



**HAL**  
open science

# Identification d'inhibiteurs du nonsense-mediated mRNA decay (NMD) et utilisation comme approche thérapeutique dans certaines maladies génétiques

Sara Sofia Gonzalez-Hilarion

► **To cite this version:**

Sara Sofia Gonzalez-Hilarion. Identification d'inhibiteurs du nonsense-mediated mRNA decay (NMD) et utilisation comme approche thérapeutique dans certaines maladies génétiques. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S049 . tel-01017363

**HAL Id: tel-01017363**

**<https://theses.hal.science/tel-01017363>**

Submitted on 2 Jul 2014

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

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

UNIVERSITÉ LILLE 2  
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ  
INSTITUT PASTEUR DE LILLE

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ LILLE 2**

Discipline : Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie  
Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par :

**Sara Sofia GONZALEZ-HILARION**

Le 21 Octobre 2011

**Identification d'inhibiteurs du *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) et utilisation comme approche thérapeutique dans certaines maladies génétiques**

Jury :

**Pr. Yves LEMOINE** - Professeur, Université Lille 1

**Dr. James STEVENIN** - Directeur de recherche, Inserm

**Dr. Laurent DELPY** - Chargé de recherche, CNRS

**Dr. Fabrice LEJEUNE** - Chargé de recherche, Inserm

Président

Rapporteur

Rapporteur

Directeur de thèse

*A mi mamá*

*A mi papá*

*A mis hermanas*

*A Gaël*

## **REMERCIEMENTS**

*Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur le Professeur Yves Lemoine, pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Soyez assuré de mes sincères remerciements.*

*Je remercie Monsieur James Stévenin et Monsieur Laurent Delpy d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je vous prie de trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à mon directeur de thèse, Monsieur Fabrice Lejeune, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je te remercie Fabrice pour ton encadrement, ta confiance, ta disponibilité et pour m'avoir fait partager tes connaissances.*

*J'adresse mes remerciements sincères aux institutions qui ont soutenu financièrement ces travaux de thèse : la Région Nord-Pas-de-Calais, l'Inserm et l'Institut Pasteur de Lille.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance aux associations de patients Vaincre la mucoviscidose, La Ligue contre le cancer, la Fondation recherche médicale et l'Association française contre les myopathies, pour l'aide financière et la confiance accordée à ce projet.*

*Un grand merci aux anciens et actuels membres de l'équipe Avenir qui m'ont accompagnée pendant la réalisation de cette thèse. Merci Weronika pour ton amitié, ton soutien et tes conseils pendant le début de ma thèse. Merci Florence pour ton amitié, tes encouragements et ta gentillesse, et je te souhaite bon courage pour la continuation de ta thèse. Merci Nadège pour la bonne humeur que tu as apportée au labo, pour ton aide et ta sympathie.*

*Et bien sûr, merci à mon Gaël. Ou plutôt merci le hasard, qui a voulu qu'une colombienne et un parisien se retrouvent à débiter leurs thèses au même moment à Lille. Nous avons commencé cette aventure ensemble et nous la finissons ensemble. Qui donc mieux que toi pour comprendre ce que cela signifie : la joie d'un bon résultat, la frustration d'un mauvais résultat, les soirs et les weekends au labo, la rédaction... Et aujourd'hui nous voilà prêts (enfin presque) pour des nouvelles aventures. Je te dis mille fois merci d'avoir cru en moi sans relâche, merci pour tout ton soutien, merci de me faire rire toujours, et merci pour ton amour !*

*Un grand merci également à toute ma belle-famille, et tout particulièrement à mes beaux-parents, qui dès le début m'ont accueillie très chaleureusement et m'ont fait toujours sentir comme à la maison, en étant à des milliers de kilomètres de chez moi. Merci du fond du cœur à toute la famille Bories pour toute votre affection, votre soutien et vos encouragements.*

*Y ahora, del otro lado del Atlántico...*

*Un millón de gracias a todos mis amigos y amigas que están en Colombia (bueno algunas en México y Brasil). Especialmente a mi amiga de siempre, Tatiana, y a mis queridas chicas, Mónica, Adriana e Isabel, quiero decirles gracias de todo corazón por comprender y perdonar mis desapariciones y por estar siempre ahí en las buenas y en las malas. Gracias a todas ustedes por tantos buenos momentos compartidos y por todos los que vendrán... ¡Tenemos que ponernos de acuerdo para encontrarnos en alguna esquina del mundo! También a mi amiga Yomara, qué rico que ya nos veremos pronto por aquí ¡hay mucho por adelantar! Por último, gracias de todo corazón a Andrés, siempre has creído en mí y sé que podré contar contigo siempre como tú sabes que podrás contar conmigo, ¡siempre!*

*Muchas gracias a toda mi inmensa familia en Colombia, a los González y a los Hilarión, a mis tíos, tías, primos y primas, a Maritza y a Gloria. Gracias a todos y a todas por apoyarme y por animarme permanentemente a pesar de la distancia. ¡No se imaginan cuánta falta me han hecho las reuniones familiares!*

*Mamita, papito, hermanitas: ¡tengo tantas cosas que agradecerles que tendría que escribir una tesis entera al respecto! Es apenas lógico, porque a ustedes les debo todo. Sólo puedo decirles gracias, gracias y mil veces gracias. Gracias por todos los esfuerzos y sacrificios, gracias por su apoyo incondicional, gracias por su ejemplo, gracias por su confianza a toda prueba en mí, gracias por las toneladas de energía positiva que tanto necesité, gracias por su paciencia y sobre todo, gracias por su amor inmenso. Y en particular con respecto a este trabajo, gracias hermanita por tu invaluable ayuda con los gráficos.*

*Ojalá que la satisfacción de haber culminado esta etapa pueda compensar en parte el sacrificio que ha significado la separación y la lejanía. Esta tesis es para ustedes, como una pequeñísima muestra de mi inmenso amor y mi infinita gratitud. ¡Los amo!*

*¡Y gracias a la vida, que me ha dado tanto!*

## RÉSUMÉ

Le NMD (*nonsense-mediated mRNA decay*) est un mécanisme qui reconnaît et dégrade les ARNm portant un codon stop prématuré afin d'empêcher la synthèse de protéines tronquées qui pourraient avoir des effets néfastes pour la cellule ou tout simplement être non fonctionnelles. Cependant, dans un certain nombre de cas, selon la position du codon stop prématuré, la protéine tronquée qui serait synthétisée si le NMD n'existait pas, pourrait remplir complètement ou partiellement la fonction de la protéine sauvage. Il faut noter qu'un codon stop prématuré est retrouvé dans le gène responsable d'une pathologie dans un tiers des maladies génétiques et de nombreuses formes de cancer. Dans la plus grande majorité des cas, la maladie se développe non pas parce qu'une protéine tronquée non fonctionnelle ou instable est synthétisée, mais plutôt parce que le gène muté n'est pas exprimé du fait de l'intervention du NMD sur l'ARNm qui en dérive. Une nouvelle approche thérapeutique de ces maladies serait d'inhiber le NMD afin de permettre la synthèse de protéines tronquées fonctionnelles et sauver le phénotype clinique. Nous avons donc décidé de rechercher des inhibiteurs du mécanisme du NMD parmi des petites molécules chimiques. Pour cela, nous avons mis au point un système de criblage en culture cellulaire reliant l'efficacité du NMD dans une cellule avec une activité luciférase mesurable directement sur les cultures cellulaires, au moyen d'un luminomètre. A partir d'un premier criblage d'environ 1500 composés chimiques, nous avons identifié une nouvelle molécule capable d'inhiber efficacement le NMD. De façon intéressante, cette nouvelle molécule est capable également d'induire la synthèse de protéines entières à partir d'un ARNm portant un codon stop prématuré. Nous avons utilisé cet inhibiteur dans des expériences pour déterminer son potentiel thérapeutique sur des modèles cellulaires de maladies génétiques tels que la dystrophie musculaire de Duchenne, la mucoviscidose et le cancer. Nos résultats démontrent que l'inhibition du NMD peut être en effet envisagée comme une nouvelle approche thérapeutique pour des maladies causées par l'apparition d'une mutation non sens. Nous avons aussi identifié une autre molécule chimique capable d'inhiber le NMD et permettant de faire un lien entre efficacité du NMD et intégrité du cytosquelette.

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>12</b>
<b>1. La surveillance des ARNm</b> .....	<b>12</b>
1.1. De l'ARN pré-messager à l'ARNm.....	12
1.1.1. La coiffe et la polyadénylation.....	12
1.1.2. L'épissage .....	13
1.1.2.1. L'épissage alternatif.....	14
1.2. La dégradation des ARNm.....	15
1.2.1. La déadénylation et le decapping .....	17
1.2.2. L'exosome.....	18
1.2.3. Les P-bodies.....	18
1.3. Les mécanismes de surveillance des ARNm.....	19
1.3.1. Surveillance co-transcriptionnelle et lors de l'export .....	20
1.3.2. Surveillance co-traductionnelle.....	20
1.3.2.1. Le <i>No-go decay</i> (NGD) .....	21
1.3.2.2. Le <i>Non-stop decay</i> (NSD).....	22
1.3.2.3. Le <i>Nonsense-mediated mRNA decay</i> (NMD).....	23
<b>2. Le mécanisme du NMD</b> .....	<b>25</b>
2.1. Les facteurs du NMD .....	25
2.1.1. Les protéines hUPF .....	25
2.1.1.1. hUPF1.....	26
2.1.1.2. hUPF2.....	27
2.1.1.3. hUPF3 et hUPF3X.....	28
2.1.2. Les protéines SMG .....	29
2.1.2.1. hSMG1, hSMG8 et hSMG9 .....	30
2.1.2.2. hSMG5, hSMG6 et hSMG7 .....	30
2.1.3. Les protéines hNAG et hDHX34.....	31
2.2. Mécanisme de reconnaissance d'un PTC chez les mammifères .....	31
2.2.1. La règle des 50-55 nucléotides .....	31
2.2.2. L'Exon Junction Complex (EJC) .....	33
2.2.3. L'EJC et le NMD.....	34
2.3. L'assemblage du complexe de surveillance .....	35
2.3.1. La reconnaissance d'un PTC nécessite de la traduction .....	35
2.3.2. Reconnaissance des PTC pendant le premier tour de traduction .....	36
2.3.3. La phosphorylation de hUPF1 se fait dans le complexe DECID.....	38
2.3.4. Le rôle de PABPC.....	39
2.3.5. Le rôle de CBP80 .....	41
2.3.6. Conséquences de la phosphorylation d'UPF1 .....	41
2.3.7. La déphosphorylation de hUPF1 et la dégradation de l'ARNm .....	42
2.3.8. Les P-bodies et la dégradation des ARNm soumis au NMD .....	45
2.4. Localisation subcellulaire du NMD.....	45

2.5. Les PTC qui ne suivent pas la règle .....	47
2.6. La reconnaissance des PTC chez les autres eucaryotes .....	48
2.6.1. Le modèle DSE.....	48
2.6.2. Le modèle du faux 3'UTR.....	48
<b>3. Importance physiologique du NMD .....</b>	<b>51</b>
3.1. Origine des codons stop prématurés .....	51
3.2. Les substrats physiologiques du NMD .....	51
3.3. Régulation par épissage alternatif couplé au NMD .....	54
3.4. Le NMD dans la réponse au stress par privation nutritionnelle et au stress oxydatif .....	56
3.5. Le NMD dans le développement lymphocytaire .....	57
3.6. Le NMD dans le développement embryonnaire .....	58
<b>4. Les facteurs du NMD dans d'autres processus cellulaires.....</b>	<b>59</b>
4.1. Le maintien des télomères .....	59
4.2. La stabilité du génome et la progression du cycle cellulaire .....	60
4.3. Le NAS et le SOS .....	61
4.4. Le <i>Staufen-mediated decay</i> .....	64
4.5. Le métabolisme du virus de l'immunodéficience humaine HIV-1 .....	64
<b>5. Les maladies associées aux PTC et approches thérapeutiques .....</b>	<b>66</b>
5.1. Maladies provoquées par des PTC qui échappent au NMD .....	66
5.2. Maladies provoquées par des PTC qui déclenchent le NMD .....	67
5.2.1. La mucoviscidose .....	67
5.2.2. Les dystrophinopathies.....	69
5.2.3. Perte de l'expression de protéines supprimeurs de tumeurs .....	72
5.3. Approches pour la correction des PTC .....	73
5.3.1. Utilisation d'oligoribonucléotides anti-sens .....	74
5.3.1.1. Correction d'épissages aberrants .....	74
5.3.1.2. <i>Exon skipping</i> .....	75
5.3.2. La translecture ou suppression de la terminaison de la traduction.....	77
5.3.2.1. Les ARNt supprimeurs.....	79
5.3.2.2. Les aminoglycosides.....	79
5.3.2.3. Autres composés non-aminoglycosides.....	82
5.3.3. Inhibition du NMD .....	84
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>87</b>
<b>1. Correction de mutations non-sens avec la molécule amlexanox.....</b>	<b>87</b>
1.1. Article 1 : Rescue of nonsense mutations by amlexanox in mammalian cells .....	87
1.2. Principe du criblage.....	124
1.1. Identification de l'amlexanox comme un nouvel inhibiteur du NMD .....	125
1.2. L'amlexanox.....	125
<b>2. Effet de l'altération des filaments d'actine sur le NMD.....</b>	<b>128</b>
2.1. Introduction.....	128
2.2. Résultats.....	129
2.3. Matériels et méthodes supplémentaires.....	135



<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>137</b>
Potentiel thérapeutique de l'amlexanox pour la correction de mutations non-sens .....	137
Facteurs qui peuvent affecter la réponse au traitement .....	140
Inconvénients potentiels d'une thérapie de suppression des PTC .....	144
Développement d'un nouveau système de criblage .....	146
Médecine personnalisée et correction des mutations non-sens.....	147
Les inhibiteurs comme outil pour étudier le mécanisme du NMD et de la translecture .....	149
Le cytosquelette d'actine et le NMD .....	151
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>154</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique du processus de maturation d'un ARNm.....	13
Figure 2. Différents types d'épissage alternatif des ARN pré-messagers.....	15
Figure 3. Les voies de dégradation cytoplasmique des ARNm normaux.....	16
Figure 4. La voie du NGD chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	21
Figure 5. La voie du NSD chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	23
Figure 6. Facteurs du NMD chez les eucaryotes.....	25
Figure 7. Représentation schématique de la structure des protéines hUPF.....	26
Figure 8. Représentation schématique de la structure des protéines hSMG.....	29
Figure 9. Représentation schématique des composants du cœur de l'EJC.....	33
Figure 10. Représentation schématique de l'EJC sur l'ARNm.....	34
Figure 11. Composition de la mRNP avant et après le premier tour de traduction.....	36
Figure 12. Assemblage du complexe de surveillance.....	40
Figure 13. Modèle des voies de dégradation des ARNm soumis au NMD.....	44
Figure 14. Modèle du faux 3'UTR chez <i>S. cerevisiae</i> .....	49
Figure 15. Effet de la déplétion de hUPF1 ou hUPF2 sur le transcriptome.....	52
Figure 16. Caractéristiques des transcrits physiologiques dégradés par NMD.....	53
Figure 17. Autorégulation de l'expression de SC35 par épissage alternatif couplé au NMD.....	55
Figure 18. Autres fonctions des protéines hUPF et hSMG.....	59
Figure 19. Nonsense-associated altered splicing (NAS) et suppression of splicing (SOS).....	63
Figure 20. Représentation de la zone sensible ou insensible au NMD sur un ARNm.....	66
Figure 21. Représentation schématique de la structure de la protéine CFTR.....	68
Figure 22. Représentation schématique de la structure de la protéine dystrophine.....	70
Figure 23. Composition du complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC).....	70
Figure 24. Représentation schématique de la structure de la protéine p53.....	73
Figure 25. Exemple d'exon skipping chez des patients de DMD.....	76
Figure 26. Translecture des PTC par des aminoglycosides.....	80
Figure 27. Principe du criblage permettant d'identifier des inhibiteurs du NMD.....	124
Figure 28. Structure de l'amlexanox.....	126
Figure 29. Effet de l'amlexanox sur le cytosquelette.....	129
Figure 30. Effet des molécules qui altèrent les filaments d'actine sur l'efficacité du NMD.....	130
Figure 31. Effet du jasplakinolide sur les filaments d'actine et l'efficacité du NMD.....	131
Figure 32. Effet du jasplakinolide sur des substrats endogènes du NMD.....	132
Figure 33. Effet du traitement avec jasplakinolide sur les P-bodies.....	133
Figure 34. Mesure de l'efficacité de la traduction en présence de jasplakinolide.....	134
Figure 35. Effet de l'injection d'amlexanox sur l'expression de l'ARNm MOR.....	139
Figure 36. Structure des protéines entières et tronquées dans les lignées cellulaires étudiées.....	143
Figure 37. Principe d'un nouveau système de criblage NMD/Translecture.....	148

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

2OMePS : 2'-O-méthylphosphorothioate  
 aa: acide aminé  
 aa-ARNt : aminoacyl-ARNt  
 ADN : acide désoxyribonucléique  
 AMPc : adénosine monophosphate cyclique  
 ARN : acide ribonucléique  
 ARNi : ARN interférent  
 ARNm : ARN messenger  
 ARNr : ARN ribosomique  
 ARNt : ARN de transfert  
 ATM : *ataxia telangiectasia mutated*  
 ATR : *ATM and Rad3 related*  
 ATP : adénosine triphosphate  
 BMD : dystrophie musculaire de Becker  
 BSA : albumine sérique bovine  
 CBC : *cap binding complex*  
 CFTR : *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*  
 CMH I : complexe majeur d'histocompatibilité I  
 C-ter : C-terminal  
 DBD : *DNA binding domain*  
 DECID : *decay inducing complex*  
 DGC : complexe dystrophine-glycoprotéine  
 DMD : dystrophie musculaire de Duchenne  
 DMSO : diméthylsulfoxyde  
 DNA-PK : *DNA-dependent protein kinase*  
 dNTP : desoxynucléotide triphosphate  
 DSE : *downstream sequence element*  
 EBM : *EJC binding motifs*  
 EGFP : *enhanced green fluorescent protein*  
 EJC : *exon-junction complex*  
 eEF : facteur d'élongation eucaryote  
 eIF : facteur d'initiation eucaryote  
 eRF : facteur de terminaison eucaryote  
 ESE : *exonic splicing enhancer*  
 EST : *expressed sequence tag*  
 GPx1 : glutathion peroxydase 1  
 Ig : immunoglobuline  
 kDa : kiloDalton  
 KO : knockout  
 LMB : leptomycine B  
 m<sup>7</sup>G : N7-méthyl-guanosine  
 mRNP : *messenger ribonucleoprotein*, particule ribonucléoprotéique  
 MUP : *major urinary protein*  
 NAS : *nonsense-associated altered splicing*  
 NBD : *nucleotide-binding domain*  
 NES : *nuclear export signal*  
 NGD : *no-go decay*

NLS : *nuclear localization signal*  
NMD: *nonsense-mediated mRNA decay*  
NMD1 : *nonsense-mediated mRNA decay inhibitor 1*  
NRS : *nuclear retention signal*  
NSD : *non-stop decay*  
NMDI1 : *NMD inhibitor 1*  
nt : nucléotide  
N-ter : N-terminal  
ORF : *open reading frame*, phase ouverte de lecture  
PABP : *poly(A) binding protein*  
pb: paire de bases  
P-bodies : *processing bodies*  
PCR : *polymerase chain reaction*  
PI3KK : *phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*  
PIN : *Pilt N-terminal domain*  
PMO : phosphorodiamidate morpholino  
Poly(A) : poly-adénosine  
PP2A : protéine phosphatase 2A  
PTC : *premature termination codon*, codon stop prématuré  
RRM : *RNA recognition motif*  
RUST : *regulated unproductive splicing and translation*  
SMD : *Staufen-mediated decay*  
SMG : *suppressor with morphogenetic defects on genitalia*  
SOS : *suppression of splicing*  
SQ : sérine/glutamine  
SR : sérine/arginine  
SURF : *SMG1-UPF1-eRF1-eRF3 complex*  
TBS : Tris buffer saline  
TCR : *T-cell receptor*, récepteur  $\beta$  des lymphocytes T  
TPI : triosephosphate isomérase  
TPR : *tetratricopeptide repeats*  
uORF : *upstream open reading frame*  
UPF : *up-frameshift*  
UTR : *untranslated region*, région non traduite  
VSVM : *vesicular stomatitis virus matrix*

---

# INTRODUCTION

## 1. La surveillance des ARNm

Les ARN messagers (ARNm) sont souvent considérés comme des molécules intermédiaires entre l'ADN, support de l'information génétique contenue dans le noyau, et les protéines, support de la fonction du gène. Il n'empêche que les ARNm ont le devoir de transférer l'information génétique de la manière la plus fidèle qu'il soit. Pour cela, les cellules ont développé divers mécanismes de surveillance ou contrôle de qualité des ARNm. Ainsi, tout au long des processus de synthèse, maturation, export et traduction, les ARNm sont vérifiés afin d'assurer que seuls les ARNm correctement maturés sont traduits et ainsi éviter la production de protéines aberrantes qui pourraient avoir des effets délétères pour la cellule voire pour l'organisme.

