11-translation- dependent mechanism of p53 induction. Nature cell biology *11*, 501–508.

Fumagalli, S., Ivanenkov, V. V., Teng, T., and Thomas, G. (2012). Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. Genes & Development *26*, 1028–1040.

Gan, B., Sahin, E., Jiang, S., Sanchez-Aguilera, A., Scott, K. L., Chin, L., Williams, D. a, Kwiatkowski, D. J., and DePinho, R. a (2008). mTORC1-dependent and -independent regulation of stem cell renewal, differentiation, and mobilization. PNAS *105*, 19384–19389.

Gavin, A.-C., Bösche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A.-M., Cruciat, C.-M., et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. Nature *415*, 141–147.

Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G. S., Brunet, F., Ereskovsky, A. V., Degnan, B. M., Borchiellini, C., Vervoort, M., and Renard, E. (2009). Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. BMC evolutionary biology *9*, 1–27.

Goodell, M. A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A. S., and Mulligan, R. C. (1996). Isolation and Functional Properties of Murine Hematopoietic Stem Cells that are Replicating In Vivo. Journal of Experimental Medicine *183*, 1797–1806.

Grimm, T., Hölzel, M., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2006). Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. Nucleic Acids Research *34*, 3030–3043.

Gunderson, J. H., Sogin, M. L., Wolletr, G., Hollingdale, M., de la Cruz, V. F., Waters, A. P., and McCutchan, T. F. (1987). Structurally distinct, stage-specific ribosomes occur in Plasmodium. Science *238*, 933–937.

de Haan, G., Nijhof, W., and Van Zant, G. (1997). Mouse strain-dependent changes in frequency and proliferation of hematopoietic stem cells during aging: correlation between lifespan and cycling activity. Blood *89*, 1543–1550.

Hameyer, D., Loonstra, A., Eshkind, L., Schmitt, S., Groen, A., Bindels, E., Jonkers, J., Krimpenfort, P., Rijswijk, L., Bex, A., et al. (2007). Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a

conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. Physiological Genomics *31*, 32–41.

Hamra, F. K., Schultz, N., Chapman, K. M., Grellhesl, D. M., Cronkhite, J. T., Hammer, R. E., and Garbers, D. L. (2004). Defining the spermatogonial stem cell. Developmental Biology *269*, 393–410.

Haneline, L. S., White, H., Yang, F.-C., Chen, S., Orschell, C., Kapur, R., and Ingram, D. A. (2006). Genetic reduction of class IA PI-3 kinase activity alters fetal hematopoiesis and competitive repopulating ability of hematopoietic stem cells in vivo. Blood *107*, 1375–1382.

Hannan, K., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaug, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G. A., Pearson, R. B., et al. (2003). mTOR-Dependent Regulation of Ribosomal Gene Transcription Requires S6K1 and Is Mediated by Phosphorylation of the Carboxy-Terminal Activation Domain of the Nucleolar Transcription Factor UBF. Molecular and cellular biology *23*, 8862–8877.

Harris, B. Y. A. W., Pinkert, C. A., Crawford, M., Langdon, W. Y., Brinster, R. L., and Adams, J. M. (1988). The E mu-myc transgenic mouse A Model for High-incidence Spontaneous Lymphoma and Leukemia of Early B Cells. Journal of Experimental Medicine *167*, 353–371.

Hermitte, F., Brunet de la Grange, P., Belloc, F., Praloran, V., and Ivanovic, Z. (2006). Very low O2 concentration (0.1%) favors G0 return of dividing CD34+ cells. Stem cells *24*, 65–73.

Higashi, A. Y., Ikawa, T., Muramatsu, M., Economides, A. N., Niwa, A., Okuda, T., Murphy, A. J., Rojas, J., Heike, T., Nakahata, T., et al. (2009). Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreERT2. The Journal of Immunology *182*, 5633–5640.

Hoareau-aveilla, C., Henry, Y., and Leblanc, T. (2008). La dyskératose congénitale. M/S : médecine sciences *24*, 390–398.

Hock, H., Hamblen, M. J., Rooke, H. M., Schindler, J. W., Saleque, S., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (2004a). Gfi-1 restricts proliferation and preserves functional integrity of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 2–7.

Hock, H., Meade, E., Medeiros, S., Schindler, J. W., Valk, P. J. M., Fujiwara, Y., and Orkin, S. H. (2004b). Tel / Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. Genes & Development *18*, 2336–2341.

Holley, C. L., Olson, M. R., Colón-Ramos, D. a, and Kornbluth, S. (2002). Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition. Nature cell biology *4*, 439–444.

Horos, R., Ijspeert, H., Pospisilova, D., Sendtner, R., Andrieu-Soler, C., Taskesen, E., Nieradka, A., Cmejla, R., Sendtner, M., Touw, I. P., et al. (2012). Ribosomal deficiencies in Diamond-Blackfan anemia impair translation of transcripts essential for differentiation of murine and human erythroblasts. Blood *119*, 262–272.

Hölzel, M., Rohrmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G. W., et al. (2005). Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1–Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. Journal of cell biology *170*, 367–378.

Iadevaia, V., Caldarola, S., Tino, E., Amaldi, F., and Loreni, F. (2008). All translation elongation factors and the e, f, and h subunits of translation initiation factor 3 are encoded by 5'-terminal oligopyrimidine (TOP) mRNAs. RNA *14*, 1730–1736.

Iadevaia, V., Huo, Y., Zhang, Z., Foster, L. J., and Proud, C. G. (2012). Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis. Biochemical Society transactions *40*, 168–172.

Iadevaia, V., Zhang, Z., Jan, E., and Proud, C. G. (2011). mTOR signaling regulates the processing of pre-rRNA in human cells. Nucleic acids research *40*, 2527–2539.

Inomata, K., Aoto, T., Binh, N. T., Okamoto, N., Tanimura, S., Wakayama, T., Iseki, S., Hara, E., Masunaga, T., Shimizu, H., et al. (2009). Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. Cell *137*, 1088–1099.

Itahana, K., Bhat, K. P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R., and Zhang, Y. (2003). Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. Molecular cell *12*, 1151–1164.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., Ikeda, Y., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. Nature *431*, 997–1002.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. Nature medicine *12*, 446–451.

Ivanova, N. B., Dimos, J. T., Schaniel, C., Hackney, J. a, Moore, K. a, and Lemischka, I. R. (2002). A stem cell molecular signature. Science *298*, 601–604.

Jang, Y.-Y., and Sharkis, S. J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. Blood *110*, 3056–3063.

Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H. E., Saito, Y., Waring, M. T., Dombkowski, D. M., Cheng, T., DePinho, R. a, Sharpless, N. E., and Scadden, D. T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. Nature *443*, 421–426.

Jones, N. C., Lynn, M. L., Gaudenz, K., Sakai, D., Aoto, K., Rey, J.-P., Glynn, E. F., Ellington, L., Du, C., Dixon, J., et al. (2008). Prevention of the neurocristopathy Treacher Collins syndrome through inhibition of p53 function. Nature medicine *14*, 125–133.

Jorgensen, P., Nishikawa, J. L., Breitkreutz, B.-J., and Tyers, M. (2002). Systematic Identification of Pathways That Couple Cell Growth and Division in Yeast. Science *297*, 395–400.

Jude, C. D., Climer, L., Xu, D., Artinger, E., Fisher, J. K., and Ernst, P. (2007). Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. Cell stem cell *1*, 324–337.

Juntilla, M. M., Patil, V. D., Calamito, M., Joshi, R. P., Birnbaum, M. J., and Koretzky, G. a. (2010). AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. Blood *115*, 4030–4038.

Kaelin, W. G., and Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Molecular cell *30*, 393–402.

Kai, T., Williams, D., and Spradling, a (2005). The expression profile of purified Drosophila germline stem cells. Developmental Biology *283*, 486–502.

Kajiume, T., Ninomiya, Y., Ishihara, H., Kanno, R., and Kanno, M. (2004). Polycomb group gene mel-18 modulates the self-renewal activity and cell cycle status of hematopoietic stem cells. Experimental hematology *32*, 571–578.

Kantidakis, T., Ramsbottom, B. a, Birch, J. L., Dowding, S. N., and White, R. J. (2010). mTOR associates with TFIIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *107*, 11823–11828.

Kato, Y., Iwama, A., Tadokoro, Y., Shimoda, K., Minoguchi, M., Akira, S., Tanaka, M., Miyajima, A., Kitamura, T., and Nakauchi, H. (2005). Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. The Journal of experimental medicine *202*, 169–179.

Keel, S. B., Doty, R. T., Yang, Z., Quigley, J. G., Chen, J., Knoblaugh, S., Kingsley, P. D., De Domenico, I., Vaughn, M. B., Kaplan, J., et al. (2008). A heme export protein is required for red blood cell differentiation and iron homeostasis. Science *319*, 825–828.

Kent, D. G., Copley, M. R., Benz, C., Wöhrer, S., Dykstra, B. J., Ma, E., Cheyne, J., Zhao, Y., Bowie, M. B., Zhao, Y., et al. (2009). Prospective isolation and molecular characterization of hematopoietic stem cells with durable self-renewal potential. Blood *113*, 6342–6350.

Kharas, M. G., Okabe, R., Ganis, J. J., Gozo, M., Khandan, T., Paktinat, M., Gilliland, D. G., and Gritsman, K. (2010). Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. Blood *115*, 1406–1415.

Kiel, M. J., He, S., Ashkenazi, R., Gentry, S. N., Teta, M., Kushner, J. A., Jackson, T. L., and Morrison, S. J. (2007a). Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. Nature *449*, 238–242.

Kiel, M. J., Radice, G. L., and Morrison, S. J. (2007b). Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. Cell stem cell *1*, 204–217.

Kiel, M. J., Yilmaz, O. H., Iwashita, T., Yilmaz, O. H., Terhorst, C., and Morrison, S. J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell *121*, 1109–1121.

Kim, H. D., Kim, T.-S., and Kim, J. (2011). Aberrant ribosome biogenesis activates c-Myc and ASK1 pathways resulting in p53-dependent G1 arrest. Oncogene *30*, 3317–3327.

Kippin, T. E., Martens, D. J., and van der Kooy, D. (2005). P21 Loss Compromises the Relative Quiescence of Forebrain Stem Cell Proliferation Leading To Exhaustion of Their Proliferation Capacity. Genes & development *19*, 756–767.

Klionsky, D. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. Nature Reviews Molecular Cell Biology *8*, 931–937.

Komili, S., Farny, N. G., Roth, F. P., and Silver, P. a (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. Cell *131*, 557–571.

Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C. R., Shimizu, K., Hsieh, A. C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. Cell *145*, 383–397.

Kranc, K. R., Schepers, H., Rodrigues, N. P., Bamforth, S., Villadsen, E., Ferry, H., Bouriez-jones, T., Sigvardsson, M., Bhattacharya, S., Jacobsen, S. E., et al. (2009). Cited2 Is an Essential Regulator of Adult Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell *5*, 659–665.

Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J. (2010). Driving ribosome assembly. Biochimica et biophysica acta *1803*, 673–683.

Krishnamurthy, P., Ross, D. D., Nakanishi, T., Bailey-Dell, K., Zhou, S., Mercer, K. E., Sarkadi, B., Sorrentino, B. P., and Schuetz, J. D. (2004). The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. The Journal of biological chemistry *279*, 24218–24225.

Kubota, Y., Takubo, K., and Suda, T. (2008). Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. Biochemical and biophysical research communications *366*, 335–339.

Köhler, A., Schmithorst, V., Filippi, M.-D., Ryan, M. a, Daria, D., Gunzer, M., and Geiger, H. (2009). Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. Blood *114*, 290–298.

Kühn, R., Schwenk, F., Aguet, M., and Rajewsky, K. (1995). Inducible gene targeting in mice. Science *269*, 1427–1429.

Lacorazza, H. D., Yamada, T., Liu, Y., Miyata, Y., Sivina, M., Nunes, J., and Nimer, S. D. (2006). The transcription factor MEF / ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. Cancer Cell *9*, 175–187.