### 1.1. De l'ARN pré-messager à l'ARNm

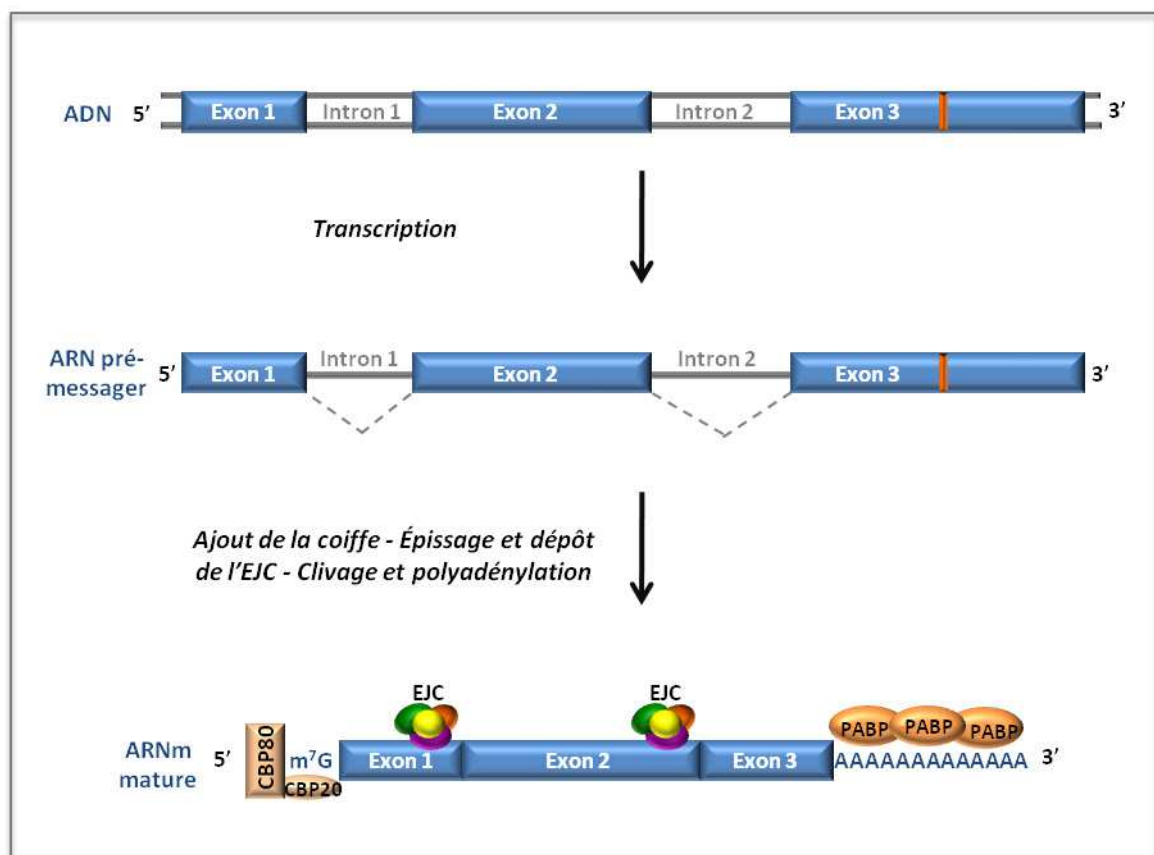
Chez les eucaryotes, l'ADN est transcrit en ARN pré-messager dans le noyau par l'ARN polymérase II. Pendant et après la transcription, l'ARN pré-messager subit plusieurs étapes de maturation afin de donner lieu à l'ARNm mature (Figure 1). Au cours de ces étapes, différentes protéines interagissent avec l'ARNm pour former des particules ribonucléoprotéiques (mRNP) qui évoluent au cours du temps. Ces mRNP sont exportées vers le cytoplasme afin de permettre la traduction de l'ARNm en un polypeptide.

#### 1.1.1. La coiffe et la polyadénylation

Immédiatement après le début de la transcription, lorsque le transcrit compte environ 30 nucléotides (nt), l'extrémité 5' de l'ARNm est protégée de l'action d'exoribonucléases 5' (les enzymes qui dégradent les ARN par l'extrémité 5') par l'ajout d'une coiffe N7-méthylguanosine (m<sup>7</sup>GpppN) (Hocine et al. 2010). Cette coiffe va être reconnue dans le noyau par le *cap binding complex* (CBC), un hétérodimère composé de deux protéines de 80 et 20 kDa (CBP80 et CBP20). Le CBC est reconnu par le complexe du pore nucléaire et permet l'export de l'ARNm vers le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme et après un premier tour de traduction (voir paragraphe 2.3.2), le CBC est remplacé par le facteur d'initiation de la

traduction eIF4E. Ce dernier recrute d'autres facteurs d'initiation nécessaires pour supporter la traduction intensive en protéine (Hocine et al. 2010).

La polyadénylation a lieu après la fin de la transcription, lorsque le signal de polyadénylation (défini par la séquence AAUAAA) est reconnu par un complexe protéique qui va cliver l'ARN pré-messager nouvellement synthétisé et ajouter une queue de polyadénosine d'environ 250 nt dans son extrémité 3'. La queue poly(A) permet le recrutement de protéines spécifiques appelées PABP (*poly(A) binding proteins*) qui protègent l'ARNm de l'attaque d'exoribonucléases 3' et participent aux processus d'export, traduction et dégradation (Shatkin and Manley 2000).



**Figure 1. Représentation schématique du processus de maturation d'un ARNm.**

Les rectangles bleus représentent les exons, le trait orange vertical indique le site de polyadénylation, les traits gris continus représentent les introns et les traits pointillés l'épissage des introns. m<sup>7</sup>G, coiffe N7-méthylguanosine.

### 1.1.2. L'épissage

Pour la plupart des ARNm eucaryotes, un processus de maturation très important a lieu : l'épissage. Ce processus permet l'élimination de certaines régions non codantes, les introns, et la jonction des régions qui seront conservées dans l'ARNm, les exons, afin d'établir

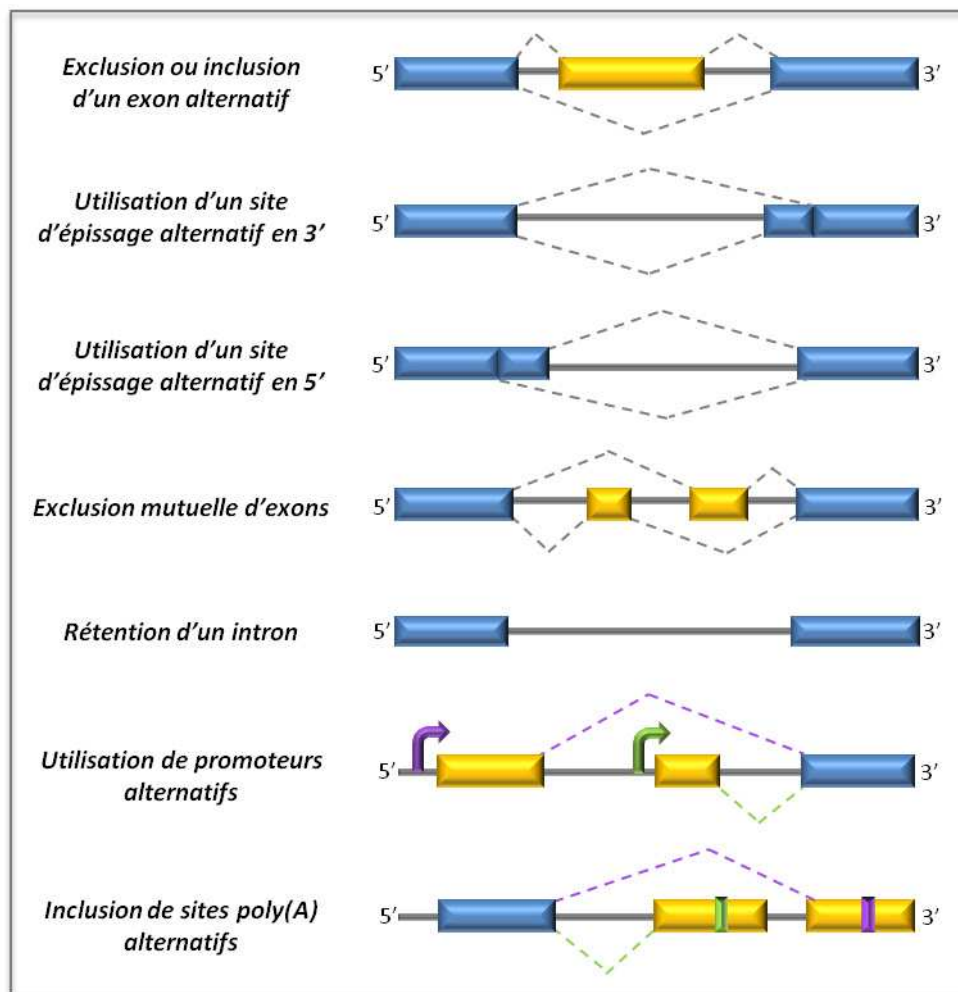
le cadre de lecture dans l'ARNm mature qui permettra la synthèse d'une protéine. Les réactions d'épissage sont catalysées par cinq complexes ribonucléoprotéiques appelés snRNP (*small nuclear ribonucleoproteins*) et plus de cent cinquante protéines associées qui constituent collectivement le spliceosome (Black 2003; Valadkhan and Jaladat 2010). L'épissage implique un remodelage important de la mRNP. En effet, une conséquence de l'épissage chez les organismes multicellulaires est le dépôt d'un complexe protéique en amont de chaque jonction exon-exon appelé *exon junction complex* (EJC) (Le Hir et al. 2000a; Le Hir et al. 2000b). Ce complexe a plusieurs fonctions : il favorise l'export des mRNP vers le cytoplasme (Zhou et al. 2000), il participe à la localisation des ARNm chez la drosophile (Mohr et al. 2001) et, comme nous le verrons dans le chapitre 2, il a un rôle important dans la dégradation des ARNm chez les mammifères par le mécanisme de *nonsense-mediated mRNA decay* (Le Hir et al. 2001b; Gehring et al. 2005). Ces quelques exemples illustrent à quel point les événements précoces lors de la biogenèse des ARNm peuvent avoir un impact sur leur devenir.

#### 1.1.2.1. L'épissage alternatif

L'épissage alternatif est le processus par lequel de multiples ARNm peuvent être générés à partir d'un même ARN pré-messager. Ce processus est considéré comme la source principale de la diversification du protéome (Soller 2006) : un seul gène peut coder pour de multiples isoformes de protéines qui peuvent être différentes du point de vue de leur activité enzymatique, repliement, localisation subcellulaire, modifications post-traductionnelles, affinité pour un ligand, etc. Un exemple extrême d'épissage alternatif est le gène *Dscam* chez *Drosophila melanogaster*, qui peut en théorie produire par épissage alternatif 38.000 ARNm différents (Schmucker et al. 2000).

Plusieurs types d'épissage alternatif ont été décrits (Figure 2) : les exons peuvent être exclus ou inclus, ils peuvent être mutuellement exclusifs, allongés ou raccourcis, et les introns peuvent être retenus partiellement ou totalement dans l'ARNm. Enfin, des exons en 5' et 3' peuvent être inclus ou exclus par l'utilisation de promoteurs ou de sites de polyadénylation alternatifs.

La diversité apportée par ce mécanisme pourrait expliquer la complexité de certains organismes comme l'homme qui a relativement peu de gènes (20.000-25.000) en comparaison avec un organisme comme le nématode *Caenorhabditis elegans* (qui en possède environ 19.000) (Kim et al. 2007a). En effet, on estime qu'environ 95% des gènes multiexoniques chez l'homme subissent au moins un épissage alternatif (Pan et al. 2008) contre environ 25% chez *C. elegans* (Ramani et al. 2011).



**Figure 2. Différents types d'épissage alternatif des ARN pré-messagers.**

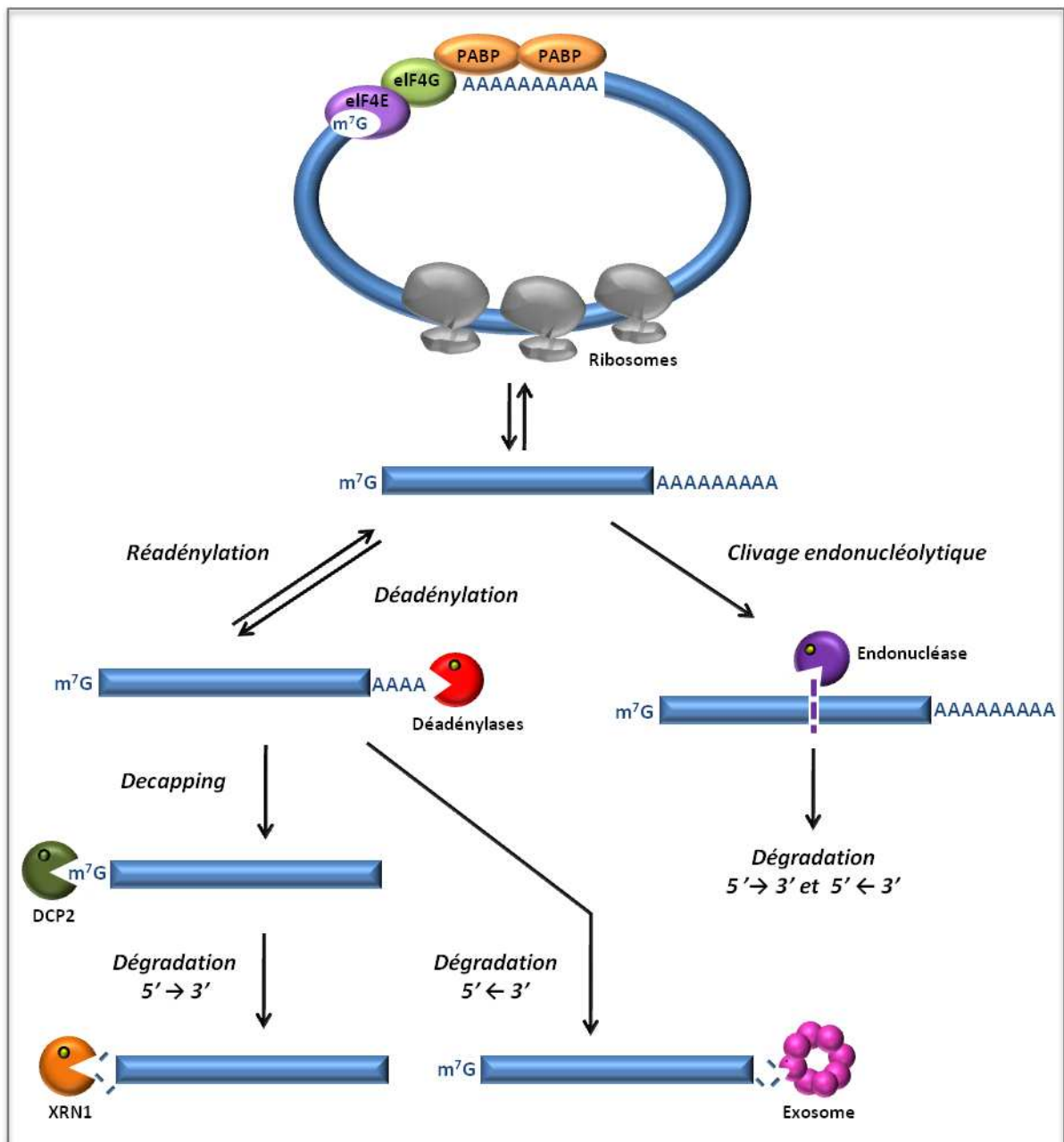
Les rectangles bleus représentent les exons constitutifs, les rectangles jaunes les exons alternatifs. Les traits gris continus représentent les introns et les traits pointillés les différentes possibilités d'épissage alternatif. Les flèches représentent des promoteurs alternatifs et les traits verticaux des sites de polyadénylation alternatifs.

## 1.2. La dégradation des ARNm

Il a été proposé que lorsqu'ils sont activement traduits, les ARNm présentent une configuration circulaire grâce au facteur eIF4G qui établit des interactions avec l'extrémité 5' de l'ARNm via le facteur eIF4E, et l'extrémité 3' de l'ARNm via la protéine PABP (Gallie 1998). Cette disposition augmenterait l'efficacité de la traduction et empêcherait l'accès des facteurs de dégradation à l'ARNm. Lorsque les ARNm doivent être dégradés, cette configuration est déstabilisée et la queue poly(A) est éliminée par le processus de déadénylation. Après cette première étape de déadénylation, deux voies de dégradation sont possibles. Dans la première, qui est la voie majoritaire chez la levure, un complexe de decapping élimine la coiffe 5' et expose le transcrit à la dégradation par les exoribonucléases 5'→3' (Mitchell and Tollervey



2000). Dans la deuxième, qui est la voie majoritaire chez les mammifères, le transcrit déadénylé est dégradé par l'extrémité 3' par les exoribonucléases 3'→5' de l'exosome (Parker and Song 2004). Alternativement, la dégradation peut être aussi initiée par un clivage endonucléolytique qui coupe l'ARNm en deux fragments, en générant des extrémités non protégées et accessibles aux exoribonucléases (Figure 3) (Parker and Song 2004).



**Figure 3. Les voies de dégradation cytoplasmique des ARNm normaux.**

L'ARNm est représenté en bleu en configuration circulaire ou linéaire. Les enzymes de dégradation sont représentées comme des « Pacman ».

### 1.2.1. La déadénylation et le decapping

Chez les eucaryotes, il existe deux complexes protéiques très conservés qui possèdent une activité de déadénylation : le complexe PAN2-PAN3 et le complexe CCR4-CAF1 (Goldstrohm and Wickens 2008). Le decapping ou clivage de la coiffe en 5' est catalysé par le complexe DCP1-DCP2 (*decapping protein*). De façon intéressante, PABP module l'activité des sous-unités catalytiques des complexes de déadénylation et de decapping. En effet, PABP stimule l'activité déadénylase de PAN2 (Uchida et al. 2004) mais inhibe celle de CCR4 (Tucker et al. 2002). Par ailleurs, il semblerait aussi que PABP inhibe l'activité de decapping de DCP2 (Khanna and Kiledjian 2004).

Yamashita et collaborateurs ont proposé un modèle qui suggère un lien fonctionnel entre la déadénylation et le decapping (Yamashita et al. 2005a). Selon ce modèle, la déadénylation se fait en deux phases. D'abord dans un ARNm avec une queue poly(A) longue (>200 nt), les multiples PABP qui y sont associées stimulent la déadénylation par PAN2-PAN3. Comme conséquence du raccourcissement (<110 nt), il y aura moins de PABP sur la queue poly(A), l'activité de PAN2-PAN3 diminue alors que celle de CCR4-CAF1 et de DCP1-DCP2 est stimulée. L'ARNm subit alors une deuxième phase de déadénylation et le decapping peut avoir lieu (Yamashita et al. 2005a). Selon ce modèle, il y aurait un rôle successif des deux complexes de déadénylation qui commencerait par PAN2-PAN3 puis le relais serait pris par le complexe CCR4-CAF1. Par ailleurs, chez plusieurs organismes multicellulaires, on trouve une autre déadénylase, la poly(A) ribonucléase (PARN) qui a la particularité d'être inhibée par PABP mais d'être stimulée par la coiffe 5', ce qui suggère que le substrat préférentiel de PARN serait un ARNm qui n'a pas encore perdu la coiffe mais dont la queue poly(A) n'a plus ou peu de PABP (Goldstrohm and Wickens 2008).

Le complexe DCP1-DCP2 est conservé chez tous les eucaryotes (Coller and Parker 2004). DCP2 porte l'activité catalytique et clive la liaison pyrophosphate entre le premier nucléotide de l'ARNm et la coiffe (Lykke-Andersen 2002; van Dijk et al. 2002; Wang et al. 2002c). DCP1, qui chez les mammifères, présente deux isoformes DCP1a et DCP1b, stimule l'activité catalytique de DCP2 (Lykke-Andersen 2002). Suite au clivage, l'ARNm avec un phosphate libre en 5' est reconnu comme un substrat par les exoribonucléases 5'→3', principalement XRN1 dans le cytoplasme et XRN2 (Rat1 chez la levure) dans le noyau (Coller and Parker 2004). La coiffe m<sup>7</sup>GDP est hydrolysée en m<sup>7</sup>GMP et phosphate par l'enzyme DCP-S (*decapping scavenger*) (Wang and Kiledjian 2001).

### 1.2.2. L'exosome

Après la déadénylation, les ARNm peuvent être dégradés directement par leur extrémité 3' par l'exosome sans passer par l'étape de decapping (Schilders et al. 2006). L'exosome dégrade l'ARNm dans le sens 3'→5' jusqu'à ce qu'il ne reste qu'un oligonucléotide (<10 nt) toujours lié la coiffe, qui est alors hydrolysé par DCP-S (Wang and Kiledjian 2001). L'exosome est composé d'un cœur de neuf exoribonucléases 3'→5' associées à d'autres protéines nécessaires pour son activité nucléolytique dans le noyau et dans le cytoplasme. Dans le cytoplasme, il s'associe à SKI7 et au complexe hétérotrimérique SKI (conformé par SKI2, SKI3 et SKI8) (Brown et al. 2000). Dans le noyau, l'exosome est associé à des protéines comme Rrp6 chez la levure qui jouent un rôle dans la surveillance co-transcriptionnelle (Hilleren et al. 2001). Outre son rôle dans la dégradation des ARNm, l'exosome nucléaire associé au complexe TRAMP est nécessaire pour la maturation des ARN ribosomiaux (ARNr), des petits ARN nucléaires (snRNA) et des petits ARN nucléolaires (snoRNA) (Schilders et al. 2006).

### 1.2.3. Les P-bodies

Les P-bodies (pour *processing bodies*) sont des concentrations cytoplasmiques composées d'ARNm et de protéines principalement impliquées dans la répression traductionnelle ou dans la dégradation des ARNm (Parker and Sheth 2007). Ils ont été mis en évidence par Bashkirov et collaborateurs lorsqu'ils étudiaient la localisation cellulaire de l'exoribonucléase XRN1 dans des fibroblastes murins. En effet, cette protéine est retrouvée dans des petits foyers cytoplasmiques (Bashkirov et al. 1997). Cependant, la signification de cette concentration particulière a été déterminée seulement lorsque plusieurs autres protéines impliquées dans le métabolisme des ARN ont été localisées dans les mêmes foyers.

Les P-bodies ont été retrouvés chez tous les eucaryotes qui ont été étudiés, et bien que leur composition varie d'une espèce à l'autre, on peut identifier un groupe conservé de protéines qui est formé majoritairement par des protéines impliquées dans le decapping, telles que DCP1, DCP2 (Ingelfinger et al. 2002; Lykke-Andersen 2002; van Dijk et al. 2002; Sheth and Parker 2003), les co-activateurs du decapping Ge-1/Hedls et EDC3 (Fenger-Gron et al. 2005; Yu et al. 2005), l'ARN hélicase p54/RCK (Sheth and Parker 2003; Cougot et al. 2004), le complexe heptamérique LSM1-7 (Ingelfinger et al. 2002; Sheth and Parker 2003), et l'exoribonucléase 5'→3' XRN1 (Bashkirov et al. 1997; Ingelfinger et al. 2002; Sheth and Parker 2003). Les complexes de déadénylation CCR4-CAF1 (Sheth and Parker 2003; Cougot et al. 2004) et PAN2-PAN3 (Zheng et al. 2008) sont aussi des composants conservés des P-

bodies. En revanche, aucun composant de l'exosome n'y a été retrouvé, ce qui suggère que les deux voies majeures de dégradation se trouvent spatialement séparées dans le cytoplasme (Kulkarni et al. 2010).

Les P-bodies sont des structures dynamiques et d'autres protéines peuvent y être recrutées ou transiter lors de divers processus du métabolisme des mRNP. Ainsi, on y retrouve des protéines impliquées dans la répression traductionnelle, dans la réponse antivirale et dans la voie de régulation par micro ARN (Eulalio et al. 2007a; Parker and Sheth 2007; Franks and Lykke-Andersen 2008). Enfin, plusieurs facteurs du mécanisme de surveillance NMD ont été identifiés dans les P-bodies, ce qui suggère éventuellement un rôle de ces foyers cytoplasmiques dans la dégradation des ARNm aberrants (voir paragraphe 2.3.8).

La fonction précise des P-bodies n'est pas complètement élucidée, mais il a été proposé qu'ils serviraient comme lieu pour le stockage des ARNm réprimés traductionnellement et des protéines impliquées dans la dégradation des ARNm (Bregues et al. 2005; Teixeira et al. 2005), et/ou comme lieu pour la dégradation des ARNm (Sheth and Parker 2003; Cougot et al. 2004). L'observation que l'absence de P-bodies détectables microscopiquement n'affecte pas l'efficacité de la dégradation des ARNm semble soutenir un rôle de stockage plus que de dégradation (Fenger-Gron et al. 2005; Eulalio et al. 2007b). De plus, une étude chez la levure a montré que le decapping de l'ARNm peut être initié de façon co-traductionnelle lorsqu'il est encore associé au ribosome dans les fractions polysomales (Hu et al. 2009), en suggérant que l'accumulation dans les P-bodies n'est pas un pré-requis essentiel pour la dégradation des ARNm. De façon intéressante chez l'homme, DCP2 co-sédimente aussi avec les polysomes (Wang et al. 2002c).

### 1.3. Les mécanismes de surveillance des ARNm

Des erreurs lors de la transcription, la maturation, l'épissage, ou l'export des ARNm peuvent donner lieu à des transcrits mutés ou inaptes à être traduits. Certains transcrits aberrants seront reconnus par le contrôle de qualité dans le noyau assuré principalement par l'exosome nucléaire. D'autres ARNm aberrants seront reconnus lors de l'export, et ceux qui réussiront à atteindre le cytoplasme seront reconnus par les mécanismes de surveillance cytoplasmique, à savoir le *non-stop decay* (NSD), le *non-go decay* (NGD) et le *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Les mécanismes de surveillance utilisent les enzymes de la machinerie de dégradation des ARN normaux mais avec des voies spécifiques d'activation qui permettent de dégrader très rapidement les ARNm qui sont reconnus comme aberrants.

Comme nous le verrons par la suite, ces mécanismes sont présents dès la synthèse de l'ARN pré-messager dans le noyau, jusqu'à la traduction des ARNm dans le cytoplasme en passant par l'étape d'export vers le cytoplasme.

### 1.3.1. Surveillance co-transcriptionnelle et lors de l'export

L'exosome nucléaire est impliqué dans la dégradation co-transcriptionnelle des précurseurs qui ne sont pas correctement maturés, tels que les ARN pré-messagers non épissés (Bousquet-Antonelli et al. 2000) ou avec une queue poly(A) aberrante (Hilleren et al. 2001). Ce contrôle de qualité permet que les transcrits soient détruits à une étape précoce avant de quitter leur lieu de transcription et évitent une dépense énergétique ultérieure à la cellule.

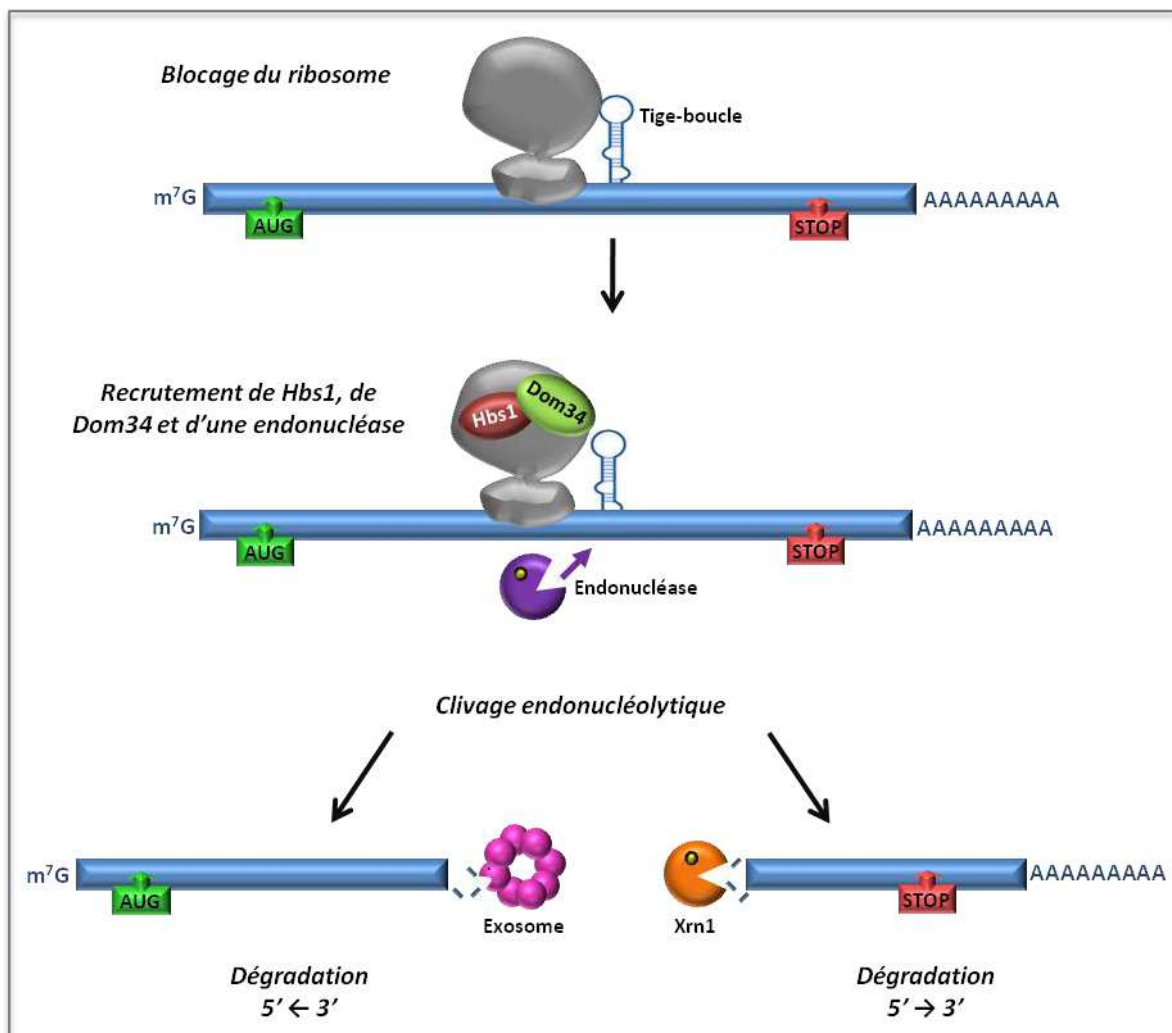
Les mRNP qui passent ce premier point de contrôle sont ensuite vérifiées notamment au moment de l'export vers le cytoplasme. Le complexe du pore nucléaire constitue un autre point de surveillance, dans lequel certaines protéines associées interagissent avec les mRNP et permettent que seules celles qui sont correctement configurées soient exportées vers le cytoplasme (Dimaano and Ullman 2004). Chez la levure, les protéines Mlp1 et Mlp2 (TPR chez les mammifères) seraient impliquées dans la reconnaissance et la rétention dans le noyau des ARNm qui n'ont pas été épissés. En effet, les mutants Mlp1 permettent la fuite de transcrits non épissés dans le cytoplasme (Galy et al. 2004). La reconnaissance dépendrait de l'interaction de Mlp1 avec les protéines associées à l'ARNm Yra1 (REF/Aly chez les mammifères) et Nab2 (Vinciguerra et al. 2005). Par ailleurs, des interactions entre Mlp et Rrp6 (co-facteur de l'exosome nucléaire chez la levure) ont été identifiées, ce qui suggère que Mlp recruterait l'exosome nucléaire pour la dégradation de transcrits qui seraient identifiés comme aberrants lors de l'export (Dimaano and Ullman 2004).

### 1.3.2. Surveillance co-traductionnelle

Trois mécanismes de surveillance couplés à la traduction ont été identifiés dans les cellules eucaryotes. Ces mécanismes sont nécessaires puisqu'un ARNm correctement maturé et exporté vers le cytoplasme, n'est pas forcément apte à la traduction. Par exemple, un ARNm avec de fortes structures secondaires peut empêcher le déplacement du ribosome et bloquer la machinerie traductionnelle. Ces ARNm seront reconnus et dégradés par le *no-go decay*. Un ARNm qui n'a pas de codon stop sera dégradé par le *non-stop decay*. Enfin si l'ARNm présente un codon de terminaison prématuré, il sera reconnu et dégradé par le *nonsense-mediated mRNA decay*.

### 1.3.2.1. Le *No-go decay* (NGD)

Le NGD a été décrit pour la première fois par Doma et Parker chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 4) (Doma and Parker 2006). Ils ont observé que l'insertion d'une tige-boucle dans le cadre de lecture de deux ARNm rapporteurs, induit un clivage endonucléolytique de l'ARNm à proximité du ribosome bloqué, et conduit à la dégradation de l'ARNm et à la dissociation des composants de la traduction. D'autres « obstacles » tels que la présence d'un pseudo-nœud ou une répétition de codons rares sont capables aussi d'induire le NGD, bien qu'avec une efficacité moindre (Doma and Parker 2006). De façon intéressante, il a été montré que le NGD peut être induit par des ARNm dépurinés, ce qui suggère que ce mécanisme agit aussi pour éliminer des ARNm endommagés (Gandhi et al. 2008).



**Figure 4. La voie du NGD chez la levure *S. cerevisiae*.**

Lorsque le ribosome est bloqué sur l'ARNm par la présence d'une tige boucle par exemple, le complexe Hbs1-Dom34 est recruté et provoque la dissociation du complexe traductionnel. Une endonucléase encore non identifiée clive l'ARNm et les deux fragments qui en résultent sont dégradés par les voies exonucléolytiques.

Les protéines Dom34p and Hbs1p, qui présentent des similarités avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 respectivement, ont été identifiées comme des facteurs du NGD (Doma and Parker 2006). Ces deux protéines provoquent la dissociation du complexe traductionnel probablement en interagissant avec le site A du ribosome. Ensuite une endonucléase encore non identifiée clive l'ARNm et les deux fragments qui en résultent sont dégradés en 3'→5' par l'exosome et en 5'→3' par Xrn1.

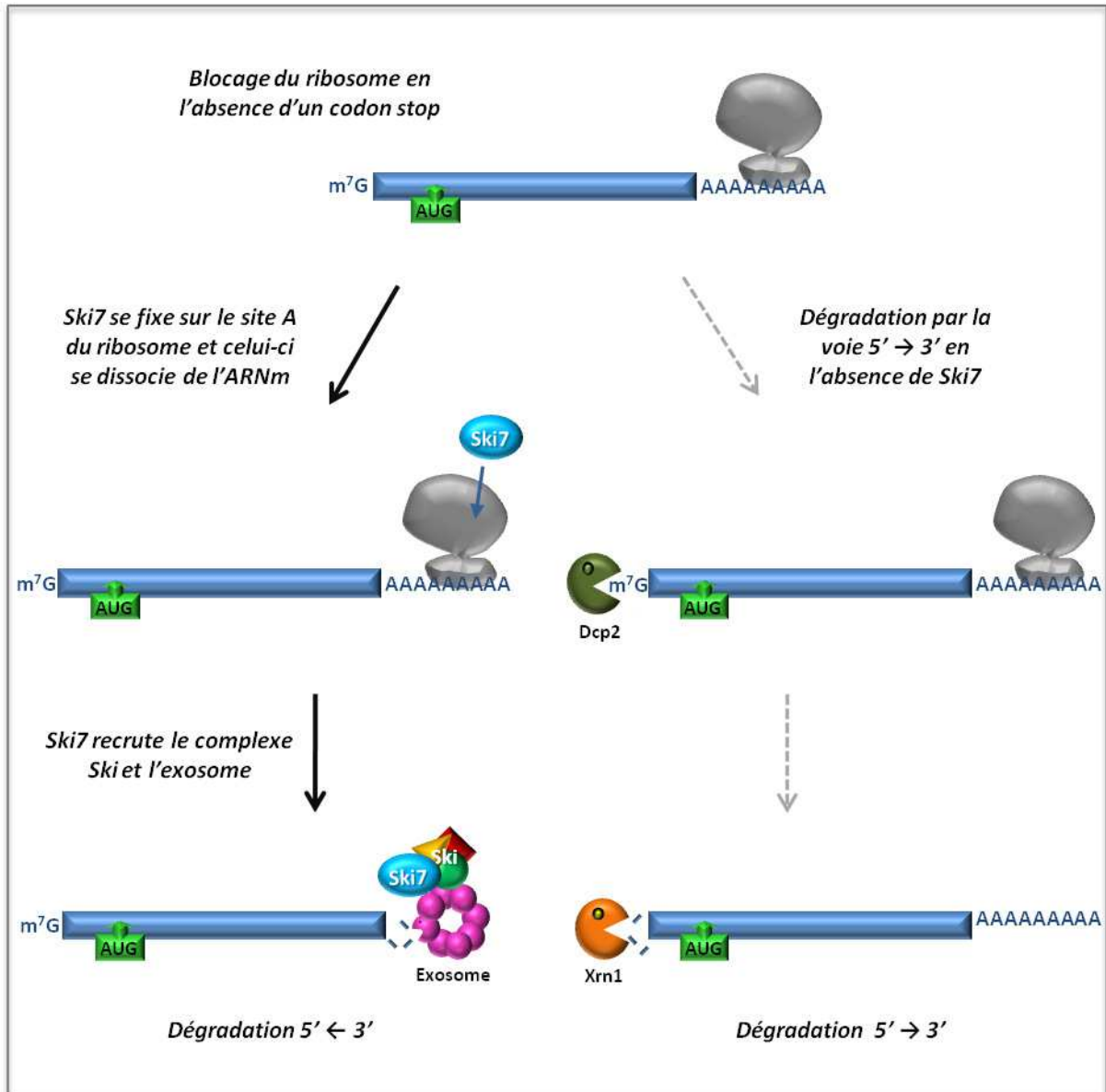
Le NGD aurait une double fonction : éliminer des transcrits défectueux qui bloqueraient la machinerie traductionnelle et moduler l'expression génique en agissant sur des ARNm sur lesquels les ribosomes auraient été bloqués délibérément en réponse à des signaux externes (Buchan and Stansfield 2007).

### 1.3.2.2. Le *Non-stop decay* (NSD)

La traduction d'un ARNm qui ne possède pas de codon de terminaison (suite à un événement de polyadénylation prématurée par exemple) conduirait au blocage du ribosome sur l'extrémité 3' de l'ARNm et par conséquent entraînerait le blocage de la machinerie traductionnelle. Les travaux de l'équipe du Pr. Roy Parker notamment, ont mis en évidence chez la levure que ces ARNm non-stop sont reconnus et dégradés par le mécanisme de NSD (Figure 5) (Frischmeyer et al. 2002; van Hoof et al. 2002).

Chez la levure, le NSD nécessite la présence de la protéine Ski7, de l'exosome cytoplasmique et du complexe Ski (Frischmeyer et al. 2002; van Hoof et al. 2002). Le domaine C-terminal de Ski7 mime la structure GTPase du facteur d'élongation de la traduction eEF1A qui reconnaît le site A du ribosome lorsqu'il est occupé par un codon sens, et du facteur de terminaison eRF3 qui reconnaît le site A du ribosome lorsqu'il est occupé par un codon non-sens. Grâce à ce domaine C-terminal, la protéine Ski7 reconnaît le ribosome qui se trouve bloqué à l'extrémité 3' de l'ARNm et se fixe sur son site A, alors que son domaine N-terminal recrute l'exosome et le complexe Ski, entraînant la dégradation de l'ARNm par la voie 3'→5' (Frischmeyer et al. 2002; van Hoof et al. 2002).

Chez la levure, l'observation que même en l'absence de Ski7, les substrats du NSD sont instables, suggère l'existence d'une voie de dégradation indépendante de Ski7 (Inada and Aiba 2005). Puisque les ARNm substrats du NSD ne se trouvent pas associés à la Pabp1 (la protéine associée à la queue poly(A) chez la levure) et que la perte de la Pabp1 stimule le decapping, il est possible que le NSD puisse avoir lieu aussi par la voie de dégradation 5'→3' chez la levure (Inada and Aiba 2005).



**Figure 5. La voie du NSD chez la levure *S. cerevisiae*.**

En l'absence de codon stop le ribosome est bloqué sur la partie 3' de l'ARNm. La protéine Ski7, le complexe Ski et l'exosome sont alors recrutés et l'ARNm est dégradé. Alternativement, il peut y avoir dégradation par la voie 5' → 3' en l'absence de Ski7.

### 1.3.2.3. Le Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

Des événements d'épissage alternatif, des mutations entraînant un décalage du cadre de lecture ou des mutations non-sens peuvent conduire à l'apparition d'un codon stop prématuré (PTC). Contrairement à ce que l'on pourrait attendre, la conséquence de ces mutations n'est pas la synthèse de protéines tronquées. En effet, ces ARNm portant des PTC seront reconnus et dégradés par le NMD. Ce mécanisme empêche donc la synthèse de









protéines tronquées qui pourraient posséder une fonction différente de celle de la protéine sauvage, agir comme des dominants négatifs ou tout simplement être non fonctionnelles. Le NMD est un mécanisme d'importance capitale pour la cellule, puisqu'en plus d'être un mécanisme de surveillance qui évite la synthèse de protéines tronquées qui pourraient être délétères pour la cellule, il est aussi un mécanisme de contrôle post-transcriptionnel de l'expression de certains ARNm physiologiques.

Le NMD a été intensivement étudié depuis une vingtaine d'années et commence à être relativement bien caractérisé. Je vais maintenant approfondir sur ce mécanisme et aborder l'importance physiologique du NMD dans les chapitres suivants puisque c'est la voie de dégradation que j'ai étudiée au cours de ma thèse.

## 2. Le mécanisme du NMD

### 2.1. Les facteurs du NMD

Bien que le mécanisme diffère quelque peu d'une espèce à l'autre, le NMD a été retrouvé dans tous les organismes eucaryotes étudiés à ce jour (Behm-Ansmant et al. 2007b). Chez l'homme, les protéines appelées UPF (*upframeshift*) et les protéines SMG (*suppressor with morphological effect on genitalia*) constituent le cœur de la machinerie du NMD. Elles ont été d'abord identifiées respectivement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez le nématode *Caenorhabditis elegans* comme étant des facteurs nécessaires pour le NMD (Leeds et al. 1992; Pulak and Anderson 1993; Cali et al. 1999). Postérieurement, des facteurs homologues ont été identifiés chez d'autres eucaryotes (Figure 6).

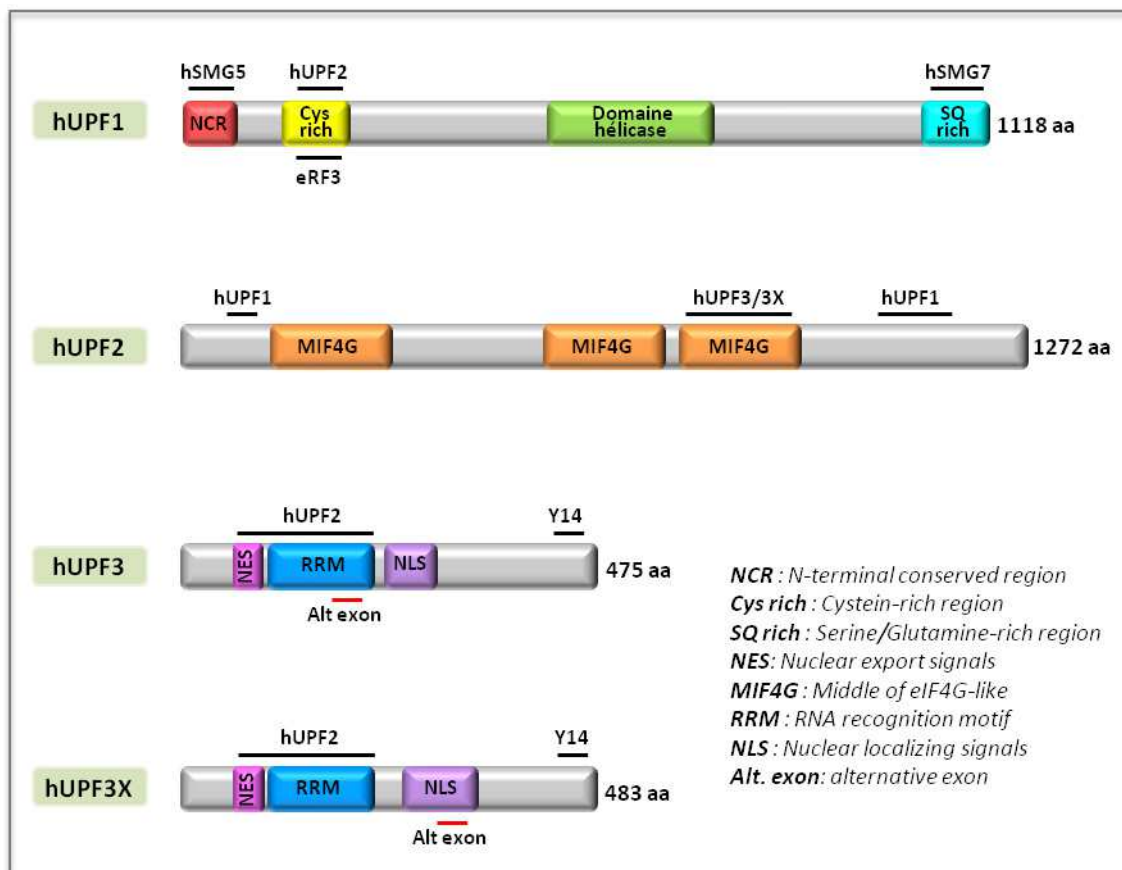
	 <i>Homo sapiens</i>	 <i>Dario renio</i>	 <i>Drosophila melanogaster</i>	 <i>Caenorhabditis elegans</i>	 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	 <i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>UPF</b>	hUPF1	UPF1	UPF1	SMG2 (UPF1)	Upf1p	UPF1
	hUPF2	UPF2	UPF2	SMG3 (UPF2)	Upf2p	UPF2
	hUPF3/3X	UPF3	UPF3	SMG4 (UPF3)	Upf3p	UPF3
<b>SMG</b>	hSMG1	SMG1	SMG1	SMG1	--	NI
	hSMG5	SMG5	SMG5	SMG5	--	NI
	hSMG6	SMG6	SMG6	SMG6	--	NI
	hSMG7	SMG7	NI	SMG7	--	NI
	hSMG8	NI	NI	SMG8	--	NI
	hSMG9	NI	NI	SMG9	--	NI
<b>Autres</b>	hNAG/NBAS	NBAS	NI	SMGL1	--	SMGL1*
	hDHX34	DHX34	SMGL2*	SMGL2	--	NI

**Figure 6. Facteurs du NMD chez les eucaryotes.**  
NI : Non identifié. \* Rôle dans le NMD pas encore décrit.

#### 2.1.1. Les protéines hUPF

Chez les mammifères, quatre protéines UPF ont été identifiées : UPF1, UPF2, UPF3 (nommée aussi UPF3a) et UPF3X (nommée aussi UPF3b) (Figure 7). Leur caractère essentiel dans le NMD a été démontré par plusieurs expériences de gain et de perte de fonction. D'une part, l'utilisation des ARN interférents (ARNi) dirigés contre ces protéines inhibe le NMD

(Mendell et al. 2002; Gehring et al. 2003; Mendell et al. 2004; Gehring et al. 2005; Wittmann et al. 2006). D'autre part, des expériences de fixation artificielle de ces protéines sur la partie 3'UTR d'un ARNm rapporteur ont montré qu'elles sont toutes capables d'induire sa dégradation par NMD (Lykke-Andersen et al. 2000; Gehring et al. 2003; Gehring et al. 2005; Kunz et al. 2006).