Lai, K., Amsterdam, A., Farrington, S., Bronson, R. T., Hopkins, N., and Lees, J. a (2009). Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish. Developmental dynamics *238*, 76–85.

Lambertsson (1998). The Minute genes in drosophila and their molecular functions. Advances in Genetics *38*, 69–134.

Lapik, Y. R., Fernandes, C. J., Lau, L. F., and Pestov, D. G. (2004). Physical and Functional Interaction between Pes1 and Bop1 in Mammalian Ribosome Biogenesis. Molecular cell *15*, 17–29.

Laurenti, E., Varnum-finney, B., Wilson, A., Ferrero, I., Blanco-bose, W. E., Ehninger, A., Knoepfler, P. S., Cheng, P., Macdonald, H. R., Eisenman, R. N., et al. (2008). Hematopoietic Stem Cell Function and Survival Depend on c-Myc and N-Myc Activity. Cell Stem Cell *3*, 611–624.

Lessard, F., Morin, F., Ivanchuk, S., Langlois, F., Stefanovsky, V., Rutka, J., and Moss, T. (2010). The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. Molecular cell *38*, 539–350.

Leung, C. G., Xu, Y., Mularski, B., Liu, H., Gurbuxani, S., and Crispino, J. D. (2007). Requirements for survivin in terminal differentiation of erythroid cells and maintenance of hematopoietic stem and progenitor cells. The Journal of Experimental Medicine *204*, 1603–1611.

Li, J. (2011). Quiescence regulators for hematopoietic stem cell. Experimental hematology *39*, 511–520.

Li, M., He, Y., Dubois, W., Wu, X., Shi, J., and Huang, J. (2012). Distinct Regulatory Mechanisms and Functions for p53-Activated and p53-Repressed DNA Damage Response Genes in Embryonic Stem Cells. Molecular cell *46*, 30–42.

Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S. J., Murphy, M. E., Appella, E., and Xu, Y. (2005). p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. Nature cell biology *7*, 165–171.

Lindström, M. S. (2011). NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling. Biochemistry Research International *2011*, 1–16.

Liu, J., Cao, L., Chen, J., Song, S., Lee, I. H., Quijano, C., Liu, H., Keyvanfar, K., Chen, H., Cao, L.-Y., et al. (2009a). Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. Nature *459*, 387–392.

Liu, Y., Elf, S. E., Miyata, Y., Sashida, G., Liu, Y., Huang, G., Di Giandomenico, S., Lee, J. M., Deblasio, A., Menendez, S., et al. (2009b). P53 Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence. Cell stem cell *4*, 37–48.

Loewith, R., and Hall, M. N. (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. Genetics *189*, 1177–1201.

Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H. B., Allak, B. A., Drunen, E. V., Kanaar, R., Berns, A., and Jonkers, J. (2001). Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. PNAS *98*, 9209–9214.

Lopes, A. M., Miguel, R. N., Sargent, C. a, Ellis, P. J., Amorim, A., and Affara, N. a (2010). The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. BMC molecular biology *11*, 1–12.

Lord, B. I., Testa, N. G., and Hendry, J. H. (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. Blood *46*, 65–72.

MacCallum, D. E., and Hall, P. A. (2000). The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. The Journal of pathology *190*, 537–544.

MacInnes, A. W., Amsterdam, A., Whittaker, C. a, Hopkins, N., and Lees, J. a (2008). Loss of p53 synthesis in zebrafish tumors with ribosomal protein gene mutations. PNAS *105*, 10408–10413.

Macias, E., Jin, A., Deisenroth, C., Bhat, K., Mao, H., Lindström, M. S., and Zhang, Y. (2010). An ARF-independent c-MYC-activated tumor suppression pathway mediated by ribosomal protein-Mdm2 Interaction. Cancer cell *18*, 231–243.

Mandal, P. K., Blanpain, C., and Rossi, D. J. (2011). DNA damage response in adult stem cells: pathways and consequences. Nature reviews. Molecular cell biologys *12*, 198–202.

Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. Blood *97*, 3333–3341.

Marshall, L., Kenneth, N. S., and White, R. J. (2008). Elevated tRNA(iMet) synthesis can drive cell proliferation and oncogenic transformation. Cell *133*, 78–89.

Marusyk, A., Porter, C. C., Zaberezhnyy, V., and DeGregori, J. (2010). Irradiation selects for p53-deficient hematopoietic progenitors. PLoS biology *8*, e1000324.

Maryanovich, M., Oberkovitz, G., Niv, H., Vorobiyov, L., Zaltsman, Y., Brenner, O., Lapidot, T., Jung, S., and Gross, A. (2012). The ATM-BID pathway regulates quiescence and survival of haematopoietic stem cells. Nature cell biology *14*, 535–541.

Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K. I. (2011). P57 Is Required for Quiescence and Maintenance of Adult Hematopoietic Stem Cells. Cell stem cell *9*, 262–271.

Mauro, V. P., and Edelman, G. M. (2007). The ribosome filter redux. Cell Cycle *6*, 2246–2251.

Mayer, C., and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. Oncogene *25*, 6384–6391.

Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. Genes & development *18*, 423–434.

McConkey, E. H., and Hauber, E. J. (1975). Evidence for Heterogeneity of Ribosomes within the HeLa Cell. The Journal of biological chemistry, 1311–1318.

McGowan, K. a, Li, J. Z., Park, C. Y., Beaudry, V., Tabor, H. K., Sabnis, A. J., Zhang, W., Fuchs, H., de Angelis, M. H., Myers, R. M., et al. (2008). Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. Nature genetics *40*, 963–970.

Meletis, K., Wirta, V., Hede, S.-M., Nistér, M., Lundeberg, J., and Frisén, J. (2006). P53 Suppresses the Self-Renewal of Adult Neural Stem Cells. Development *133*, 363–369.

Meyuhas, O., and Dreazen, A. (2009). Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. 1st ed. (Elsevier Inc.).

Miharada, K., Karlsson, G., Rehn, M., Rörby, E., Siva, K., Cammenga, J., and Karlsson, S. (2011). Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. Cell stem cell *9*, 330–344.