**Figure 7. Représentation schématique de la structure des protéines hUPF.**

Les sites d'interaction avec d'autres protéines sont indiqués par des traits noirs. Les exons alternatifs des hUPF3 et hUPF3X sont représentés par un trait rouge. Les interactions dont les sites n'ont pas été cartographiés (p.e. hUPF1-hSMG1, hUPF1-hSMG6 et hUPF2-hSMG1) ne sont pas représentées. Adaptation de (Yamashita et al. 2005b).

#### 2.1.1.1. hUPF1

Parmi les protéines UPF, hUPF1 (également nommée RENT1 pour *regulator of nonsense transcripts 1*) a été le premier facteur du NMD qui a été cloné chez l'homme. C'est une protéine de 1118 acides aminés et un poids moléculaire de 123 kDa (Perlick et al. 1996; Applequist et al. 1997). hUPF1 est le facteur le plus conservé entre les espèces (48% d'identité avec la levure et 62% avec la drosophile) (Culbertson and Leeds 2003). La région centrale, qui est la plus conservée, contient deux motifs à doigt de zinc riches en cystéine et sept motifs de la famille des hélicases de type I (Figure 7). L'activité hélicase est essentielle à

la fonction de hUPF1. En effet, la mutation R844C qui abolit son activité hélicase confère un effet dominant négatif à la protéine et inhibe le NMD dans les cellules de mammifère (Sun et al. 1998). hUPF1 possède aussi une activité ATPase dépendante de l'ARN qui réside dans les motifs Ia et II du domaine hélicase (Bhattacharya et al. 2000). La mutation de deux résidus très conservés dans le motif II (DE636AA) non seulement supprime son activité ATPase mais aussi son activité hélicase (Bhattacharya et al. 2000). Plus récemment, il a été montré que l'activité ATPase de hUPF1 est nécessaire pour le relâchement et le recyclage des facteurs du NMD qui sont fixés sur l'ARNm (Franks et al. 2010). En effet, chez les mutants DE636AA, les facteurs du NMD restent figés sur des mRNP intermédiaires partiellement dégradées en 3' qui s'accumulent dans les P-bodies (Franks et al. 2010). Les séquences N-terminale (N-ter) et C-terminale (C-ter) de hUPF1 contiennent de multiples résidus de sérine qui peuvent être phosphorylés par des différentes PI3KK (*phosphatidylinositol 3-kinase related kinases*). Notamment la phosphorylation par hSMG1 est une étape indispensable dans le mécanisme du NMD (Yamashita et al. 2001) (voir paragraphes 2.3.3 et 2.3.6).

hUPF1 est localisée principalement dans le cytoplasme, mais il a été montré qu'elle est capable également de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme suite au traitement avec leptomycine B (LMB), un inhibiteur spécifique de l'export nucléaire CRM1-dépendant (Mendell et al. 2002). La délétion des résidus 596-697 abolit la localisation nucléaire après traitement à la LMB, ce qui suggère qu'un signal de localisation nucléaire se trouve sur cette région. Toutefois, aucune séquence consensus d'export ou d'import nucléaire n'y a été identifiée (Mendell et al. 2002). Enfin, seules les formes mutantes ATPase de hUPF1 ou les formes hyperphosphorylées ont été pour le moment détectées dans les P-bodies (Unterholzner and Izaurralde 2004; Durand et al. 2007; Franks et al. 2010).

#### 2.1.1.2. hUPF2

hUPF2 est une protéine de 1272 acides aminés avec un poids moléculaire de 148 kDa (Mendell et al. 2000; Serin et al. 2001). Elle est moins bien conservée que hUPF1 (21% d'identité avec la levure et 34% avec la drosophile) (Culbertson and Leeds 2003). hUPF2 agit comme adaptateur de l'interaction entre hUPF1 et hUPF3/hUPF3X. Pour cela, elle possède des domaines de liaison à hUPF1 dans les régions N- et C-ter et un domaine d'interaction avec hUPF3/hUPF3X dans sa partie C-ter (Figure 7) (Serin et al. 2001). hUPF2 présente aussi plusieurs domaines appelés MIF4G (pour *middle of eIF4G-like*) qui ont été décrits initialement dans le facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Mendell et al. 2000). Ces domaines seraient impliqués dans l'interaction de hUPF2 avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4A et eIF3 (Mendell et al. 2000).

hUPF2 possède des séquences de localisation nucléaire dans sa partie C-ter et des expériences de coimmunoprécipitation ont montré qu'elle peut être retrouvée dans la fraction nucléaire et dans la fraction cytoplasmique (Lejeune et al. 2002). Cependant, les marquages en immunofluorescence montrent que hUPF2 présente une localisation principalement cytoplasmique et concentrée dans la région périnucléaire (Lykke-Andersen et al. 2000; Serin et al. 2001)

### 2.1.1.3. hUPF3 et hUPF3X

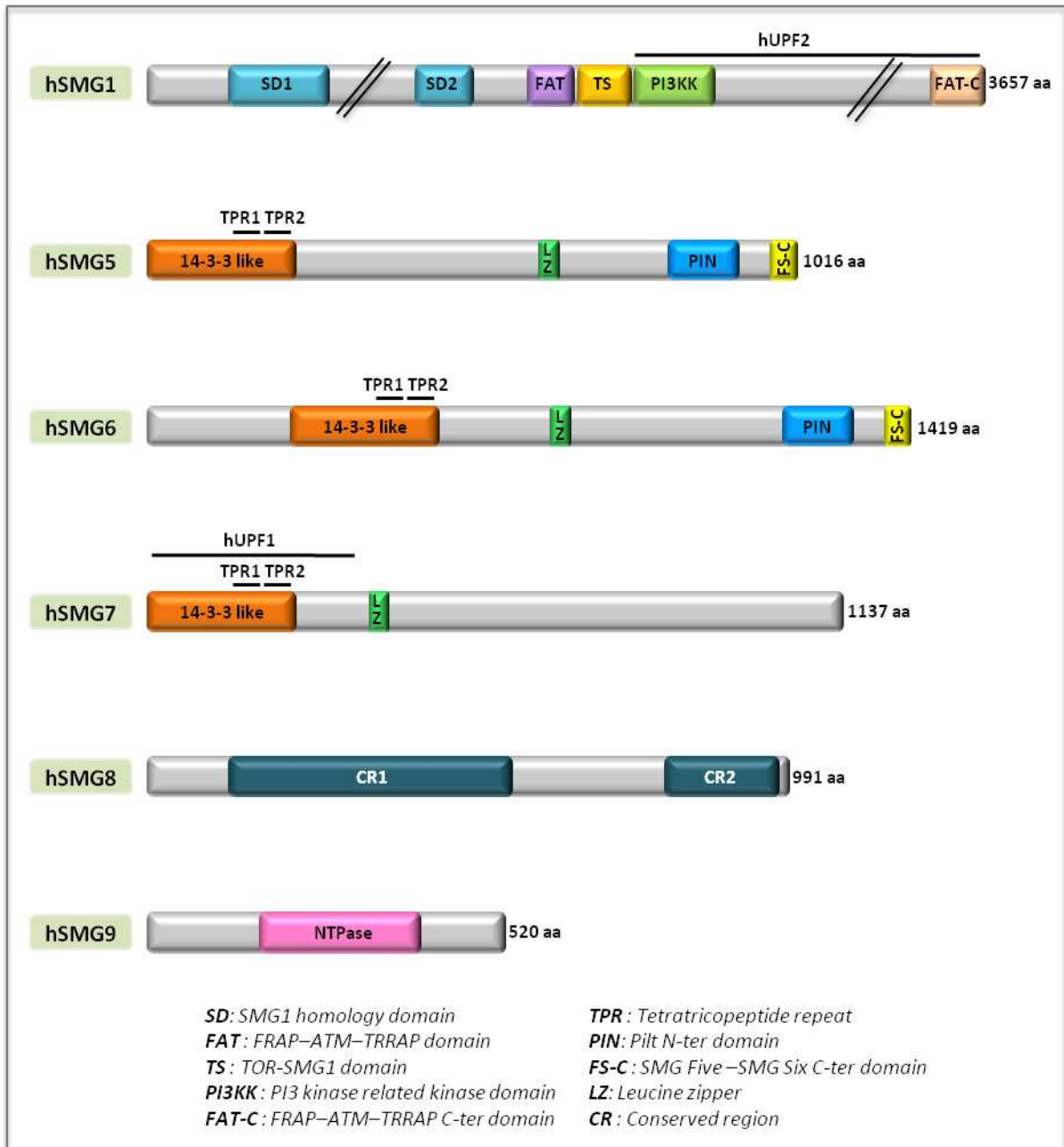
Chez les mammifères, il existe deux gènes *UPF3* : *UPF3* localisé sur le chromosome 13 et *UPF3X* localisé sur le chromosome X (Serin et al. 2001). hUPF3 (appelée également hUPF3A) est une protéine de 452 acides aminés avec un poids moléculaire de 52 kDa. hUPF3X (appelée également hUPF3B) est une protéine de 483 acides aminés et un poids moléculaire de 58 kDa (Serin et al. 2001). Les deux protéines présentent deux isoformes comme conséquence d'un épissage alternatif (Figure 7). hUPF3 présente une forme courte (hUPF3S) dans laquelle l'exon 4 est exclu, et une forme longue (hUPF3L) dans laquelle l'exon 4 est retenu. hUPF3X présente une forme courte dans laquelle l'exon 8 est exclu, et une forme longue dans laquelle cet exon est retenu (Lykke-Andersen et al. 2000; Serin et al. 2001).

Bien que la région N-ter de hUPF3 et hUPF3X contienne un domaine RRM (*RNA recognition motif*) conservé, ces protéines ne se lient pas directement à l'ARN, vraisemblablement dû à l'absence de résidus aromatiques nécessaires à cette interaction (Kadlec et al. 2004). En revanche ce domaine est nécessaire à l'interaction de hUPF3 et hUPF3X avec hUPF2 (Kadlec et al. 2004).

Les deux protéines présentent une localisation majoritairement nucléaire mais qui peuvent faire la navette vers le cytoplasme (Lykke-Andersen et al. 2000; Serin et al. 2001). Malgré leurs similarités, leurs effets sur le NMD semblent être différents. En effet, la fixation artificielle de hUPF3X dans la partie 3'UTR d'un ARNm induit fortement sa dégradation, alors que l'effet de hUPF3 est plus modeste (Lykke-Andersen et al. 2000). Dans le même sens, l'inhibition de l'expression par ARNi de hUPF3X mais non de hUPF3, abolit le NMD. Les différences d'activité résideraient dans la partie C-terminale de ces deux facteurs. Plus particulièrement, il a été montré que le résidu arginine R419 de hUPF3X, qui correspond à un résidu alanine chez hUPF3 (A432), détermine en grand partie son effet sur le NMD (Kunz et al. 2006).

### 2.1.2. Les protéines SMG

Chez l'homme six protéines SMG ont été identifiées : hSMG1, hSMG5, hSMG6, hSMG7, hSMG8 et hSMG9 (Figure 8). Elles jouent un rôle crucial dans la régulation du NMD en intervenant dans le cycle de phosphorylation et déphosphorylation de hUPF1 (discuté plus loin dans la section 2.3).



**Figure 8. Représentation schématique de la structure des protéines hSMG.**

Les sites d'interaction avec d'autres protéines sont indiqués par des traits noirs. Les interactions dont les sites n'ont pas été cartographiés (p.e. hUPF1-hSMG1, hUPF1-hSMG6, hUPF2-hSMG1, hSMG5-hSMG7) ne sont pas représentées. Adaptation de (Yamashita et al. 2005b) et (Yamashita et al. 2009).

### 2.1.2.1. hSMG1, hSMG8 et hSMG9

hSMG1 est une kinase qui phosphoryle hUPF1 sur ses régions N et C-ter, riches en motifs SQ (sérine/glutamine) (Yamashita et al. 2001). Elle appartient à la famille des PI3KK (*phosphatidylinositol 3-kinase related kinases*), dont les membres sont impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN (Abraham 2004). La phosphorylation de hUPF1 par hSMG1 joue un rôle essentiel dans le NMD. En effet, il a été démontré que l'inhibition de l'activité kinase de hSMG1 par mutagenèse ou par l'utilisation d'inhibiteurs de PI3KK stabilise les ARNm soumis au NMD (Yamashita et al. 2001).

Récemment, il a été rapporté que hSMG1 forme un complexe avec deux nouvelles protéines SMG appelées hSMG8 et hSMG9 (Yamashita et al. 2009). Les travaux de Yamashita et collaborateurs ont mis en évidence que hSMG8 est nécessaire pour le recrutement de hSMG1 sur le complexe de surveillance et régule directement l'activité kinase de hSMG1 sur hUPF1 *in vivo*. hSMG9 quant à elle, est requise pour l'interaction entre hSMG1 et hSMG8 (Yamashita et al. 2009). Le rôle des protéines SMG8 et SMG9 dans le NMD semble être conservé, puisque la suppression de l'expression de ces deux protéines par ARNi inhibe le NMD chez l'homme et chez *C. elegans* (Yamashita et al. 2009).

### 2.1.2.2. hSMG5, hSMG6 et hSMG7

Les protéines hSMG5, hSMG6 et hSMG7 participent à la déphosphorylation de hUPF1. Elles ne sont pas des phosphatases elles-mêmes, mais elles servent d'adaptateurs entre la protéine phosphatase 2A (PP2A) et hUPF1 phosphorylée. En accord avec leur fonction, elles co-immunoprécipitent avec la sous-unité catalytique de la PP2A et avec hUPF1 (Chiu et al. 2003; Ohnishi et al. 2003).

Les trois protéines présentent des caractéristiques structurales communes telles que deux répétitions tetratricopeptide (TPR) impliquées dans les interactions protéine-protéine et un domaine N-ter qui présente une similarité avec le domaine 14-3-3 (Figure 8) (Fukuhara et al. 2005). Étant donné que le domaine 14-3-3 est un motif de fixation aux phosphosérines, il a été proposé qu'il soit impliqué dans l'interaction avec hUPF1 phosphorylée (Fukuhara et al. 2005). En effet, au moins dans le cas de hSMG7, la mutation de ce domaine inhibe son interaction avec hUPF1 phosphorylée *in vitro* (Fukuhara et al. 2005). hSMG5 interagit aussi avec la partie N-ter de hUPF1 et l'inhibition de cette interaction empêche la déphosphorylation de hUPF1 (Ohnishi et al. 2003).

hSMG5 et hSMG6 possèdent en plus, un domaine PIN (*Pilt N-terminal domain*) qui est caractéristique de certaines protéines avec une activité ribonucléase. Il ne semble pas

fonctionnel dans la protéine hSMG5 puisqu'elle ne présente pas d'activité endonucléolytique, toutefois lorsqu'il est absent ou muté, la déphosphorylation de hUPF1 est inhibée (Glavan et al. 2006). Par contre, le domaine PIN de hSMG6 est bien fonctionnel et il est responsable d'un clivage endonucléolytique sur l'ARNm non-sens dans la proximité du PTC (Gatfield and Izaurralde 2004; Huntzinger et al. 2008; Eberle et al. 2009).

### 2.1.3. Les protéines hNAG et hDHX34

Deux nouvelles protéines dont la déplétion chez *C. elegans* entraîne une inhibition du NMD comparable à celle observée lorsque SMG2 (l'homologue de hUPF1 chez le nématode) est déplétée, ont été identifiées récemment (Longman et al. 2007). Elles ont été nommées SMGL1 et SMGL2 (*SMG lethal*) puisque leur absence entraîne la mortalité embryonnaire chez *C. elegans*. Ces deux protéines sont absentes chez la levure mais des protéines homologues bien conservées sont retrouvées chez les eucaryotes supérieurs.

Chez l'homme SMGL1 et SMGL2 correspondent aux protéines hNAG et hDHX34. De façon intéressante, leur rôle dans le NMD semble être conservé, puisque dans les cellules HeLa la déplétion de hNAG et hDHX34 a pour effet d'inhiber le NMD (Longman et al. 2007). Le mécanisme par lequel ces protéines interviennent dans le NMD n'est pas encore connu, mais la présence d'un domaine ARN hélicase dans hDHX34 laisse penser qu'elle pourrait interagir directement avec l'ARN (Longman et al. 2007).

## 2.2. Mécanisme de reconnaissance d'un PTC chez les mammifères

Il est essentiel que la différence entre un codon de terminaison prématuré et le codon de terminaison physiologique puisse être faite afin de cibler uniquement la dégradation des ARNm porteurs d'une mutation non-sens par le NMD et permettre aux ARNm sauvages de subir la traduction. Je vais maintenant décrire le mécanisme de reconnaissance des PTC dans les cellules de mammifère.

### 2.2.1. La règle des 50-55 nucléotides

L'observation sur l'ARNm du gène codant pour la triosephosphate isomérase (TPI) que seuls les PTC situés suffisamment en amont de la dernière jonction exon-exon sont soumis au NMD (Daar and Maquat 1988; Cheng et al. 1990) suggère un lien entre des événements d'épissage et la reconnaissance d'un codon stop comme un PTC. Par ailleurs, la substitution du dernier intron par la séquence d'un autre intron du gène *TPI* n'affecte pas le taux d'induction du NMD, ce qui indique que la dégradation nécessite un épissage mais n'est



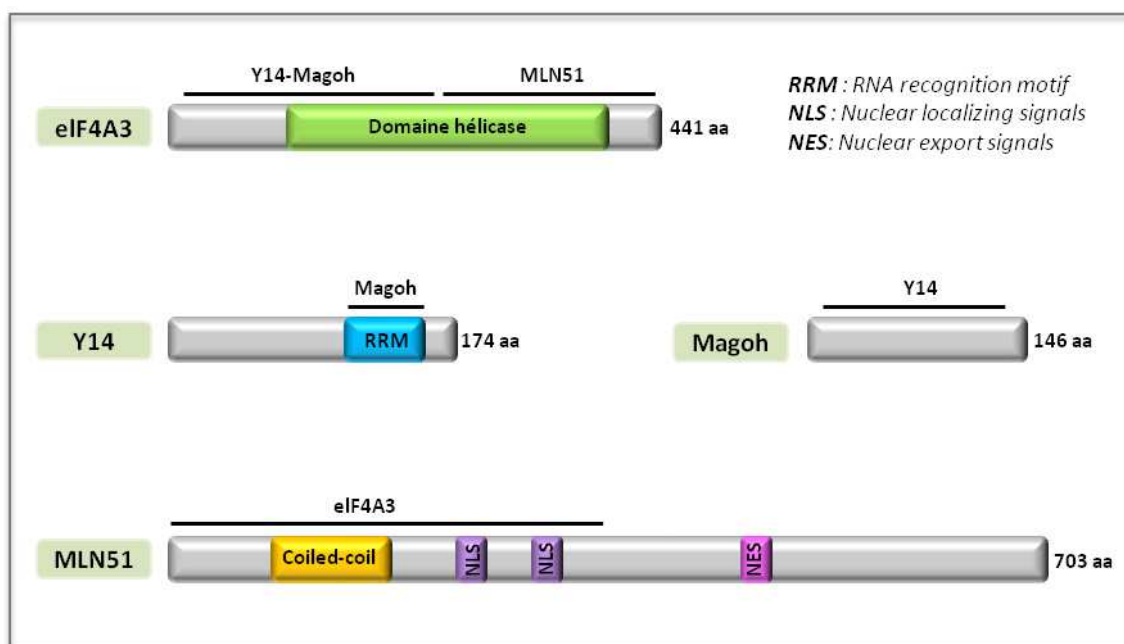
pas tributaire de la séquence spécifique d'un intron particulier (Cheng et al. 1994). Plus tard, il a été établi que la distance minimale à laquelle un PTC doit être situé en amont du dernier intron pour déclencher la dégradation de l'ARNm de la TPI est de 50 nucléotides minimum (Zhang et al. 1998a). Ces résultats ont été reproduits sur un autre gène codant pour la  $\beta$ -globine humaine et porteur d'une mutation non-sens au niveau du codon 39 (Zhang et al. 1998b) apportant ainsi un caractère général à ce paramètre de distance.

L'analyse de plus de 1500 gènes de champignons, de plantes, d'insectes et de vertébrés a mis en évidence que dans plus de 98% des transcrits physiologiques pour lesquels le codon normal de terminaison est suivi d'un ou plusieurs introns, la distance entre le codon stop et l'intron est inférieure à 50 nucléotides (Nagy and Maquat 1998). Sur la base de ces observations, on a établi la « règle des 50 à 55 nucléotides » qui définit qu'un codon stop est reconnu comme un codon stop prématuré s'il se localise à plus de 50-55 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon (Nagy and Maquat 1998). Ce postulat explique pourquoi les codons stop physiologiques ne déclenchent pas le NMD (puisque'ils se situent en général sur le dernier exon), et aussi pourquoi les ARNm dérivés de gènes qui n'ont pas d'introns sont immuns au NMD, comme c'est le cas des gènes qui codent pour le récepteur à la mélanocortine 4, l'histone H4 ou la protéine HSP70 (Maquat and Li 2001; Brocke et al. 2002). Toutefois comme toute règle il existe des exceptions que nous discuterons un peu plus loin (paragraphe 2.5).

D'autres observations suggéraient que le PTC est reconnu seulement après l'épissage. En effet, le fait de bloquer l'épissage en mutant les sites donneur et accepteur d'un intron du gène codant pour le récepteur  $\beta$  des lymphocytes T (TCR- $\beta$ ), permet au transcrit de ce gène d'échapper au NMD (Carter et al. 1996). De plus, on a montré qu'un PTC codé sur deux exons consécutifs est capable d'induire le NMD seulement après l'élimination de l'intron (Zhang and Maquat 1996). Ce résultat indique qu'il n'y a pas de reconnaissance des PTC sur l'ARN pré-messager. Ainsi, l'ensemble de ces observations démontre que l'épissage est nécessaire pour la reconnaissance des PTC et laisse supposer l'existence d'une marque laissée par le splicéosome sur l'ARNm épissé qui indiquerait la position des introns éliminés et servirait de deuxième signal pour la reconnaissance d'un PTC. Cette hypothèse a été confirmée lorsque Le Hir et collaborateurs ont mis en évidence qu'une des conséquences de l'épissage des introns est le dépôt d'un complexe protéique en amont de chaque événement d'épissage.

### 2.2.2. L'Exon Junction Complex (EJC)

L'EJC est un complexe protéique qui est déposé sur l'ARNm, 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon au cours de l'épissage (Linde and Kerem ; Le Hir et al. 2000a; Le Hir et al. 2000b). Bien que la composition de l'EJC soit très dynamique et change tout au long des différentes étapes de la vie d'un ARNm, un hétérotétramère qui reste associé de façon stable à l'ARNm et qui constitue « le cœur » de l'EJC a été identifié. Il est formé par les protéines eIF4A3, MLN51, Y14 et Magoh (Figure 9) (Ballut et al. 2005; Tange et al. 2005; Andersen et al. 2006).

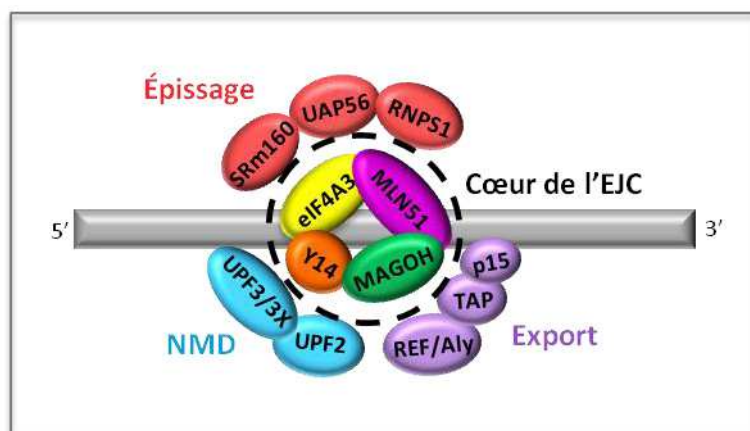


**Figure 9. Représentation schématique des composants du cœur de l'EJC.**

Les sites d'interaction avec d'autres protéines sont indiqués par des traits noirs. Adaptation de (Yamashita et al. 2005b).

eIF4A3 est une hélicase à boîte DEAD qui se lie directement à l'ARNm et sert d'ancre pour la fixation des autres facteurs de l'EJC sur l'ARNm (Chan et al. 2004; Shibuya et al. 2004). MLN51 (Barentz chez la drosophile) interagit avec le domaine N-ter d'eIF4A3 ce qui stimule l'activité ATPase de ce dernier et a pour effet d'augmenter son affinité pour l'ARNm (Ballut et al. 2005). Y14 et MAGOH forment un hétérodimère qui interagit avec le domaine C-ter d'eIF4A3 en inhibant son activité ATPase, stabilisant ainsi l'interaction du complexe avec l'ARNm (Kataoka et al. 2000; Kataoka et al. 2001; Le Hir et al. 2001a; Ballut et al. 2005). Le cœur de l'EJC sert de plateforme d'ancrage à d'autres facteurs qui interagissent de façon transitoire avec l'ARNm pendant les processus d'épissage, export, localisation subcellulaire, traduction et dégradation (Figure 10) (Le Hir et al. 2001b; Tange et al. 2005). De façon

importante, on y trouve aussi les facteurs du NMD hUPF2 et hUPF3/3X, ce qui est en accord avec le rôle présumé de l'EJC de deuxième signal pour la dégradation des ARNm non-sens.



**Figure 10. Représentation schématique de l'EJC sur l'ARNm.**

Les protéines qui forment le cœur de l'EJC sont encerclées par un trait pointillé. En dehors du cercle sont représentées quelques unes des protéines qui interagissent avec le cœur de l'EJC pendant différentes étapes du métabolisme des ARNm.

L'assemblage de l'EJC se fait de manière séquentielle. Ainsi pendant l'épissage, eIF4A3 puis le dimère Y14-MAGOH rejoignent le splicéosome avant que la ligature des exons ne se fasse (Jurica et al. 2002; Makarov et al. 2002; Bessonov et al. 2008). Pendant que l'ARNm est toujours associé au splicéosome, les protéines SRm160, RNPS1 et UAP56 impliquées dans l'épissage, et la protéine REF/Aly impliquée dans l'export des ARNm, sont recrutées (Jurica et al. 2002; Makarov et al. 2002; Bessonov et al. 2008). La protéine MLN51 semble rejoindre le complexe à un stade plus tardif, après que l'ARNm ait été libéré par le splicéosome (Gehring et al. 2009). Les protéines hUPF3/3X sont recrutées au complexe par l'interaction avec Y14 et RNPS1 (Kim et al. 2001; Lykke-Andersen et al. 2001; Gehring et al. 2003). L'ARNm est exporté vers le cytoplasme via le recrutement de NXF1/TAP:p15 par REF/Aly (Stutz et al. 2000) ou par Y14 ou Magoh (Kataoka et al. 2001). La protéine hUPF2 s'associerait à hUPF3/3X à l'intérieur et/ou à la périphérie du noyau (Lejeune et al. 2002).

### 2.2.3. L'EJC et le NMD

L'importance de l'EJC pour le NMD chez les mammifères est soutenue par plusieurs observations : (i) la suppression de l'expression des protéines Y14, MLN51 et eIF4A3 par ARNi inhibe le NMD (Gehring et al. 2003; Ferraiuolo et al. 2004; Shibuya et al. 2004) ; (ii) inversement, la fixation artificielle de RNPS1, Magoh, Y14 ou de MLN51 en aval d'un codon stop induit le NMD (Gehring et al. 2003; Palacios et al. 2004) ; (iii) les mutations qui

empêchent la formation de l'hétérodimère Y14-Magoh inhibent le NMD (Fribourg et al. 2003).

Par ailleurs, des interactions directes entre des protéines de l'EJC et les facteurs du NMD ont été mises en évidence : (i) les facteurs du NMD hUPF2 et hUPF3/3X ont été identifiés comme composants de l'EJC *in vivo* dans les oocytes de *Xenopus laevis* (Le Hir et al. 2001b) ; (ii) les protéines hUPF3 et hUPF3X interagissent directement avec Y14 (Kim et al. 2001; Gehring et al. 2003) ; (iii) la protéine RNPS1 co-immunoprécipite avec les trois protéines hUPF (Lykke-Andersen et al. 2001) ; (iv) les protéines RNPS1, Y14, SRm160 et REF/Aly co-immunoprécipitent avec hUPF3X de façon ARN-indépendante (Lejeune et al. 2002).

### 2.3. L'assemblage du complexe de surveillance

Le rôle du complexe de surveillance est de coupler la reconnaissance d'un événement de terminaison prématurée de la traduction avec la machinerie de dégradation des ARNm afin d'accélérer l'élimination du transcrit aberrant et en éviter la traduction (Conti and Izaurralde 2005; Amrani et al. 2006b). Nous allons voir maintenant les étapes de l'assemblage du complexe de surveillance dans les cellules de mammifère.

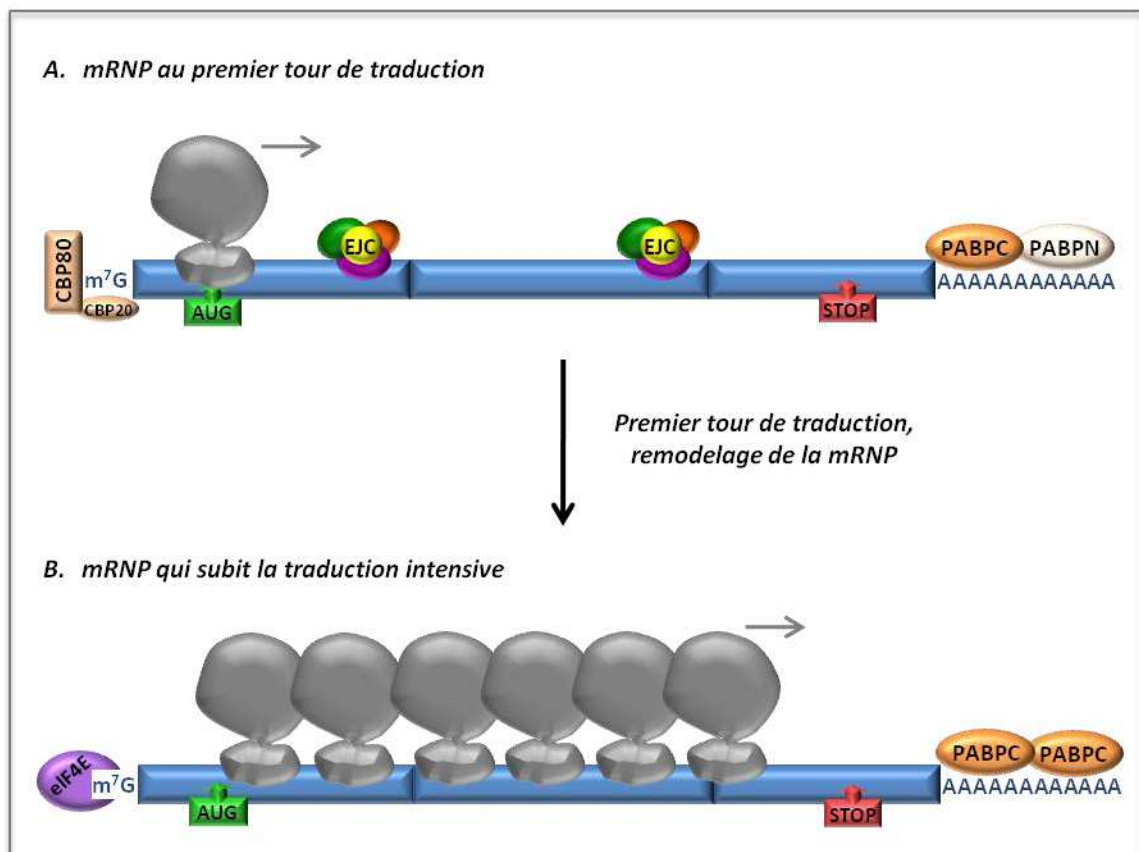
#### 2.3.1. La reconnaissance d'un PTC nécessite de la traduction

Comme il a été évoqué dans le chapitre 1, le NMD est un mécanisme de surveillance co-traductionnelle. Plusieurs observations ont mis en évidence que la reconnaissance d'un PTC sur un ARNm nécessite de la traduction. En effet, lorsque la traduction est inhibée par différents moyens, par exemple par l'introduction d'une tige-boucle dans la partie 5'UTR de l'ARNm (Belgrader et al. 1993) ou par traitement avec des composés chimiques tels que la cycloheximide, l'ansomycine ou la puromycine (Carter et al. 1995), les ARNm soumis au NMD sont stabilisés.

Il est nécessaire que la reconnaissance d'un PTC se fasse le plus tôt possible afin d'éviter une dépense énergétique inutile à la cellule notamment. Plusieurs travaux ont permis d'établir que les ARNm porteurs d'un PTC sont reconnus et ciblés pour la dégradation au cours d'un premier tour de traduction (*pioneer round of translation*) en limitant ainsi la synthèse de protéines tronquées (Ishigaki et al. 2001; Lejeune et al. 2002).

### 2.3.2. Reconnaissance des PTC pendant le premier tour de traduction

La composition de la mRNP qui subit le premier tour de traduction diffère de celle qui subit les autres tours de traduction (Ishigaki et al. 2001; Lejeune et al. 2002; Chiu et al. 2004; Lejeune et al. 2004). Une des caractéristiques majeures de ces mRNP est la présence sur la coiffe de l'hétérodimère CBP80-CBP20. De plus, ces mRNP portent encore les EJC en amont des jonctions exon-exon et leur queue poly(A) est fixée par les protéines PABPN et PABPC (PABP nucléaire et cytoplasmique respectivement). Comme conséquence du premier tour de traduction, la composition de la mRNP est changée : les EJC ont été éliminés, le complexe CBP80-CBP20 a été remplacé par eIF4E, et seule PABPC reste associée à la queue poly(A). Les mRNP ainsi remodelées subissent la traduction intensive en protéine (Figure 11).



**Figure 11. Composition de la mRNP avant et après le premier tour de traduction.**

(A) Chez les mammifères la mRNP qui subit le premier tour de traduction présente le complexe CBP80-CBP20 lié à la coiffe, un EJC en amont de chaque jonction exon-exon et les protéines PABPC et PABPN associées à la queue polyA. (B) Après le premier tour de traduction le complexe CBP80-CBP20 a été remplacé par eIF4E, les EJC ont été éliminés et seule PABPC reste associée à la queue polyA.

Les travaux de l'équipe du Pr. Lynne Maquat ont mis en évidence que le NMD a lieu uniquement sur des ARNm fixés par CBP80 et non sur des ARNm portant eIF4E, ce qui

indique que seuls les ARNm nouvellement synthétisés sont soumis au NMD (Ishigaki et al. 2001). Ceci diffère de ce qui a été observé chez la levure, puisque dans cet organisme le NMD peut avoir lieu sur des ARNm liés à CBP80 ou eIF4E (Gao et al. 2005). Ces travaux ont montré également que l'inhibition de la traduction générale, avec la cycloheximide ou avec des ARNt supprimeurs de codons non-sens, stabilise les ARNm liés à CBP80. En revanche, la surexpression de 4E-BP1, une protéine qui inhibe spécifiquement la traduction dépendante d'eIF4E, n'a aucun effet sur le NMD (Chiu et al. 2004). Enfin, ils ont montré que hUPF2 et hUPF3X peuvent être détectées sur des mRNP immunopurifiées avec un anticorps anti-CBP80 mais non avec un anticorps anti-eIF4E (Ishigaki et al. 2001).

La suite des travaux de l'équipe du Pr. Maquat a montré que non seulement hUPF2 et hUPF3X mais aussi d'autres composants de l'EJC (RNPS1, Y14, SRm160, REF/Aly, TAP) peuvent être détectés dans les mRNP liées à CBP80 et non dans les mRNP fixées par eIF4E (Lejeune et al. 2002). Ceci suggère que les complexes EJC doivent être enlevés de l'ARNm avant ou pendant le remplacement de CBP80 par eIF4E sur la coiffe.

Les travaux de Dostie et Dreyfuss ont mis en évidence que la protéine de l'EJC Y14 peut être trouvée dans les fractions monosomales, fixée sur les ARNm qui sont peu ou pas traduits, mais par contre, elle n'est plus retrouvée dans les fractions polysomales qui contiennent les ARNm qui sont activement traduits (Dostie and Dreyfuss 2002). De plus, ils ont montré que ce retrait de Y14 est dépendant de la traduction (Dostie and Dreyfuss 2002). Ceci suggère que le passage du ribosome, par un mécanisme qui reste inconnu, déplacerait les complexes de l'EJC des ARNm au cours du premier tour de traduction. Ces travaux ont été renforcés par la démonstration que les protéines CBP80, hUPF2, hUPF3X ainsi que les ARNm portés par CBP80 se concentrent dans les premières fractions des gradients de polysomes, contrairement à eIF4E et les ARNm portés par cette dernière qui sont retrouvés dans les fractions plus lourdes (Chiu et al. 2004).

Ces observations ont permis de proposer un modèle pour la reconnaissance d'un PTC lors du premier tour de traduction. Dans un ARNm normal, dans lequel le codon de terminaison est localisé sur le dernier exon, le passage du premier ribosome élimine tous les EJC, de manière qu'à la fin de ce premier tour de traduction, il ne reste plus d'EJC sur l'ARNm. Ensuite le complexe CBP80-CBP20 est remplacé par eIF4E et l'ARNm peut subir une traduction intensive en protéine. Dans un ARNm portant un PTC, le ribosome peut déplacer de la même façon les EJC qui se trouvent en amont du PTC. Mais quand il rencontre le PTC, le ribosome va s'arrêter alors qu'il reste encore un (ou plusieurs) EJC en aval. C'est donc la présence de cet EJC qui n'a pas pu être déplacé qui indiquera que le codon de terminaison sur

lequel la traduction s'est arrêtée n'est pas le bon et que par conséquent cet ARNm ne doit plus être traduit mais ciblé pour la dégradation.

Un aspect qui restait inconnu à ce jour était de savoir si une synthèse peptidique pendant le premier tour de traduction avait lieu. Une étude très récente suggère que cela peut être le cas. Apcher et collaborateurs ont montré que des ARNm portant un PTC peuvent donner lieu à des peptides qui sont des substrats pour la voie du complexe majeur d'histocompatibilité I (CMH I) (Apcher et al. 2011). Dans cette étude, ils ont inséré la séquence codant pour l'épitope SL8 dans le premier exon de l'ARNm de la  $\beta$ -globine qui porte un PTC et ils ont trouvé que l'antigène SL8 est présenté à la surface des cellules transfectées avec cette construction. Ces résultats indiquent qu'il y a synthèse peptidique à partir d'un ARNm qui porte un PTC. De plus, ils ont observé que le fait de bloquer la traduction globale dépendante d'eIF4E a seulement un effet limité sur la production de ces peptides antigéniques, ce qui renforce l'idée qu'ils sont synthétisés lors du premier tour de la traduction à partir des ARNm liés à CBP80 (Apcher et al. 2011).

### 2.3.3. La phosphorylation de hUPF1 se fait dans le complexe DECID

Nous avons vu que les protéines hUPF3/3X seraient recrutées sur l'EJC dans le noyau lors de l'épissage et que hUPF2 serait recrutée dans le noyau et/ou dans la région périnucléaire. Il reste à déterminer comment le facteur déterminant du NMD, la protéine hUPF1, est recruté sur la mRNP. L'observation que hUPF1 interagit avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (eRF pour *eukaryotic release factor*), suggère que hUPF1 serait recrutée après la reconnaissance du PTC, lorsque le ribosome rencontre le codon stop prématuré (Czaplinski et al. 1998).

Kashima et collaborateurs ont mis en évidence l'existence d'un complexe appelé SURF, formé par les protéines hUPF1, hSMG1, eRF1 et eRF3 (Figure 12) (Kashima et al. 2006). L'assemblage de ce complexe est indépendant de l'EJC, puisqu'il peut avoir lieu lorsque hUPF2 et Y14 sont déplétées. D'ailleurs, la coimmunoprécipitation de hUPF1 avec hSMG1 et les eRF augmente en absence de hUPF2 et Y14, suggérant que la formation de SURF a lieu avant que hUPF1 rejoigne l'EJC (Kashima et al. 2006).

Malgré la présence de hSMG1 (la kinase qui phosphoryle hUPF1) dans ce complexe, cela ne suffit pas à induire la phosphorylation de hUPF1 : SURF doit interagir avec l'EJC pour que celle-ci puisse avoir lieu. Initialement, il a été proposé que cette interaction ne se fasse uniquement que par l'intermédiaire de hUPF2, qui est capable d'interagir à la fois avec la région N-ter de hUPF1 et avec la région C-ter de hSMG1 (Kashima et al. 2006). En effet, la

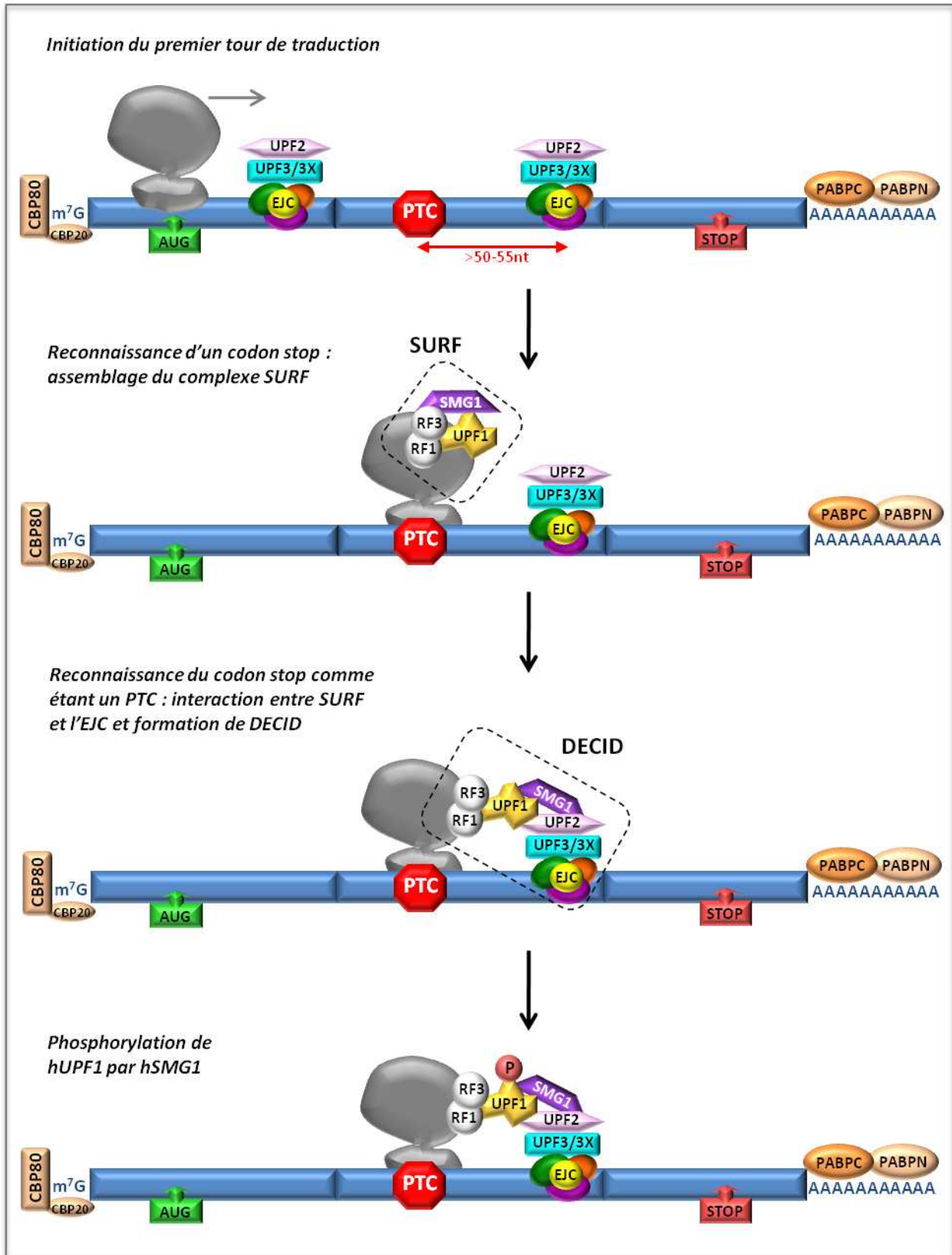
déplétion par ARNi de hUPF2 inhibe l'interaction entre SURF et l'EJC ce qui semble soutenir son rôle de pont moléculaire entre les deux complexes (Kashima et al. 2006). De même, le fait que la phosphorylation d'hUPF1 soit inhibée par des mutations qui abolissent l'interaction entre hUPF1 et hUPF2, ou entre hUPF2 et hUPF3X, conforte cette nécessité de pont entre hUPF1 et l'EJC (Kashima et al. 2006). Cependant, des travaux ultérieurs ont permis de mettre en évidence qu'une protéine hUPF1 mutante qui n'interagit plus avec hUPF2 peut toujours former un complexe avec hSMG1 et hUPF3X et être phosphorylée (Ivanov et al. 2008). Une hypothèse pour expliquer ces résultats un peu contradictoires serait que le complexe SURF peut agir avec l'EJC par l'intermédiaire d'hUPF2 et/ou hUPF3X.