Miller, C. L., Dykstra, B., and Eaves, C. J. (2008). Characterization of mouse hematopoietic stem and progenitor cells. (JohnWiley & Sons, Inc.).

Milyavsky, M., Gan, O. I., Trottier, M., Komosa, M., Tabach, O., Notta, F., Lechman, E., Hermans, K. G., Eppert, K., Konovalova, Z., et al. (2010). A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. Cell Stem Cell *7*, 186–197.

Min, I. M., Pietramaggiori, G., Kim, F. S., Passegué, E., Stevenson, K. E., and Wagers, A. J. (2008). The transcription factor EGR1 controls both the proliferation and localization of hematopoietic stem cells. Cell stem cell *2*, 380–391.

Miyamoto, K., Araki, K. Y., Naka, K., Arai, F., Takubo, K., Yamazaki, S., Matsuoka, S., Miyamoto, T., Ito, K., Ohmura, M., et al. (2007). Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. Cell stem cell *1*, 101–112.

Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M. R., Barry-holson, K., Le Beau, M. M., Morrison, C. G., and Passegue, E. (2010). Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis. Cell Stem Cell *7*, 174–185.

Mohyeldin, A., Garzón-Muvdi, T., and Quiñones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. Cell stem cell *7*, 150–161.

Montanaro, L., Calienni, M., Bertoni, S., Rocchi, L., Sansone, P., Storci, G., Santini, D., Ceccarelli, C., Taffurelli, M., Carnicelli, D., et al. (2010). Novel dyskerin-mediated mechanism of p53 inactivation through defective mRNA translation. Cancer research *70*, 4767–4777.

Montgomery, R. K., Carlone, D. L., Richmond, C. a, Farilla, L., Kranendonk, M. E. G., Henderson, D. E., Baffour-Awuah, N. Y., Ambruzs, D. M., Fogli, L. K., Algra, S., et al. (2011). Mouse telomerase reverse transcriptase (mTert) expression marks slowly cycling intestinal stem cells. PNAS *108*, 179–184.

Morales, M., Theunissen, J.-W. F., Kim, C. F. B., Kitagawa, R., Kastan, M. B., and Petrini, J. H. J. (2005). The Rad50S allele promotes ATM-dependent DNA damage responses and suppresses ATM deficiency: implications for the Mre11 complex as a DNA damage sensor. Genes & development *19*, 3043–3054.

Morgado-palacin, L., Llanos, S., and Serrano, M. (2012). Ribosomal stress induces L11- and p53-dependent apoptosis in mouse pluripotent stem cells. cell cycle *11*, 1–8.

Morita, Y., Ema, H., and Nakauchi, H. (2010). Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. The Journal of experimental medicine *207*, 1173–1182.

Morris, R. J., Liu, Y., Marles, L., Yang, Z., Trempus, C., Li, S., Lin, J. S., Sawicki, J. a, and Cotsarelis, G. (2004). Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. Nature biotechnology *22*, 411–417.

Morrison, S. J., Prowse, K. R., Ho, P., and Weissman, I. L. (1996a). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. Immunity *5*, 207–216.

Morrison, S. J., Wandycz, A. M., Akashi, K., Globerson, A., and Weissman, I. L. (1996b). The aging of hematopoietic stem cells. Nature medicine *2*, 1011–1016.

Mortensen, M., Soilleux, E. J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A. J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S.-E. W., et al. (2011). The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. The Journal of experimental medicine *208*, 455–467.

Muller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Karlsson, L., Huang, J.-F., and Sieburg, H. B. (2004). Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. Blood *103*, 4111–4118.

Murphy, M. J., Wilson, A., and Trumpp, A. (2005). More than just proliferation: Myc function in stem cells. Trends in cell biology *15*, 128–137.

Nadano, D., Notsu, T., Matsuda, T., and Sato, T. (2002). A human gene encoding a protein homologous to ribosomal protein L39 is normally expressed in the testis and derepressed in multiple cancer cells. Biochimica et biophysica acta *1577*, 430–436.

Naka, K., and Hirao, A. (2011). Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. International journal of hematology *93*, 434–439.

Nal, B., Mohr, E., Silva, M. D., Tagett, R., Navarro, C., Carroll, P., Depetris, D., Verthuy, C., Jordan, B. R., and Ferrier, P. (2002). Wdr12 , a Mouse Gene Encoding a Novel WD-Repeat Protein with a Notchless-like Amino-terminal Domain. Genomics *79*, 77–86.

Naora, H., Takai, I., and Adachi, M. (1998). Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis. The Journal of cell biology *141*, 741–453.

Narla, A., and Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. Blood *115*, 3196–3205.

Neumüller, R. A., Betschinger, J., Fischer, A., Bushati, N., Poernbacher, I., Mechtler, K., Cohen, S. M., and Knoblich, J. A. (2008). Mei-P26 regulates microRNAs and cell growth in the Drosophila ovarian stem cell lineage. Nature *454*, 241–245.

Neumüller, R. a, Richter, C., Fischer, A., Novatchkova, M., Neumüller, K. G., and Knoblich, J. a (2011). Genome-wide analysis of self-renewal in Drosophila neural stem cells by transgenic RNAi. Cell stem cell *8*, 580–593.

Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N. P., Crockford, T. L., Cabuy, E., Vindigni, A., et al. (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. Nature *447*, 686–690.

Nissan, T. A., Baûler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. EMBO Journal *21*, 5539–5547.

Oh, W. J., Wu, C., Kim, S. J., Facchinetti, V., Julien, L.-A., Finlan, M., Roux, P. P., Su, B., and Jacinto, E. (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. The EMBO journal *29*, 3939–3951.

Oliver, E. R., Saunders, T. L., Tarlé, S. A., and Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in Belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. Development *131*, 3907–3920.

Opferman, J., Iwasaki, H., Ong, C., Suh, H., Mizuno, S., Akashi, K., and Korsmeyer, S. (2005). Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. Science *307*, 1101–1104.

Orford, K. W., and Scadden, D. T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. Nature reviews. Genetics *9*, 115–128.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-Term Lymphohematopoietic Reconstitution by a Single CD34-Low/Negative Hematopoietic Stem Cell. Science *273*, 242–245.