Le complexe EJC et le complexe SURF forment ensemble le complexe DECID (*Decay inducing complex*) dans lequel hUPF1 est phosphorylée (Figure 12) (Kashima et al. 2006). Comme nous le verrons par la suite, la phosphorylation de hUPF1 est l'événement qui déclenche les étapes subséquentes de dégradation. Le complexe DECID peut se former seulement sur un ARNm qui porte un PTC, puisque dans un ARNm normal il n'y aura pas d'EJC avec lequel SURF puisse interagir.

#### 2.3.4. Le rôle de PABPC

Plusieurs études récentes ont mis en évidence que la protéine PABP cytoplasmique (PABPC) qui est présente sur l'extrémité 3'UTR de l'ARNm joue un rôle d'antagoniste du NMD dans les cellules de mammifère (Eberle et al. 2008; Ivanov et al. 2008; Silva et al. 2008; Singh et al. 2008). En effet, il a été mis en évidence que le NMD peut être inhibé lorsque la distance entre le PTC et PABPC est raccourcie par l'utilisation d'un 3'UTR modifié qui se replie sur lui-même (Eberle et al. 2008) ou en fixant artificiellement PABPC en aval du PTC (Ivanov et al. 2008; Silva et al. 2008). Par ailleurs, l'observation que la déplétion de PABPC par ARNi augmente la translecture sur un ARNm rapporteur luciférase suggère que PABPC non seulement inhibe le NMD mais aussi qu'elle stimule l'efficacité de la terminaison de la traduction (Ivanov et al. 2008). De façon intéressante, eRF3 est capable d'interagir directement avec PABPC et avec hUPF1 *in vitro*, bien qu'avec une affinité plus élevée pour PABPC que pour hUPF1 (Singh et al. 2008). Il a donc été proposé que PABPC et hUPF1 soient en compétition pour la fixation à eRF3, de sorte que PABPC inhiberait le NMD en se fixant à eRF3 en empêchant ainsi le recrutement de hUPF1 sur le ribosome et la formation de DECID (Singh et al. 2008). Il est intéressant de noter que les homologues de PABPC chez la levure et les cellules d'insecte jouent un rôle important dans la reconnaissance des PTC chez ces organismes, dans lesquels le NMD ne dépend pas de l'EJC (voir chapitre 2.6) (Amrani et al. 2004).





**Figure 12. Assemblage du complexe de surveillance.**  
 Explications dans le texte. Adaptation de (Kashima et al. 2006)

### 2.3.5. Le rôle de CBP80

Il semblerait que tout comme PABPC sur l'extrémité 3' d'un ARNm, les protéines de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm, et plus spécifiquement CBP80, aient un rôle important sur le NMD. En effet, il a été montré que CBP80 interagit avec hUPF1 et stimule le NMD en augmentant l'interaction de hUPF1 avec hUPF2 (Hosoda et al. 2005).

Récemment Hwang et collaborateurs ont démontré à l'aide de peptides qui interfèrent avec l'interaction entre CBP80 et hUPF1, que l'inhibition de cette interaction proscrit le NMD en empêchant d'une part, l'interaction entre hUPF1-hSMG1 et eRF1-eRF3 pour former le complexe SURF, et d'autre part, l'interaction entre hUPF1-hSMG1 et l'EJC nécessaire à la phosphorylation de hUPF1 (Hwang et al. 2010). Ils ont émis l'hypothèse que CBP80 facilite la communication entre SURF et l'EJC en deux étapes : d'abord CBP80 stimule l'association de hSMG1-hUPF1 avec eRF1-eRF3 pour former le complexe SURF au niveau du PTC, et ensuite CBP80 stimule l'interaction de hSMG1-hUPF1 dans SURF avec hUPF2 dans l'EJC pour induire la phosphorylation de hUPF1 (Hwang et al. 2010).

### 2.3.6. Conséquences de la phosphorylation d'UPF1

La phosphorylation d'hUPF1 suite à l'interaction entre SURF et l'EJC est l'événement qui va entraîner la dégradation d'un ARNm portant un PTC (Kashima et al. 2006). Cependant le mécanisme par lequel hUPF1 phosphorylée induit les étapes subséquentes de dégradation reste encore mal connu. Une possibilité serait que la phosphorylation de hUPF1 soit nécessaire pour induire le remodelage du complexe de surveillance afin de recruter d'autres facteurs qui induiraient sa déphosphorylation et/ou accéléreraient la dégradation de l'ARNm aberrant. En effet, il a été mis en évidence que hUPF1 non phosphorylée s'associe préférentiellement avec hUPF2 et hUPF3L (la forme longue de hUPF3) (Ohnishi et al. 2003; Schell et al. 2003), alors que hUPF1 phosphorylée présente plus d'affinité avec hSMG5-hSMG7-PP2Ac (le complexe responsable de la déphosphorylation), avec hUPF3S (la forme courte de hUPF3 issue d'un épissage alternatif) (Ohnishi et al., 2003; Schell et al., 2003) et avec les enzymes de dégradation DCP1a, XRN1 et RRP4 (Isken et al. 2008).

Une autre conséquence de la phosphorylation de hUPF1 est la répression traductionnelle des ARNm non-sens. En effet, il a été montré que hUPF1 phosphorylée se fixe au facteur d'initiation de la traduction eIF3 du complexe 40S de pré-initiation ce qui empêche son interaction avec la sous-unité 60S, et par conséquent la formation du complexe d'initiation de la traduction 80S (Isken et al. 2008). De cette façon, les ARNm qui sont

reconnus comme aberrants lors du premier tour de la traduction deviennent inaptes pour subir d'autres cycles de traduction et sont dégradés (Isken et al. 2008).

### 2.3.7. La déphosphorylation de hUPF1 et la dégradation de l'ARNm

La déphosphorylation de hUPF1 nécessite la présence des facteurs hSMG5, hSMG7 et hSMG6, qui recrutent la protéine phosphatase 2A (PP2A) sur hUPF1 phosphorylée (Chiu et al. 2003; Ohnishi et al. 2003). Tout comme l'étape de phosphorylation, la déphosphorylation de hUPF1 est cruciale dans le mécanisme du NMD. En effet, l'inhibition de l'interaction de hSMG5 avec hUPF1, soit par des mutants de hSMG5, soit par la molécule inhibitrice NMDI1, résulte dans l'accumulation de hUPF1 phosphorylée et entraîne une inhibition du NMD (Ohnishi et al. 2003; Durand et al. 2007).

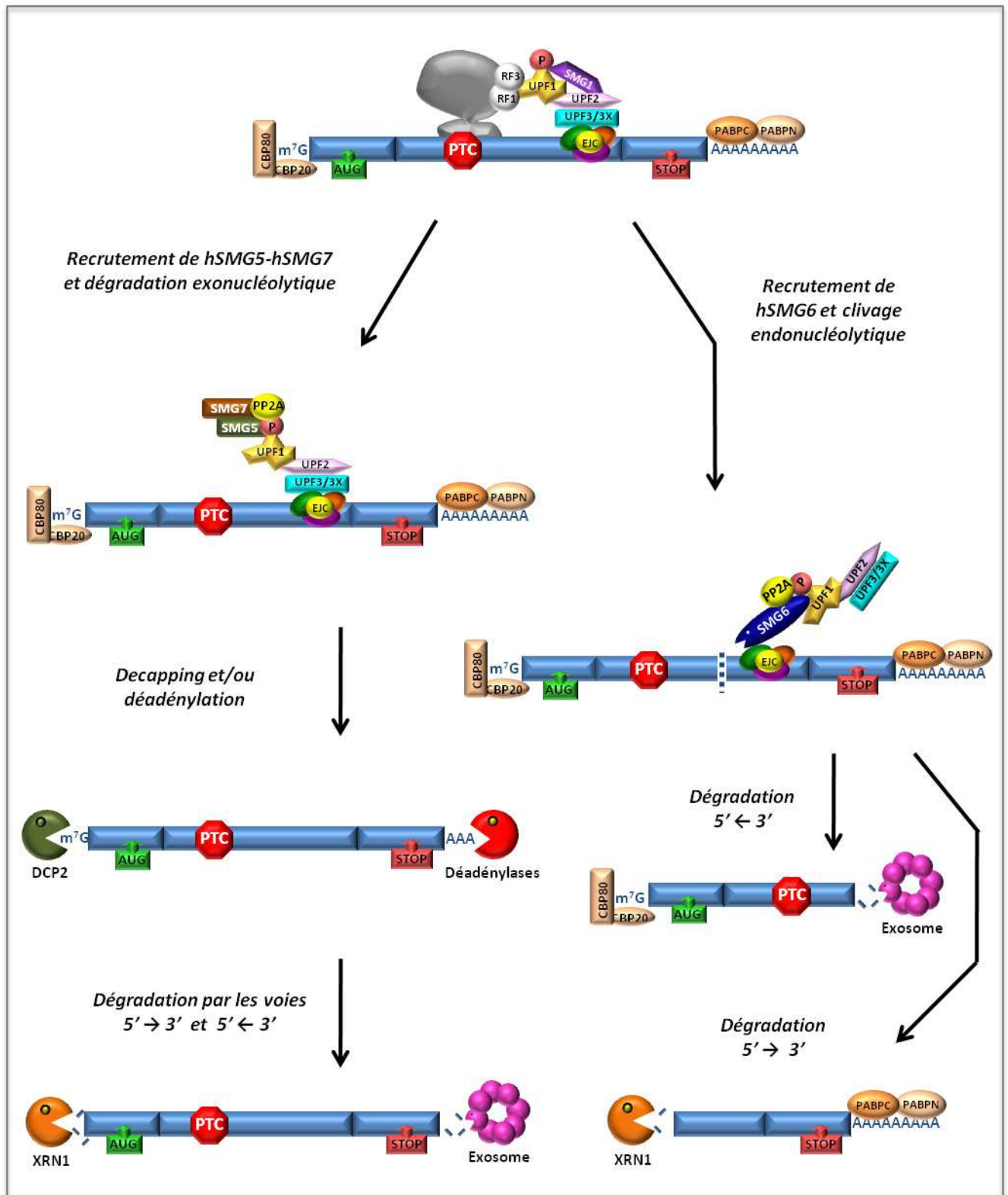
hSMG5 et hSMG7 forment un hétérodimère stable qui coimmunoprécipite avec la PP2A et hUPF1 phosphorylée (Ohnishi et al. 2003). hSMG7 pourrait être le lien entre le complexe de surveillance et la machinerie de dégradation des ARNm. D'une part, lorsqu'elle est surexprimée, hSMG7 est capable de cibler hUPF1 aux P-bodies (Unterholzner and Izaurralde 2004). D'autre part, la fixation artificielle de hSMG7 sur un ARNm entraîne rapidement sa dégradation et ceci indifféremment de la présence d'un codon stop en amont du site de fixation. De manière intéressante, cette dégradation nécessite la présence des protéines DCP2 et XRN1 (Unterholzner and Izaurralde 2004). Des expériences de fixation artificielle en utilisant hSMG7 entière ou seulement ses domaines N- ou C-ter, ont permis de conclure que hSMG7 aurait deux domaines fonctionnels : un domaine N-ter pour l'interaction avec hSMG5 et hUPF1 phosphorylée et un domaine C-ter pour l'interaction avec les composants de la machinerie de dégradation (Unterholzner and Izaurralde 2004). De cette façon, hSMG7 peut coupler les changements dans le statut de phosphorylation de hUPF1 à la dégradation des transcrits contenant un PTC.

La dégradation des ARN soumis au NMD utilise les mêmes enzymes qui interviennent dans la dégradation des ARNm normaux (présentées dans le paragraphe 1.2), mais par des voies spécialisées afin d'assurer une élimination plus rapide des transcrits aberrants. Ainsi chez la levure, les ARNm soumis au NMD peuvent être dégradés par decapping suivi de la dégradation 5'→3', et ce sans passer par l'étape de déadénylation qui est pré-requise pour un ARNm normal (Muhlrad and Parker 1994). Alternativement, ils peuvent être dégradés par déadénylation accélérée suivie de la dégradation 3'→5' en impliquant l'exosome (Mitchell and Tollervey 2003). Chez les mammifères, plusieurs études montrent que la dégradation des ARNm soumis au NMD peut se faire aussi dans les deux sens : (i) les trois protéines UPF co-

immunoprécipitent avec DCP2, les exonucléases 5'→3' RAT1 (aussi appelée XRN2) et XRN1, mais aussi avec les exonucléases 3'→5' PM/Scf100, RRP4, RRP41 et PARN (Lykke-Andersen 2002; Lejeune et al. 2003); (ii) la déplétion par ARNi de DCP2, de PM/Scf100 et de PARN abolit le NMD (Lejeune et al. 2003); (iii) DCP2 et XRN1 sont nécessaires pour la dégradation induite par la fixation artificielle de hSMG7 (Unterholzner and Izaurralde 2004) (iv) les ARNm portant un PTC subissent une déadénylation accélérée suivie du decapping (Chen and Shyu 2003; Yamashita et al. 2005a); (v) enfin, ils peuvent aussi subir un decapping indépendant de la déadénylation puisqu'il est possible de détecter des ARNm non-sens sans coiffe mais toujours partiellement adénylés (Couttet and Grange 2004).

hSMG6 co-immunoprécipite aussi avec PP2A et hUPF1 phosphorylée mais semble agir de façon plus indépendante de l'hétérodimère hSMG5-SMG7 (Chiu et al. 2003; Ohnishi et al. 2003). Elle serait recrutée au complexe de surveillance par l'intermédiaire de son domaine N-terminal, grâce à la présence de deux motifs de liaison à l'EJC appelés EBM (*EJC binding motifs*) découverts récemment (Kashima et al. 2010). Des mutations sur ces motifs empêchent l'interaction de hSMG6 avec l'EJC et inhibent le NMD. De façon intéressante, ces motifs ont été aussi identifiés dans les protéines hUPF3 et hUPF3X (Buchwald et al. 2010). D'ailleurs, Kashima et collaborateurs ont établi que hUPF3X et hSMG6 sont en compétition pour le même endroit de fixation à l'EJC, mais l'affinité pour hUPF3X est plus élevée ce qui empêche l'accès de hSMG6 à l'ARNm (Kashima et al. 2010). Ils ont ainsi émis l'hypothèse que sur une fraction des ARNm portant un PTC, l'assemblage du complexe de surveillance et la phosphorylation de hUPF1 induiraient un remodelage de la mRNP qui entraînerait la dissociation de hUPF3X de l'EJC et permettrait à hSMG6 d'interagir avec l'EJC. Du fait de son activité endonucléase, hSMG6 couperait l'ARNm porteur de la mutation non-sens (Kashima et al. 2010).

Ainsi, il existerait deux voies possibles pour la dégradation des ARNm après la phosphorylation de hUPF1 (Figure 13): dans la première, hUPF1 serait fixée par hSMG5-hSMG7 ce qui conduirait au recrutement des enzymes de déadénylation, de decapping et enfin aux exonucléases; et dans la deuxième voie, hUPF1 serait fixée par hSMG6 ce qui induirait un clivage endonucléolytique à proximité du PTC et la dégradation subséquente des deux fragments par des exonucléases. Chez la drosophile, la dégradation dépend exclusivement du clivage par SMG6, vraisemblablement en raison de l'absence d'un homologue de SMG7 (Gatfield and Izaurralde 2004). Cependant, chez les mammifères la contribution individuelle de chacune de ces voies de dégradation reste inconnue et il n'est pas exclu qu'elles interviennent de façon concomitante.



**Figure 13. Modèle des voies de dégradation des ARNm soumis au NMD.**

Gauche : hUPF1 phosphorylée peut être fixée par l'hétérodimère hSMG5-hSMG7, ce qui conduit au recrutement des enzymes de déadénylation, de decapping et enfin les exonucléases pour dégrader l'ARNm. Droite : hUPF1 phosphorylée est fixée par hSMG6 qui réalise un clivage endonucléolytique à proximité du PTC, ensuite les deux fragments résultants sont dégradés par les voies exonucléolytiques.

### 2.3.8. Les P-bodies et la dégradation des ARNm soumis au NMD

Plusieurs protéines impliquées dans la dégradation des ARNm non-sens peuvent être localisées dans les P-bodies dans des circonstances spécifiques. Chez la levure, les facteurs Upf1p, Upf2p et Upf3p localisent dans les P-bodies dans des mutants  $\Delta Xrn1$ ,  $\Delta Dcp1$  ou  $\Delta Dcp2$  (Sheth and Parker 2006). De façon similaire, chez l'homme hUPF1, hUPF3 et hUPF3X localisent dans les P-bodies lorsque le NMD est inhibé par une molécule chimique (Durand et al. 2007). Enfin, les facteurs hSMG5, hSMG6 et hSMG7 s'accumulent dans les P-bodies lorsqu'ils sont surexprimés (Unterholzner and Izaurralde 2004; Durand et al. 2007). Ces observations suggèrent que les P-bodies peuvent être les lieux de dégradation des ARNm portant un PTC.

Les observations de l'équipe du Pr. Roy Parker montrent que chez la levure les ARNm non-sens sont effectivement localisés et dégradés dans les P-bodies. L'acheminement vers les P-bodies dépend d'Upf1p, alors que la dégradation nécessite la présence d'Upf2p et Upf3p dans ces structures (Sheth and Parker 2006). Il semblerait que l'activité ATPase d'Upf1p soit nécessaire au recrutement d'Upf2p et Upf3p puisque chez un mutant ATPase, Upf1p s'accumule dans les P-bodies contrairement à Upf2p et Upf3p (Sheth and Parker 2006).

Chez les mammifères, le rôle des P-bodies dans la dégradation des ARNm non-sens est moins clair. D'une part, l'absence de P-bodies (au moins détectables microscopiquement) contenant Ge-1 ou DCP1a ne semble pas affecter l'efficacité du NMD (Stalder and Muhlemann 2009). D'autre part, l'accumulation des facteurs du NMD et des ARNm portant un PTC est fortement observée uniquement lorsque les étapes tardives du NMD sont bloquées, soit par inhibition de la déphosphorylation de hUPF1 (Durand et al. 2007), soit par inhibition de l'activité ATPase de hUPF1 (Franks et al. 2010). Les deux cas peuvent induire une accumulation de mRNP porteuses de PTC réprimées traductionnellement qui à leur tour peuvent s'accumuler dans les P-bodies. Cependant, rien n'indique que les ARNm soient dégradés dans ces structures, alors la relation précise entre P-bodies et dégradation des ARNm non-sens reste encore à élucider dans les cellules de mammifères.

## 2.4. Localisation subcellulaire du NMD

Dans les années 1990-1995, il a été observé dans les cellules de mammifère que la plupart des ARNm non-sens présentaient des niveaux réduits par rapport à leur version sauvage, non seulement dans la fraction cytoplasmique mais aussi dans la fraction nucléaire, ce qui suggérait que le NMD puisse avoir lieu dans les deux compartiments cellulaires (Maquat 1995). Cependant, l'existence du NMD dans le noyau semble paradoxale puisque

comme nous avons vu précédemment, le NMD dépend de la traduction qui est reconnue comme un processus cytoplasmique. Ceci semble être une particularité des cellules de mammifère car dans les autres espèces étudiées, le NMD est restreint uniquement à la fraction cytoplasmique. Deux modèles ont été proposés pour expliquer la dégradation que l'on observe dans les fractions nucléaires : le modèle du scanning nucléaire et le modèle d'export co-traductionnel.

Le modèle du scanning nucléaire propose l'existence d'un mécanisme de traduction nucléaire, dans lequel des ribosomes nucléaires détecteraient les ARNm non-sens et induiraient un NMD intranucléaire (Wilkinson and Shyu 2002). Ce modèle a été soutenu par la démonstration faite par Iborra et collaborateurs qu'entre 5 et 10% de la synthèse protéique aurait lieu dans le noyau (Iborra et al. 2001). Toutefois la principale difficulté pour ce genre d'études est d'obtenir des noyaux non contaminés par le cytoplasme. Nathanson et collaborateurs ont démontré que la traduction nucléaire mesurée par Iborra et collaborateurs aurait été surestimée du fait d'une contamination des noyaux avec du cytoplasme (Nathanson et al. 2003). Ils ont modifié le protocole de purification afin d'obtenir des noyaux plus « propres » et ils n'ont obtenu aucune synthèse protéique significative dans le noyau puisque celle-ci s'élevait à moins de 1% (Nathanson et al. 2003).

Une autre observation qui aurait pu soutenir l'existence d'un NMD intranucléaire est le fait que l'efficacité du NMD sur des ARNm TCR- $\beta$  non-sens n'est pas affectée lorsque l'on essaie d'inhiber l'export des ARN vers le cytoplasme au moyen d'une surexpression de la protéine VSVM (pour *vesicular stomatitis virus matrix*) (Buhler et al. 2002). Cette protéine d'origine virale se lie à la protéine du pore nucléaire Nup98 et peut inhiber l'export des ARN (von Kobbe et al. 2000). Toutefois, la surexpression de VSVM ne bloque pas complètement le transport nucléocytoplasmique (von Kobbe et al. 2000) et par conséquent, il est toujours possible que les ARNm soient reconnus et dégradés lorsqu'ils sont exportés vers le cytoplasme comme le propose le deuxième modèle (Dahlberg et al. 2003).

En effet, le modèle d'export co-traductionnel propose que le NMD a lieu dans le cytoplasme mais sur les ARNm qui sont encore en cours d'export (Maquat 1995). Les ribosomes du côté cytoplasmique de la membrane nucléaire engageraient la traduction des ARNm qui sont en cours d'export à travers le pore nucléaire, de manière à ce que la reconnaissance du PTC se fasse lorsque l'ARNm est encore physiquement lié à la membrane nucléaire (Maquat 1995). Les travaux de Singh et collaborateurs ont apporté des évidences que la reconnaissance des PTC se fait dans le cytoplasme (Singh et al. 2007). Ils ont montré que l'expression de peptides qui bloquent les interactions entre les protéines hUPF a comme

conséquence l'inhibition du NMD, mais seulement lorsque ces peptides sont exprimés dans le cytoplasme. En revanche lorsqu'ils sont concentrés dans le noyau, l'efficacité du NMD n'est pas affectée. De plus, ces auteurs ont montré que la rétention artificielle de hUPF1 dans le noyau (en déplétant hUPF1 dans le cytoplasme et en surexprimant une forme de hUPF1 fusionnée à un signal de rétention nucléaire) a pour effet d'inhiber le NMD. Ces résultats suggèrent que l'interaction entre hUPF1 et l'EJC se fait essentiellement dans le cytoplasme (Singh et al. 2007).

### 2.5. Les PTC qui ne suivent pas la règle

Nous avons vu qu'en règle générale, un codon stop est reconnu comme un PTC s'il est placé 50-55 nucléotides en amont de la dernière jonction exon-exon (paragraphe 2.2.1). Cependant, il existe quelques exceptions. En effet, des ARNm porteurs d'un PTC situé à moins de 50-55 nt en amont de la dernière jonction exon-exon et qui subissent le NMD ont été identifiés. Par exemple, sur l'ARNm codant pour le récepteur  $\beta$  des cellules T (TCR- $\beta$ ) ou celui codant pour l'immunoglobuline  $\mu$  (Ig- $\mu$ ), les PTC peuvent être situés seulement à 8-10 nt de la dernière jonction exon-exon et induire quand même le NMD (Carter et al. 1996; Wang et al. 2002a; Buhler et al. 2004). Il faut noter toutefois que contrairement à ce qui avait été montré pour d'autres ARNm, il existe une polarité dans l'efficacité du NMD dans ces transcrits : plus le PTC s'éloigne en 5' de la dernière jonction exon-exon et plus le NMD est efficace (Wang et al. 2002a; Buhler et al. 2004).

D'autre part, il existe des cas dans lesquels le NMD est induit même lorsqu'il n'y a pas d'EJC en aval du PTC. Ce phénomène appelé NMD « failsafe » a été observé lorsque l'on exprime des gènes artificiels dans lesquels le PTC se situe sur l'avant-dernier exon et dans lesquels le dernier intron en 3' a été éliminé. Quelques exemples sont les ARNm de TPI (Cheng et al. 1994), globine (Zhang et al. 1998b), Hexa (Rajavel and Neufeld 2001) et Ig- $\mu$  (Buhler et al. 2006). Il faut noter cependant que pour les transcrits dans lesquels le NMD failsafe a été observé, l'efficacité de la dégradation est considérablement augmentée lorsque l'on place un EJC en aval du PTC (Zhang et al. 1998b; Rajavel and Neufeld 2001; Buhler et al. 2006).

Le NMD failsafe, comme le NMD classique EJC-dépendant a lieu seulement sur des ARNm liés à CBP80 et dépend de hUPF1 (Matsuda et al. 2007). Le mécanisme par lequel le NMD est déclenché dans ces transcrits reste mal connu. L'observation que le rallongement de la partie 3'UTR d'un minigène Ig- $\mu$  induit la reconnaissance du codon stop normal comme un PTC et déclenche le NMD (Buhler et al. 2006) suggère que le failsafe pourrait être un vestige



du mécanisme du faux 3'UTR décrit chez la levure dans lequel le NMD est indépendant de l'EJC et est induit par un 3'UTR anormalement long (Amrani et al. 2004). Ce mécanisme de faux 3'UTR sera discuté dans le chapitre suivant.

## 2.6. La reconnaissance des PTC chez les autres eucaryotes

Chez *D. melanogaster* et *C. elegans*, l'EJC n'est pas indispensable à la reconnaissance d'un PTC (Gatfield et al. 2003; Longman et al. 2007). Chez la levure *S. cerevisiae* moins de 5% des gènes possèdent un intron et les protéines de l'EJC sont absentes (Culbertson and Leeds 2003). Ainsi, il doit exister un autre type de signal pour la reconnaissance d'un PTC et la dégradation des ARNm dans ces organismes.

### 2.6.1. Le modèle DSE

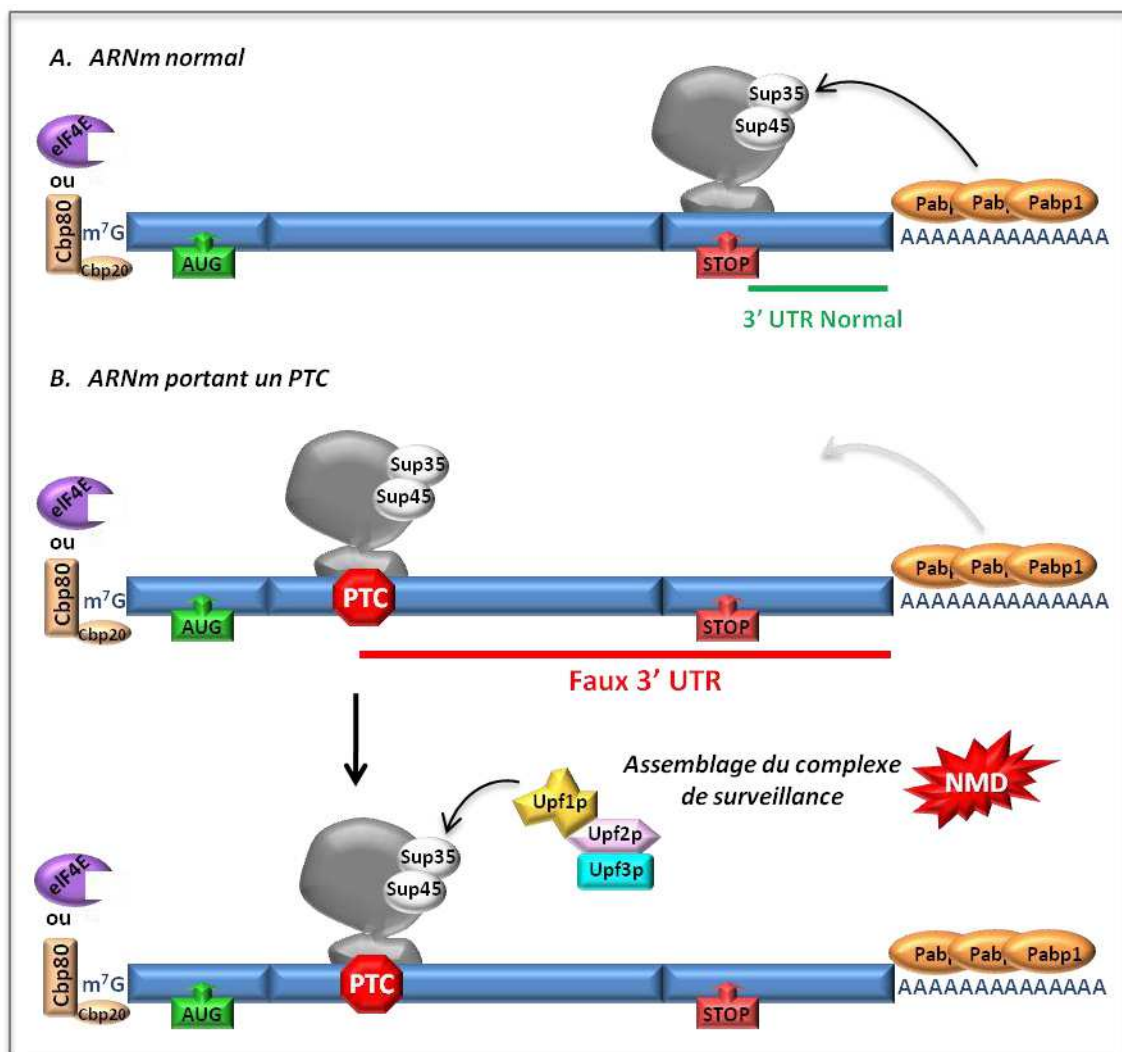
Des études chez la levure ont conduit initialement à proposer que le deuxième signal pour la reconnaissance d'un PTC serait la présence d'une séquence appelée DSE (*downstream sequence element*) en aval du codon stop (Peltz et al. 1993). En effet, Peltz et collaborateurs ont constaté que la présence de ces séquences sur l'ARNm de la phosphoglycérate kinase (PGK1) induit sa dégradation par NMD. Inversement la délétion de la DSE permet de stabiliser l'ARNm (Peltz et al. 1993). Ces DSE recrutent la protéine Hrp1p qui à son tour interagit avec Upf1p pour induire l'assemblage du complexe de surveillance (Gonzalez et al. 2000). Bien que les régions 3'UTR de la plupart des gènes de levure contiennent des séquences riches en A/U qui pourraient ressembler à des DSE, les interactions DSE-Hrp1p ont été montrées seulement pour l'ARNm PGK1 (Gonzalez et al. 2000), ce qui laisse penser que cette voie d'activation du NMD reste marginale.

### 2.6.2. Le modèle du faux 3'UTR

Plusieurs études ont mis en évidence que chez *S. cerevisiae* (Amrani et al. 2004), *D. melanogaster* (Behm-Ansmant et al. 2007a), et *C. elegans* (Longman et al. 2007), le NMD dépend de la longueur de la région 3'UTR : un transcrit avec une distance anormalement longue entre le PTC et la queue poly(A) serait reconnu comme aberrant et dégradé. Par exemple chez *S. cerevisiae* les parties 3'UTR des ARNm sont en général courtes et homogènes en taille (en moyenne 100 nt) et les transcrits possédant une partie 3'UTR plus grande que la taille moyenne sont souvent des cibles du NMD (Rehwinkel et al. 2006).

Le modèle du faux 3'UTR, défini initialement chez *S. cerevisiae*, propose que la terminaison prématurée de la traduction est intrinsèquement aberrante du fait qu'un PTC qui

apparaîtrait sur un ARNm ne se trouverait pas dans le contexte normal de terminaison de la traduction (Amrani et al. 2004). Selon ce modèle, la terminaison normale de la traduction nécessite l'interaction entre le ribosome et certains facteurs spécifiques qui comprennent notamment la protéine Pabp1 (PABPC chez les mammifères). En revanche, la terminaison de la traduction sur un PTC serait abolie ou très inefficace du fait que le PTC se retrouve entouré d'une séquence qui n'est pas la partie 3'UTR de l'ARNm, c'est-à-dire un « faux » 3'UTR dans lequel les ribosomes ne pourraient pas interagir avec Pabp1. Par conséquent, le ribosome resterait bloqué sur le PTC, le complexe de surveillance serait assemblé et la dégradation de l'ARNm serait déclenchée (Figure 14) (Amrani et al. 2004; Amrani et al. 2006a).



**Figure 14. Modèle du faux 3'UTR chez *S. cerevisiae*.**

(A) Dans un transcrit avec un 3'UTR normal (trait vert) le codon stop se trouve relativement près de la queue polyA et Pabp1 peut stimuler la terminaison de la traduction. (B) L'apparition d'un PTC à une distance anormalement longue de la queue polyA génère un faux 3'UTR (trait rouge). Le ribosome reste bloqué sur le PTC et ne peut plus interagir avec Pabp1. Le complexe de surveillance est alors assemblé et l'ARNm est dégradé. Chez la levure les PTC peuvent être reconnus sur des ARNm liés à eIF4E ou à Cbp80-Cbp20 dans leur coiffe.

De façon consistante avec ce modèle, la fixation de Pabp1 en aval du PTC permet une terminaison de la traduction efficace et inhibe le NMD, ce qui suggère que la présence de Pabp1 est suffisante pour mimer un 3'UTR normal (Amrani et al. 2004; Behm-Ansmant et al. 2007a). L'observation que Pabp1 interagit avec Sup35 (eRF3 chez les métazoaires) (Czaplinski et al. 1998; Hoshino et al. 1999; Amrani et al. 2004) soutient l'hypothèse que la fixation de Pabp1 en aval d'un PTC augmente l'efficacité de la terminaison de la traduction et stimule la dissociation du ribosome, en abolissant le NMD. En accord avec cette hypothèse, la fixation de Sup35 chez *S. cerevisiae* ou d'eRF3 chez *D. melanogaster* en aval d'un PTC inhibe aussi le NMD (Amrani et al. 2004).

### **3. Importance physiologique du NMD**

#### **3.1. Origine des codons stop prématurés**

Plusieurs événements au niveau de l'ADN ou de l'ARNm peuvent donner origine à un PTC. Au niveau de l'ADN, un PTC peut apparaître soit comme conséquence d'une mutation non-sens, c'est-à-dire la substitution d'un nucléotide qui entraîne le remplacement d'un codon qui spécifie un acide aminé par un des trois codons de terminaison de la traduction ; soit comme conséquence des mutations d'insertion ou délétion qui provoquent le décalage du cadre de lecture. De plus, des mutations qui perturbent l'épissage ont souvent comme conséquence l'apparition d'ARNm avec PTC du fait de la conservation dans l'ARNm de séquences introniques riches en PTC ou par le décalage du cadre de lecture (Lejeune and Maquat 2005). Enfin les réarrangements programmés dans les gènes qui codent pour les TCR ou pour les immunoglobulines lors du développement lymphocytaire produisent très fréquemment des allèles porteurs de PTC (Li and Wilkinson 1998). Au niveau de l'ARN, un PTC peut apparaître lors de la transcription suite à des erreurs de l'ARN polymérase II ou lors de la maturation de l'ARN pré-messager par épissage alternatif. Cependant le taux d'erreur de la polymérase est très faible, de l'ordre de 1 nucléotide pour  $10^5$  nucléotides polymérisés, par conséquent moins de 0,5 % des transcrits acquerraient un PTC par cette voie (Muhlemann et al. 2008). En revanche, l'épissage alternatif de l'ARN pré-messager semble être la source la plus importante des transcrits non-sens (Lejeune and Maquat 2005). On estime qu'environ un tiers des événements d'épissage alternatif résultent en une forme d'ARNm contenant un PTC (Lewis et al. 2003).

#### **3.2. Les substrats physiologiques du NMD**

Bien que très longtemps, on ait attribué au NMD un rôle exclusivement dans le « nettoyage » des transcrits aberrants (Neu-Yilik et al. 2004) aujourd'hui il est reconnu aussi comme un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de l'expression de certains ARNm physiologiques.

Une approche qui a été utilisée afin d'estimer le rôle du NMD dans la régulation de transcrits physiologiques consiste à analyser des microarrays transcriptomiques sur des cellules dans lesquelles le NMD est inhibé par la déplétion par ARNi des facteurs UPF. De telles études ont été conduites chez la levure (He et al. 2003), le nématode (Mitrovich and Anderson 2005), la drosophile (Rehwinkel et al. 2005) et l'homme (Mendell et al. 2004;

Wittmann et al. 2006; Viegas et al. 2007). Chez l'homme la déplétion de hUPF1 ou hUPF2 induit une surexpression de 1.5 à 4.9% des gènes analysés (Figure 15). Toutefois on ne peut pas considérer tous ces transcrits comme des cibles directes du NMD si l'on tient compte du fait qu'un pourcentage similaire de transcrits sont sous-exprimés (Figure 15). Ceci suggère que les changements observés peuvent être des effets indirects qui seraient la conséquence de l'inhibition d'un facteur de transcription par exemple, ou du fait de bloquer la participation de hUPF1 et hUPF2 dans d'autres processus cellulaires dans lesquels ils sont impliqués indépendamment de leur rôle dans le NMD (voir chapitre 4). Enfin, il a été montré que l'utilisation d'ARNi dans les études transcriptomiques à grande échelle révèle de nombreux « faux positifs » comme conséquence d'une complémentarité partielle des ARNi avec des gènes non cibles (effets *off-target*) (Echeverri et al. 2006).

Facteur inactivé	Nombre total de transcrits	Transcrits surexprimés	Transcrits sous-exprimés	Référence
hUPF1	4000	197 (4.9%)	176 (4.4%)	(Mendell et al. 2004)
hUPF1	9336	265 (2.8%)	248 (2.6%)	(Viegas et al. 2007)
hUPF2	2400	37 (1.5%)	57 (2.4%)	(Wittmann et al. 2006)

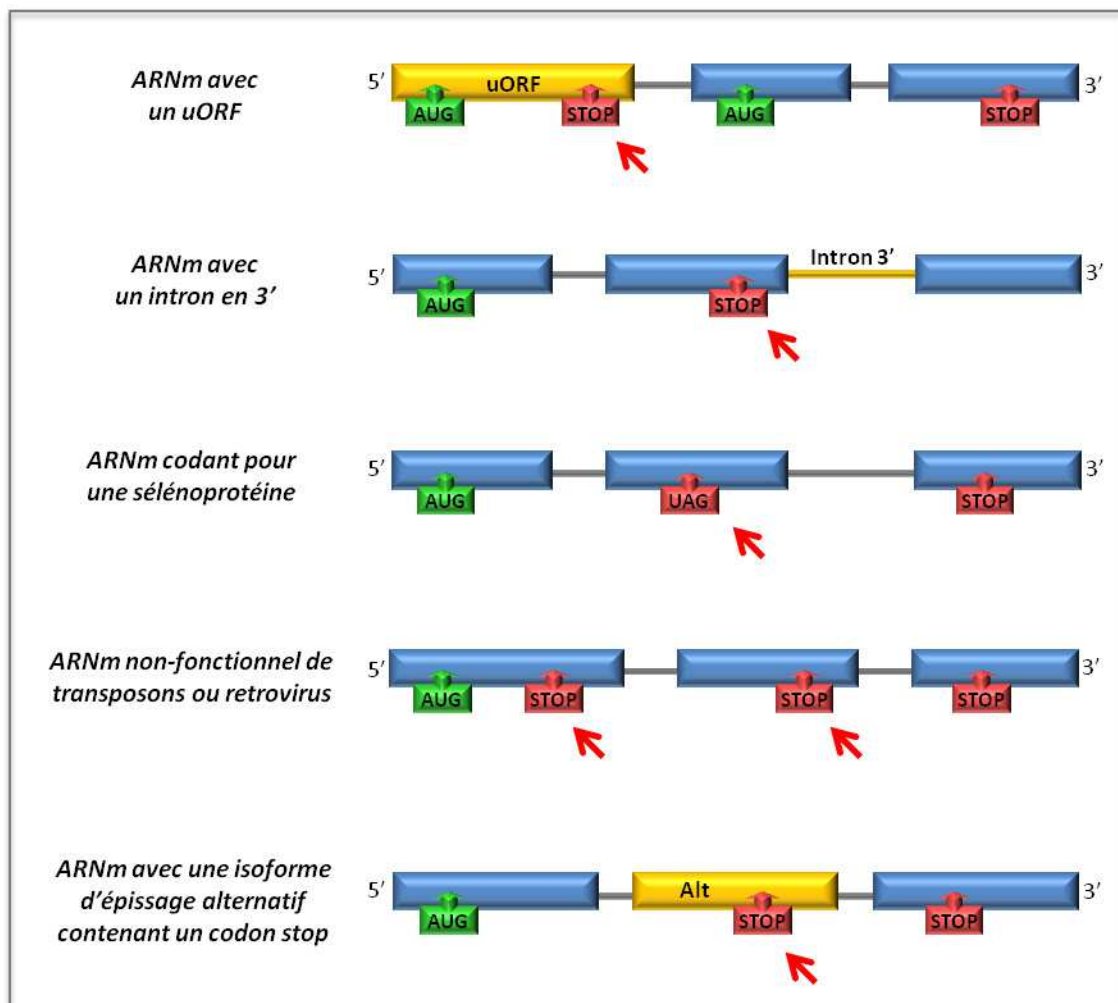
**Figure 15. Effet de la déplétion de hUPF1 ou hUPF2 sur le transcriptome.**

Comparaison des résultats de trois études de microarrays transcriptomiques réalisés après déplétion par ARNi de hUPF1 ou de hUPF2 dans des cellules humaines.

L'analyse de la structure de transcrits qui sont sur-régulés après la déplétion de hUPF1 et hUPF2 dans l'étude de Mendell et collaborateurs et Wittmann et collaborateurs respectivement, montre que seule la moitié d'entre eux présente des caractéristiques qui les rendraient susceptibles à la dégradation par NMD. De plus, une analyse sur les transcrits qui ont montré la sur-régulation la plus forte dans l'étude de Viegas et collaborateurs a mis en évidence que la plupart de ces transcrits sont sur-régulés transcriptionnellement et ne seraient donc pas des cibles directes du NMD, puisque les ARN pré-messagers sont aussi sur-régulés. Ils ont estimé que seulement un huitième des transcrits sur-régulés après la déplétion de hUPF1 seraient des cibles directes du NMD (soit environ 0.35% du total de transcrits) (Viegas et al. 2007).