Oskarsson, T., and Trumpp, A. (2005). The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. Nature cell biology *7*, 215–217.

Ozenne, P., Eymin, B., Brambilla, E., and Gazzeri, S. (2010). The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer. International journal of cancer. Journal international du cancer *127*, 2239–2247.

O'Donohue, M.-F., Choesmel, V., Faubladier, M., Fichant, G., and Gleizes, P. (2010). Functional dichotomy of ribosomal proteins during the synthesis of mammalian 40S ribosomal subunits. Journal of cell biology *190*, 853–866.

Pajerowski, A. G., Shapiro, M. J., Gwin, K., Sundsbak, R., Nelson-Holte, M., Medina, K., and Shapiro, V. S. (2010). Adult hematopoietic stem cells require NKAP for maintenance and survival. Blood *116*, 2684–2693.

Panić, L., Tamarut, S., Sticker-Jantscheff, M., Barkić, M., Solter, D., Uzelac, M., Grabusić, K., and Volarević, S. (2006). Ribosomal protein S6 gene haploinsufficiency is associated with activation of a p53-dependent checkpoint during gastrulation. Molecular and cellular biology *26*, 8880–8891.

Park, I., Qian, D., Kiel, M., Becker, M. W., Pihalja, M., Weissman, I. L., Morrison, S. J., and Clarke, M. F. (2003). Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. Nature *423*, 302–305.

Parmar, K., Kim, J., Sykes, S. M., Shimamura, A., Stuckert, P., Zhu, K., Hamilton, A., Deloach, M. K., Kutok, J. L., Akashi, K., et al. (2010). Hematopoietic stem cell defects in mice with deficiency of Fancd2 or Usp1. Stem cells *28*, 1186–1195.

Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J.-A., Sackstein, R., and Down, J. D. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. PNAS *104*, 5431–5436.

Passegué, E., Wagers, A. J., Giuriato, S., Anderson, W. C., and Weissman, I. L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. Journal of Experimental Medicine *202*, 1599–1611.

Pellagatti, A., Marafioti, T., Paterson, J. C., Barlow, J. L., Drynan, L. F., Giagounidis, A., Pileri, S. a, Cazzola, M., McKenzie, A. N. J., Wainscoat, J. S., et al. (2010). Induction of p53 and up-regulation of the p53 pathway in the human 5q- syndrome. Blood *115*, 2721–2723.

Pestov, D. G., Strezoska, Z., and Lau, L. F. (2001). Evidence of p53-Dependent Cross-Talk between Ribosome Biogenesis and the Cell Cycle : Effects of Nucleolar Protein Bop1 on G 1 / S Transition. Molecular and cellular biology *21*, 4246–4255.

Pich, A., Chiusa, L., and Margaria, E. (2000). Prognostic relevance of AgNORs in tumor pathology. Micron *31*, 133–141.

Pietras, E. M., Warr, M. R., and Passegué, E. (2011). Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. The Journal of cell biology *195*, 709–720.

Provost, E., Wehner, K. a., Zhong, X., Ashar, F., Nguyen, E., Green, R., Parsons, M. J., and Leach, S. D. (2012). Ribosomal biogenesis genes play an essential and p53-independent role in zebrafish pancreas development. Development *139*, 3232–3241.

Qian, Z., Chen, L., Fernald, A. A., Williams, B. O., and Le Beau, M. M. (2008). A critical role for Apc in hematopoietic stem and progenitor cell survival. Journal of Experimental Medicine *205*, 2163–2175.

Quigley, J. G., Yang, Z., Worthington, M. T., Phillips, J. D., Sabo, K. M., Sabath, D. E., Berg, C. L., Sassa, S., Wood, B. L., and Abkowitz, J. L. (2004). Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. Cell *118*, 757–766.

Ramalho-Santos, M., Yoon, S., Matsuzaki, Y., Mulligan, R. C., and Melton, D. a (2002). "Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science *298*, 597–600.

Randall, T. D., and Weissman, I. L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. Blood *89*, 3596–3606.

Rathinam, C., Matesic, L. E., and Flavell, R. a (2011). The E3 ligase Itch is a negative regulator of the homeostasis and function of hematopoietic stem cells. Nature immunology *12*, 399–407.

Rathinam, C., Thien, C. B. F., Langdon, W. Y., Gu, H., and Flavell, R. a (2008). The E3 ubiquitin ligase c-Cbl restricts development and functions of hematopoietic stem cells. Genes & development *22*, 992–997.

Reavie, L., Della Gatta, G., Crusio, K., Aranda-Orgilles, B., Buckley, S. M., Thompson, B., Lee, E., Gao, J., Bredemeyer, A. L., Helmink, B. a, et al. (2010). Regulation of hematopoietic stem cell differentiation by a single ubiquitin ligase-substrate complex. Nature immunology *11*, 207–215.

Reese, J. S., Liu, L., and Gerson, S. L. (2003). Repopulating defect of mismatch repair-deficient hematopoietic stem cells. Blood *102*, 1626–1633.

Rickert, R. C., Roes, J., and Rajewsky, K. (1997). B lymphocyte-specific , Cre-mediated mutagenesis in mice. Nucleic Acids Research *25*, 1317–1318.

Van Riggelen, J., Yetil, A., and Felsher, D. W. (2010). MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. Nature Reviews. Cancer *10*, 301–309.

Rocheteau, P., Gayraud-Morel, B., Siegl-Cachedenier, I., Blasco, M. a, and Tajbakhsh, S. (2012). A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. Cell *148*, 112–125.

Rohrmoser, M., Ho, M., Grimm, T., Malamoussi, A., Harasim, T., Orban, M., Pfisterer, I., Gruber-eber, A., Kremmer, E., and Eick, D. (2007). Interdependence of Pes1 , Bop1 , and WDR12 Controls Nucleolar Localization and Assembly of the PeBoW Complex Required for Maturation of the 60S Ribosomal Subunit. Molecular and cellular biology *27*, 3682–3694.

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. The Journal of biological chemistry *284*, 4968–4977.

Rossi, D. J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., and Weissman, I. L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. Nature *447*, 725–729.

Rossi, D. J., Bryder, D., Zahn, J. M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A. J., and Weissman, I. L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. PNAS *102*, 9194–9199.

Royet, J., Bouwmeester, T., and Cohen, S. M. (1998). Notchless encodes a novel WD40-repeat-containing protein that modulates Notch signaling activity. The EMBO journal *17*, 7351–7360.

Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H. W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C., and DePinho, R. a (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. Cell *96*, 701–712.

Ruggero, D., Grisendi, S., Piazza, F., Rego, E., Mari, F., Rao, P. H., Cordon-Cardo, C., and Pandolfi, P. P. (2003). Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification. Science *299*, 259–262.

Russell, R. C., Fang, C., and Guan, K.-L. (2011). An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology. Development *138*, 3343–3356.

Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. Genes & development *19*, 2199–2211.

Rübe, C. E., Fricke, A., Widmann, T. a, Fürst, T., Madry, H., Pfreundschuh, M., and Rübe, C. (2011). Accumulation of DNA damage in hematopoietic stem and progenitor cells during human aging. PloS one *6*, e17487.

Sablina, A. a, Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E., and Chumakov, P. M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. Nature medicine *11*, 1306–1313.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Sengupta, S., Sheen, J.-H., Hsu, P. P., Bagley, A. F., Markhard, A. L., and Sabatini, D. M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. Molecular cell *22*, 159–168.

Sasaki, M., Kawahara, K., Nishio, M., Mimori, K., Kogo, R., Hamada, K., Itoh, B., Wang, J., Komatsu, Y., Yang, Y. R., et al. (2011). Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. Nature medicine *17*, 944–951.

Sato, T., Onai, N., Yoshihara, H., Arai, F., Suda, T., and Ohteki, T. (2009). Interferon regulatory factor-2 protects quiescent hematopoietic stem cells from type I interferon-dependent exhaustion. Nature medicine *15*, 696–700.

Scherl, A., Coute, Y., Déon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J., Greco, A., Hochstrasser, D., and Diaz, J. (2002). Functional Proteomic Analysis of Human Nucleolus. Molecular Biology of the Cell *13*, 4100 – 4109.

Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., and Pierre, P. (2009). SUnSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. Nature methods *6*, 275–277.

Schnell, U., Dijk, F., Sjollema, K. a, and Giepmans, B. N. G. (2012). Immunolabeling artifacts and the need for live-cell imaging. Nature methods *9*, 152–158.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells *4*, 7–25.

Sedelnikova, O. a, Horikawa, I., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., Bonner, W. M., and Barrett, J. C. (2004). Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. Nature cell biology *6*, 168–170.

Seita, J., and Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell : self-renewal versus differentiation. Wiley Interdisciplinary Reviews Systems Biology and Medecine *2*, 640–653.

Sherr, C. J. (2006). Divorcing ARF and p53: an unsettled case. Nature reviews. Cancer *6*, 663–673.

Simsek, T., Kocabas, F., Zheng, J., Deberardinis, R. J., Mahmoud, A. I., Olson, E. N., Schneider, J. W., Zhang, C. C., and Sadek, H. a (2010). The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. Cell stem cell *7*, 380–390.

Sjöblom, T., Jones, S., Wood, L. D., Parsons, D. W., Lin, J., Barber, T. D., Mandelker, D., Leary, R. J., Ptak, J., Silliman, N., et al. (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. Science *314*, 268–274.

Snippert, H. J., and Clevers, H. (2011). Tracking adult stem cells. EMBO reports *12*, 113–122.

Sotiropoulou, P. a, Candi, A., Mascré, G., De Clercq, S., Youssef, K. K., Lapouge, G., Dahl, E., Semeraro, C., Denecker, G., Marine, J.-C., et al. (2010). Bcl-2 and accelerated DNA repair mediates resistance of hair follicle bulge stem cells to DNA-damage-induced cell death. Nature cell biology *12*, 572–582.

Souilhol, C., Cormier, S., Tanigaki, K., Babinet, C., and Cohen-tannoudji, M. (2006). RBP-J -Dependent Notch Signaling Is Dispensable for Mouse Early Embryonic Development. Molecular and cellular biology *26*, 4769–4774.

Soulier, J. (2011). Fanconi anemia. American Society of Hematology, 492–497.

Spangrude, G. J., Heimfeld, S., and Weissman, I. L. (1988). Purification and characterization of mouse Hematopoietic Stem cells. Science *241*, 58–62.

Strezoska, Z., Pestov, D. G., and Lau, L. F. (2002). Functional Inactivation of the Mouse Nucleolar Protein Bop1 Inhibits Multiple Steps in Pre-rRNA Processing and Blocks Cell Cycle Progression. The Journal of biological chemistry *277*, 29617–29625.

Suda, T., Takubo, K., and Semenza, G. L. (2011). Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. Cell stem cell *9*, 298–310.

Sudo, K., Ema, H., Morita, Y., and Nakauchi, H. (2000). Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. The Journal of experimental medicine *192*, 1273–1280.

Sugihara, Y., Honda, H., Iida, T., Morinaga, T., Hino, S., Okajima, T., Matsuda, T., and Nadano, D. (2010). Proteomic Analysis of Rodent Ribosomes Revealed Heterogeneity Including Ribosomal Proteins L10-like , L22-like 1 , and L39-like. Journal of Proteome Research *9*, 1351–1366.

Sugimoto, M., Kuo, M.-L., Roussel, M. F., and Sherr, C. J. (2003). Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. Molecular cell *11*, 415–424.

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., and Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. Immunity *25*, 977–988.

Taichman, R. S., Reilly, M. J., and Emerson, S. G. (1996). Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. Blood *87*, 518–524.

Takagi, M., Absalon, M. J., McLure, K. G., and Kastan, M. B. (2005). Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin. Cell *123*, 49–63.

Takagi, M., Sueishi, M., Saiwaki, T., Kametaka, A., and Yoneda, Y. (2001). A novel nucleolar protein, NIFK, interacts with the forkhead associated domain of Ki-67 antigen in mitosis. The Journal of biological chemistry *276*, 25386–25391.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663–676.

Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R. S., Hirao, A., Suematsu, M., et al. (2010). Regulation of the HIF-1a Level Is Essential for Hematopoietic Stem Cells. Cell Stem Cell *7*, 391–402.

TeKippe, M., Harrison, D. E., and Chen, J. (2003). Expansion of hematopoietic stem cell phenotype and activity in Trp53-null mice. Experimental hematology *31*, 521–527.

Tesio, M., Golan, K., Corso, S., Giordano, S., Schajnovitz, A., Vagima, Y., Shivtiel, S., Kalinkovich, A., Caione, L., Gammaitoni, L., et al. (2011). Enhanced c-Met activity promotes G-CSF-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells via ROS signaling. Blood *117*, 419–428.

Thompson, B. J., Jankovic, V., Gao, J., Buonamici, S., Vest, A., Lee, J. M., Zavadil, J., Nimer, S. D., and Aifantis, I. (2008). Control of hematopoietic stem cell quiescence by the E3 ubiquitin ligase Fbw7. Journal of Experimental Medicine *205*, 1395–1408.

Till, J., and McCulloch, E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiation Research *14*, 213–222.

Torihara, H., Uechi, T., Chakraborty, A., Shinya, M., Sakai, N., and Kenmochi, N. (2011). Erythropoiesis failure due to RPS19 deficiency is independent of an activated Tp53 response in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anaemia. British journal of haematology *152*, 648–654.

Tothova, Z., and Gilliland, D. G. (2007). FoxO transcription factors and stem cell homeostasis: insights from the hematopoietic system. Cell stem cell *1*, 140–152.

Tothova, Z., Kollipara, R., Huntly, B. J., Lee, B. H., Castrillon, D. H., Cullen, D. E., McDowell, E. P., Lazo-Kallanian, S., Williams, I. R., Sears, C., et al. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. Cell *128*, 325–339.

Tsai, R. Y. L., and McKay, R. D. G. (2002). A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. Genes & development *16*, 2991–3003.

Uechi, T., Nakajima, Y., Nakao, A., Torihara, H., Chakraborty, A., Inoue, K., and Kenmochi, N. (2006). Ribosomal Protein Gene Knockdown Causes Developmental Defects in Zebrafish. PloS One *1*, e37.

Uhmann, A., Dittmann, K., Wienands, J., and Hahn, H. (2009). Comment on "Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreER(T2)". Journal of immunology *183*, 2891; author reply 2891–2.

Ulbrich, C., Diepholz, M., Baßler, J., Kressler, D., Pertschy, B., and Galani, K. (2009). Mechanochemical Removal of Ribosome Biogenesis Factors from Nascent 60S Ribosomal Subunits. Cell *138*, 1–18.

Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., and Lansdorp, P. M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. PNAS *91*, 9857–9860.

Vesper, O., Amitai, S., Belitsky, M., Byrgazov, K., Kaberdina, A. C., Engelberg-Kulka, H., and Moll, I. (2011). Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in Escherichia coli. Cell *147*, 147–157.

Viatour, P., Somervaille, T. C., Venkatasubrahmanyam, S., Kogan, S., McLaughlin, M. E., Weissman, I. L., Butte, A. J., Passegué, E., and Sage, J. (2008). Hematopoietic stem cell quiescence is maintained by compound contributions of the retinoblastoma gene family. Cell stem cell *3*, 416–428.

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 research *23*, 2593–2599.

Volarevic, S. (2000). Proliferation, But Not Growth, Blocked by Conditional Deletion of 40S Ribosomal Protein S6. Science *288*, 2045–2047.

Voutev, R., Killian, D. J., Ahn, J. H., and Hubbard, E. J. A. (2006). Alterations in ribosome biogenesis cause specific defects in C . elegans hermaphrodite gonadogenesis. Developmental Biology *298*, 45–58.

Wagers, A. J., Sherwood, R. I., Christensen, J. L., and Weissman, I. L. (2002). Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. Science *297*, 2256–2259.

Wang, J., Sun, Q., Morita, Y., Jiang, H., Groß, A., Lechel, A., Hildner, K., Guachalla, L. M., Gompf, A., Hartmann, D., et al. (2012). A Differentiation Checkpoint Limits Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal in Response to DNA Damage. Cell *148*, 1001–1014.

Warner, J. R., and McIntosh, K. B. (2009). How common are extraribosomal functions of ribosomal proteins? Molecular cell *34*, 3–11.

van der Wath, R. C., Wilson, A., Laurenti, E., Trumpp, A., and Liò, P. (2009). Estimating dormant and active hematopoietic stem cell kinetics through extensive modeling of bromodeoxyuridine label-retaining cell dynamics. PloS One *4*, e6972.

Weber, J. D. (2000). p53-independent functions of the p19ARF tumor suppressor. Genes & Development *14*, 2358–2365.

Weijers, D., Franke-van Dijk, M., Vencken, R. J., Quint, A., Hooykaas, P., and Offringa, R. (2001). An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. Development *128*, 4289–4299.

Weissman, I. L. (2000). Translating Stem and Progenitor Cell Biology to the Clinic: Barriers and Opportunities. Science *287*, 1442–1446.

Wild, T., Horvath, P., Wyler, E., Widmann, B., Badertscher, L., Kozak, K., Csucs, G., Lund, E., and Kutay, U. (2010). A Protein Inventory of Human Ribosome Biogenesis Reveals an Essential Function of Exportin 5 in 60S Subunit Export. PLoS biology *8*, e1000522.

Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R. C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C. F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. Cell *135*, 1118–1129.

Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., Pasche, A., Knabenhans, C., Macdonald, H. R., and Trumpp, A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. Genes & Development *18*, 2747–2763.

Woolthuis, C. M., de Haan, G., and Huls, G. (2011). Aging of hematopoietic stem cells: Intrinsic changes or micro-environmental effects? Current opinion in immunology *23*, 512–517.

Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M. J., von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., and Larsson, L.-G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. Oncogene *22*, 351–360.

Xue, S., and Barna, M. (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. Nature reviews. Molecular cell biology *13*, 355–369.

Yahata, T., Takanashi, T., Muguruma, Y., Ibrahim, A. A., Matsuzawa, H., Uno, T., Sheng, Y., Onizuka, M., Ito, M., Kato, S., et al. (2011). Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. Blood *118*, 2941–2950.

Yalcin, S., Zhang, X., Luciano, J. P., Mungamuri, S. K., Marinkovic, D., Vercherat, C., Sarkar, A., Grisotto, M., Taneja, R., and Ghaffari, S. (2008). Foxo3 is essential for the regulation of ataxia telangiectasia mutated and oxidative stress-mediated homeostasis of hematopoietic stem cells. The Journal of biological chemistry *283*, 25692–25705.

Yang, A., Shi, G., Zhou, C., Lu, R., Li, H., Sun, L., and Jin, Y. (2011). Nucleolin maintains embryonic stem cell self-renewal by suppression of p53 protein-dependent pathway. The Journal of biological chemistry *286*, 43370–43382.

Yao, L., Yokota, T., Xia, L., Kincade, P. W., and McEver, R. P. (2005). Bone marrow dysfunction in mice lacking the cytokine receptor gp130 in endothelial cells. Blood *106*, 4093–4101.

Yilmaz, O. H., Valdez, R., Theisen, B. K., Guo, W., Ferguson, D. O., Wu, H., and Morrison, S. J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. Nature *441*, 475–482.

Yoon, A., Peng, G., Brandenburger, Y., Brandenburg, Y., Zollo, O., Xu, W., Rego, E., and Ruggero, D. (2006). Impaired control of IRES-mediated translation in X-linked dyskeratosis congenita. Science *312*, 902–906.

Yu, H., Yuan, Y., Shen, H., and Cheng, T. (2006). Hematopoietic stem cell exhaustion impacted by p18 INK4C and p21 Cip1/Waf1 in opposite manners. Blood *107*, 1200–1206.

Yu, Y., Ji, H., Doudna, J. A., and Learry, J. A. (2005). Mass spectrometric analysis of the human 40S ribosomal subunit : Native and HCV IRES-bound complexes. Protein science *14*, 1438–1446.

Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Gröne, H.-J., Schütz, G., and Grummt, I. (2005). Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. Molecular cell *19*, 77–87.

Yuan, Y., Shen, H., Franklin, D. S., Scadden, D. T., and Cheng, T. (2004). In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. Nature cell biology *6*, 436–442.

Zeng, H., Yücel, R., Kosan, C., Klein-Hitpass, L., and Möröy, T. (2004). Transcription factor Gfi1 regulates self-renewal and engraftment of hematopoietic stem cells. The EMBO journal *23*, 4116–4125.

Zeng, Z., Sarbassov, D. D., Samudio, I. J., Yee, K. W. L., Munsell, M. F., Ellen Jackson, C., Giles, F. J., Sabatini, D. M., Andreeff, M., and Konopleva, M. (2007). Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling and inhibit AKT activation in AML. Blood *109*, 3509–3512.

Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L. a, Tan, Y. S., Baek, J. H., Wesley, J. B., Gonzalez, F. J., and Semenza, G. L. (2008). Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. The Journal of biological chemistry *283*, 10892–10903.

Zhang, J., Grindley, J. C., Yin, T., Jayasinghe, S., He, X. C., Ross, J. T., Haug, J. S., Rupp, D., Porter-Westpfahl, K. S., Wiedemann, L. M., et al. (2006). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. Nature *441*, 518–522.

Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Harris, S., Wiedemann, L. M., Mishina, Y., and Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature *425*, 836–841.

Zhang, Q., Xiao, H., Chai, S. C., Hoang, Q. Q., and Lu, H. (2011). Hydrophilic residues are crucial for ribosomal protein L11 (RPL11) interaction with zinc finger domain of MDM2 and p53 protein activation. The Journal of biological chemistry *286*, 38264–38274.

Zhang, Q.-S., Marquez-Loza, L., Eaton, L., Duncan, A. W., Goldman, D. C., Anur, P., Watanabe-Smith, K., Rathbun, R. K., Fleming, W. H., Bagby, G. C., et al. (2010). Fancd2-/- mice have hematopoietic defects that can be partially corrected by resveratrol. Blood *116*, 5140–5148.

Zhang, Y., and Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. Cancer cell *16*, 369–377.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M. N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. Cell *144*, 757–768.

Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K. I., and Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. Cell stem cell *9*, 247–261.

Résumé

De nombreux facteurs régulant la fonction des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) ont été identifiés ces dernières années grâce à des modèles murins. Au cours de ma thèse, j'ai montré que le gène *Notchless* (*Nle*) était nécessaire au maintien des CSH adultes. L'inactivation ubiquitaire de *Nle* chez la souris adulte provoque la mort des souris en une douzaine de jours, précédée d'une disparition rapide des CSH et des progéniteurs multipotents. Suite à la délétion de *Nle*, les CSH entrent en cycle indiquant que *Nle* pourrait être important pour le maintien de la quiescence des CSH. Aucune augmentation de l'apoptose n'a été détectée. Différentes approches de greffes ont montré que *Nle* était requis dans les CSH de façon autonome cellulaire. L'ensemble de ces données a permis de conclure que *Nle* est un régulateur critique du maintien des CSH, à l'homéostasie et en situation de stress. Par ailleurs, des approches *in vivo* et *ex vivo* suggèrent que *Nle* n'est pas requis pour le développement et la survie des cellules B et des progéniteurs myéloïdes.

Des données récentes ont montré que l'orthologue de *Nle* chez la levure était impliqué dans la biogenèse des ribosomes. En utilisant des cellules ES murines, j'ai montré que ce rôle était conservé chez la souris. Par une approche combinée de marquages des cellules hématopoïétiques et de FISH sur les ARNr, j'ai montré que la délétion de *Nle* affectait la biogenèse des ribosomes dans les CSH et les progéniteurs immatures, mais pas dans le lignage B. Dans son ensemble, mon travail de thèse suggère que la synthèse des ribosomes pourrait être spécifiquement régulée en fonction du type cellulaire, et en particulier dans les cellules souches.