Les ARNm susceptibles d'être dégradés par NMD présentent une des cinq caractéristiques décrites dans la Figure 16. Certains possèdent un uORF (*upstream open reading frame*), c'est-à-dire un cadre ouvert de lecture en amont du cadre principal ce qui fait que le codon stop de l'uORF peut être reconnu comme un PTC. D'autres présentent un intron dans la partie 3'UTR de sorte que le codon stop physiologique se retrouve en amont d'une

jonction exon-exon. On trouve aussi des ARNm qui codent pour des sélénoprotéines comme l'ARNm codant pour la glutathion peroxydase 1 (GPx1). Ces transcrits contiennent des codons UGA qui codent pour la sélénocystéine lorsque le sélénium est abondant dans le milieu, mais qui en absence de sélénium sont reconnus comme des PTC et subséquentement dégradés par NMD (Moriarty et al. 1998). On trouve aussi des ARNm transcrits à partir des gènes d'anciens transposons et rétrovirus, ce qui suggère que le NMD contribue à réduire le bruit génomique en ciblant la dégradation de transcrits qui n'ont pas de fonction biologique (Mendell et al. 2004). Enfin, on trouve des ARNm avec au moins un épissage alternatif qui provoque l'apparition d'un PTC. Comme nous le verrons dans le paragraphe suivant, certains de ces ARNm peuvent être soumis à une forme de régulation particulière par le NMD couplé à l'épissage alternatif.



**Figure 16. Caractéristiques des transcrits physiologiques dégradés par NMD.**

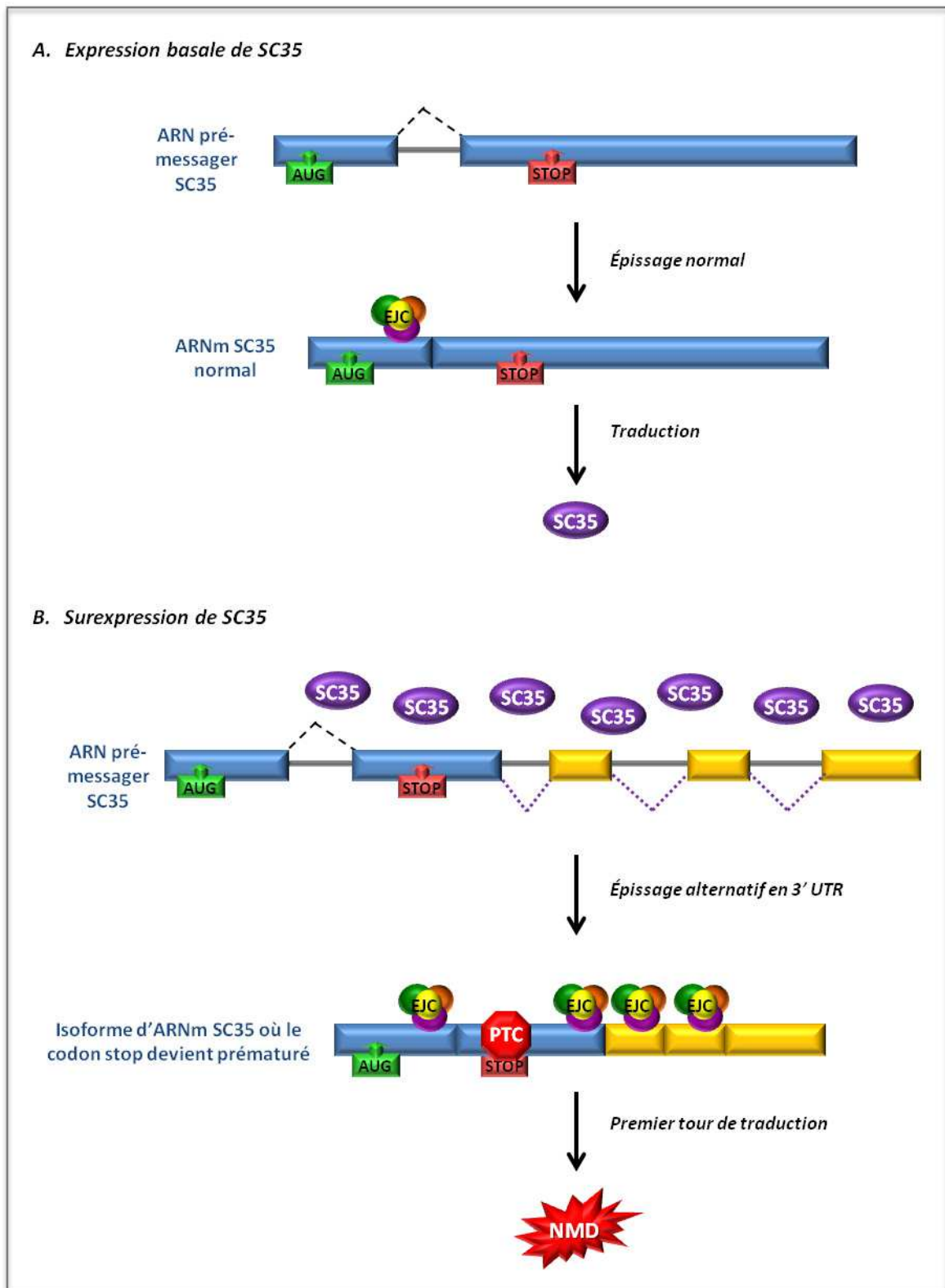
Les codons stop qui seront reconnus comme des PTC et déclencheront le NMD sur l'ARNm sont indiqués par une flèche rouge. uORF, *upstream open reading frame* ; Alt, exon alternatif.

### 3.3. Régulation par épissage alternatif couplé au NMD

La plupart des gènes chez l'homme subissent l'épissage alternatif (>95%) (Pan et al. 2008), mais ce n'est pas pour autant que tous les transcrits alternatifs sont effectivement traduits en protéines. Des analyses bioinformatiques sur des banques EST (*expressed sequence tag*) ont montré qu'environ un tiers des événements d'épissage alternatif résultent en des isoformes d'ARNm avec un PTC qui pourraient être des substrats pour le NMD (Lewis et al. 2003). Cette observation a conduit à proposer l'existence d'un mécanisme appelé RUST (*regulated unproductive splicing and translation*) qui utiliserait un couplage entre l'épissage et le NMD comme système de régulation génique (Lewis et al. 2003).

De façon intéressante, l'existence d'un tel mécanisme de régulation avait déjà été mise en évidence pour la régulation de l'expression du gène codant pour la protéine SC35 (Sureau et al. 2001). SC35 appartient à la famille des protéines SR (riches en sérine/arginine), constituée par une dizaine de protéines qui participent dans les processus d'épissage constitutif et alternatif (Bourgeois et al. 2004). Sureau et collaborateurs ont montré que lorsqu'elle est surexprimée, la protéine SC35 altère l'épissage de son propre ARNm. Comme conséquence de ces événements d'épissage, le codon stop physiologique de l'ARNm SC35 se retrouve alors en amont de jonctions exon-exon et devient ainsi un PTC qui induit la dégradation de l'ARNm par NMD. Le résultat est donc une diminution de l'expression du gène *SC35* ce qui conduit à retrouver un niveau physiologique de la protéine SC35 dans la cellule (Figure 17). Un mécanisme similaire a été décrit pour d'autres membres de la famille des protéines SR (Lareau et al. 2007) et pour une autre protéine impliquée aussi dans l'épissage, la protéine PTB (*polypyrimidine tract binding*) (Wollerton et al. 2004). Cette autorégulation de l'expression des protéines SR semble être conservée, puisque des mécanismes similaires ont été observés chez *C. elegans* (Morrison et al. 1997) et *D. melanogaster* (Kumar and Lopez 2005).

L'observation qu'environ 30% des événements d'épissage alternatif résultent en isoformes d'ARNm avec un PTC, a conduit à penser que le couplage entre l'épissage et le NMD serait un système de régulation génique amplement utilisé (Lewis et al. 2003). Cependant, des études ultérieures ont permis de mettre en évidence que seulement une fraction des isoformes contenant des PTC correspondrait à des vrais cas de régulation par RUST comme ceux mentionnés pour les protéines SR (Pan et al. 2006). En effet, il semblerait que la plupart de ces transcrits non-sens apparaissent comme conséquence d'erreurs dans l'épissage de l'ARN pré-messager qui donnent des transcrits tellement aberrants qu'ils seraient retenus dans le noyau et jamais soumis au NMD (Pan et al. 2006).



**Figure 17. Autorégulation de l'expression de SC35 par épissage alternatif couplé au NMD.** (A) Épissage de SC35 dans des conditions d'expression basale de la protéine. (B) La modification de l'épissage en 3'UTR de son propre ARNm lorsque SC35 est surexprimée, entraîne la reconnaissance du codon stop normal comme un PTC. Basé sur (Sureau et al. 2001).



### **3.4. Le NMD dans la réponse au stress par privation nutritionnelle et au stress oxydatif**

L'étude de microarray par Mendell et collaborateurs a montré que parmi les transcrits dont l'expression est augmentée après la déplétion en hUPF1, il y a une importante représentation des transcrits qui codent pour des protéines impliquées dans l'homéostasie des acides aminés (Mendell et al. 2004). En effet, dans la catégorie des transcrits qui participent dans le transport, la biosynthèse ou l'activation des acides aminés, 15% ont été sur-régulés lorsque le NMD est inhibé par la déplétion de hUPF1. Même si ces pourcentages sont vraisemblablement surestimés par les raisons évoquées précédemment, il est intéressant de noter que des analyses de microarray chez la levure ont montré des résultats similaires (He et al. 2003) suggérant un possible rôle du NMD dans la régulation du métabolisme des acides aminés. Par ailleurs, certains des transcrits stabilisés présentent des caractéristiques qui les rendraient sensibles au NMD (uORF, exons alternatifs avec des PTC) (Mendell et al. 2004).

De façon intéressante, la déplétion d'acides aminés inhibe le NMD et induit la stabilisation de certains transcrits impliqués dans le métabolisme des acides aminés en réponse au stress par privation nutritionnelle (Mendell et al. 2004). Il est connu que dans les cellules de mammifère, la déplétion d'acides aminés induit la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  ce qui entraîne une inhibition globale de la traduction (Pain 1994). De façon intéressante, la surexpression du mutant S51D d'eIF2 $\alpha$  qui mime sa forme phosphorylée, non seulement inhibe la traduction globale mais aussi le NMD (Chiu et al. 2004). Il est alors possible que l'inhibition du NMD dans des conditions de privation nutritionnelle soit une conséquence de la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ . Il est aussi possible qu'en absence d'acides aminés disponibles pour la traduction, le NMD soit inhibé car le premier tour de traduction ne peut pas avoir lieu. En effet, comme indiqué auparavant, il a récemment été montré qu'une traduction effective a lieu au cours de ce premier cycle (Apcher et al. 2011).

Une autre catégorie de transcrits qui sont stabilisés lorsque le NMD est inhibé par la déplétion de hUPF1 est constituée de certains transcrits qui sont induits par l'hypoxie et qui jouent un rôle dans la réponse intégrée au stress (Mendell et al. 2004; Gardner 2008). De façon similaire à la déplétion en acides aminés, l'hypoxie induit la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  et une inhibition du NMD (Gardner 2008). Ceci entraîne la stabilisation de transcrits tels que les facteurs de transcription ATF4, ATF3 et CHOP qui participent à la réponse au stress oxydatif (Gardner 2008). Pour certains de ces transcrits, des caractéristiques qui les rendent

susceptibles au NMD ont été identifiées, telles que deux uORF pour ATF4 (Gardner 2008) et un épissage alternatif qui introduit un PTC pour ATF3 (Mendell et al. 2004), ce qui suggère qu'ils sont des cibles directes du NMD.

Le rôle de la stabilisation de certains transcrits suite à la déplétion en acides aminés ou à des conditions d'hypoxie n'est toujours pas très clair, puisque si la traduction est bloquée par la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , ils seront très peu ou pas traduits. Il se pourrait qu'ils soient sur-régulés au niveau transcriptionnel par une boucle de régulation qui serait activée lorsque la traduction est inhibée. On peut imaginer que leur accumulation permettrait une récupération plus rapide du métabolisme cellulaire lorsque les niveaux d'acides aminés ou les niveaux d'oxygène redeviendraient normaux (Gardner 2008; Isken and Maquat 2008).

### **3.5. Le NMD dans le développement lymphocytaire**

Lors du processus de maturation des lymphocytes B et T, les gènes codant pour les TCR et les immunoglobulines subissent des réarrangements programmés (Jung et al. 2006). Ces gènes possèdent de nombreux segments V (variable) et J (jonction), et certains (TCR- $\beta$ , TCR- $\gamma$  et Ig-H) possèdent en plus des segments D (diversité). Des enzymes de recombinaison spécifiques joignent ces segments par un processus de recombinaison aléatoire, appelé recombinaison V(D)J. Puisqu'il existe de multiples segments, cette recombinaison est un important générateur de diversité. Pour augmenter encore plus cette diversité, l'enzyme transférase terminale ajoute des nucléotides aux jonctions entre les segments. Cependant lorsque le nombre de nucléotides introduits n'est pas un multiple de 3, le cadre de lecture est décalé et provoque l'apparition d'un PTC, ce qui veut dire que deux fois sur trois ces réarrangements sont non-fonctionnels. Le NMD joue alors un rôle essentiel dans le maintien d'un répertoire de récepteurs fonctionnels via la dégradation des transcrits non-sens (Li and Wilkinson 1998).

Toutefois, il est important de noter que la surveillance des gènes codant pour les TCR et les immunoglobulines fait intervenir non seulement la dégradation par NMD mais aussi d'autres voies de réponse aux mutations non-sens tels que l'altération ou l'inhibition de l'épissage (paragraphe 4.3) (Wang et al. 2002a; Chang et al. 2007; Chemin et al. 2010). On peut imaginer qu'une aussi forte surveillance aurait été sélectionnée dans les ARNm des TCR et Ig étant donné qu'ils dérivent de gènes qui acquièrent très fréquemment des PTC. Par ailleurs, l'efficacité dans la surveillance des ARNm non-sens semble être régulée au cours de la différenciation lymphocytaire. Par exemple, il a été montré récemment que l'efficacité dans

la dégradation des transcrits non-sens Ig- $\kappa$  augmente progressivement des cellules en stade pré-B aux cellules du plasma (de 60% à 90% respectivement) (Chemin et al. 2010).

### 3.6. Le NMD dans le développement embryonnaire

Chez la souris, la suppression de l'expression par *knockout* (KO) de UPF1, UPF2 ou SMG1 induit la mort très tôt pendant le développement embryonnaire (Medghalchi et al. 2001; Weischenfeldt et al. 2008; McIlwain et al. 2010). Toutefois, étant donné que ces facteurs non seulement sont essentiels au NMD mais que, au moins chez l'homme, ils participent à d'autres processus cellulaires d'importance vitale (voir chapitre suivant), il est difficile de savoir dans quelle mesure l'inactivation du NMD est responsable de la létalité de ces phénotypes.

L'utilisation de mutants KO conditionnels de UPF2 a permis d'avoir des informations sur le rôle de ce facteur dans des processus spécifiques comme le développement des lignées hématopoïétiques (Weischenfeldt et al. 2008) et du foie (Thoren et al. 2010). La suppression de l'expression de UPF2 induit l'extinction des cellules souches et progénitrices de la lignée hématopoïétique, tandis que les cellules différenciées sont peu affectées, ce qui suggère que UPF2 est essentiel dans les cellules en prolifération (Weischenfeldt et al. 2008). D'autre part, la suppression de l'expression de UPF2 dans le foie pendant l'embryogénèse n'inhibe pas le développement du foie fœtal mais bloque la différenciation terminale de l'organe et entraîne la mort périnatale (Thoren et al. 2010). Dans le foie adulte, la perte de UPF2 altère la fonction hépatique et empêche la régénération après une hépatectomie partielle (Thoren et al. 2010). Encore une fois, il n'est pas clair si ces effets sont des conséquences directes de l'inactivation du NMD ou d'autres processus cellulaires dans lesquels la protéine UPF2 pourrait être impliquée.

## 4. Les facteurs du NMD dans d'autres processus cellulaires

De plus en plus de travaux montrent que la plupart des facteurs du NMD participent à d'autres processus cellulaires (Figure 18). Je vais maintenant décrire quelques uns de ces rôles.

Facteur	Autres fonctions
<b>hUPF1</b>	Maintien des télomères Progression du cycle cellulaire Dégradation des ARNm d'histones Nonsense-associated altered splicing Staufen-mediated decay Métabolisme du HIV-1
<b>hSMG1</b>	Maintien des télomères Réponse au stress génotoxique
<b>hUPF2, hSMG5,6,7</b>	Maintien des télomères

**Figure 18. Autres fonctions des protéines hUPF et hSMG.**

### 4.1. Le maintien des télomères

Les télomères sont des régions hautement répétitives localisées à l'extrémité des chromosomes (Monaghan 2010). Chez *S. cerevisiae* plusieurs ARNm qui codent pour des protéines impliquées dans le maintien de la longueur des télomères, sont régulés par NMD. C'est le cas par exemple des gènes codant pour la sous unité catalytique de la télomérase (l'enzyme responsable de l'élongation des télomères) Est2, ou pour la protéine Est1 qui participe au recrutement de la télomérase à l'extrémité des chromosomes (Dahlseid et al. 2003). La recherche d'homologues d'Est1 chez l'homme a conduit à l'identification de trois gènes Est1a, Est1b et Est1c qui, de façon intéressante, correspondent aux facteurs du NMD hSMG6, hSMG5 et hSMG7 respectivement et se trouvent enrichis dans les télomères (Reichenbach et al. 2003; Snow et al. 2003). hSMG5 et hSMG6 interagissent directement avec la télomérase et la surexpression de hSMG6 entraîne des altérations dans la structure des télomères et de fusions bout à bout des chromosomes (Reichenbach et al. 2003; Snow et al. 2003). Enfin, la déplétion des hUPF1, hSMG1 et hSMG6, et dans un moindre degré hUPF2 et hSMG7, induit des dommages dans la structure des télomères voire leur perte (Azzalin et al. 2007).

## 4.2. La stabilité du génome et la progression du cycle cellulaire

La relation entre hUPF1 et hSMG1 n'est pas exclusive. En effet dans certains processus cellulaires indépendants du NMD, hSMG1 peut phosphoryler d'autres protéines. De même, hUPF1 n'est pas exclusivement phosphorylée par hSMG1 et peut être phosphorylée par d'autres PI3KK.

hSMG-1 est le cinquième membre de la famille des PI3KK, qui inclut également les kinases ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ATM and Rad3 related*), mTOR (*target of rapamycin*) et DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*). Elles participent toutes à des voies de réponse aux dommages à l'ADN (Abraham 2004). Comme ATM et ATR, hSMG1 est capable de phosphoryler la protéine suppresseur de tumeurs p53 lorsque les cellules sont exposées aux rayonnements ionisants (IR) ou aux ultra-violets (UV). Ceci suggère que hSMG1 collabore avec les autres PI3KK dans l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Brumbaugh et al. 2004). En accord avec cette hypothèse, la déplétion de hSMG1 induit des cassures dans l'ADN, provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2-M et augmente la sensibilité de l'ADN aux IR dans des cellules U2OS (Brumbaugh et al. 2004). De façon intéressante, sous ces mêmes conditions de stress génotoxique, hUPF1 peut être phosphorylée par hSMG1 ou par ATM : seule la déplétion simultanée (mais pas individuelle) des deux kinases diminue les niveaux de hUPF1 phosphorylée (Brumbaugh et al. 2004). Dans des conditions physiologiques, la déplétion d'ATM (à la différence de hSMG1) n'a aucun effet sur l'efficacité du NMD, ce qui suggère que la phosphorylation réalisée par ATM a un rôle qui n'est pas en rapport avec la voie NMD.

Les travaux d'Azzalin et Lingner ont permis de mettre en évidence un rôle de hUPF1 dans la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire. Ils ont observé que les cellules déplétées en hUPF1 peuvent initier mais pas achever la réplication de l'ADN et restent bloquées dans la phase S précoce, ce qui suggère que hUPF1 peut être nécessaire pour la progression de la fourche de réplication (Azzalin and Lingner 2006b). Il est intéressant de noter que hUPF1 possède un domaine ADN/ARN hélicase qui pourrait expliquer ce rôle dans les fourches de réplication. De plus, les auteurs ont observé que hUPF1 coimmunoprécipite avec les sous-unités p66 et p125 de l'ADN polymérase  $\delta$ , ce qui soutient son rôle pendant la réplication de l'ADN (Azzalin and Lingner 2006b). L'inhibition de la progression de la fourche de réplication déclenche l'activation d'une voie de réponse aux dommages à l'ADN dépendante d'une autre PI3KK, la kinase ATR (Abraham 2004). De façon intéressante, hUPF1 peut être phosphorylée aussi par ATR. Cette phosphorylation stimule l'association de hUPF1 avec la chromatine et la progression du cycle cellulaire à travers la phase S (Azzalin and

Lingner 2006b). Ainsi, dans des conditions physiologiques, ATR régule l'interaction de hUPF1 avec la chromatine pendant la progression du cycle cellulaire, et lorsque ATR est suractivée suite à des dommages à l'ADN, elle induit l'hyperphosphorylation de hUPF1 en augmentant son association avec la chromatine. La déplétion d'ATR n'affecte pas l'efficacité du NMD mais diminue l'interaction de hUPF1 avec la chromatine, ce qui montre que cette interaction est indépendante de la voie NMD (Azzalin and Lingner 2006b).

La fonction de hUPF1 dans la réplication de l'ADN et la progression du cycle cellulaire devient encore plus complexe par l'observation que hUPF1 est aussi impliquée dans la dégradation des ARNm des histones à la fin de la phase S (Muller et al. 2007). Il est intéressant de noter que ce processus est dépendant de la phosphorylation de hUPF1 par ATR ainsi que par une quatrième PI3KK, la DNA-PK (Muller et al. 2007).

Il semblerait alors que le rôle que joue hUPF1 dans les différents processus du métabolisme de l'ARN ou de l'ADN dans lesquels elle est impliquée, soit déterminé en grande partie par la kinase qui la phosphoryle. Dans ce contexte, il apparaît très important de cartographier les résidus de hUPF1 qui sont effectivement phosphorylés par chaque kinase, ce qui est une donnée manquante jusqu'à présent (Azzalin and Lingner 2006a).

### 4.3. Le NAS et le SOS

Le *nonsense-associated altered splicing* (NAS) est un autre mécanisme de réponse aux mutations non-sens dans lequel la présence d'un PTC sur un ARN pré-messager peut induire une modification dans le choix des sites d'épissage afin d'exclure l'exon qui contient le PTC de l'ARNm mature (Figure 19A) (Hentze and Kulozik 1999).

Dans les premiers cas de NAS qui ont été décrits, l'altération de l'épissage était due à des mutations qui détruisent des séquences exoniques activatrices de l'épissage appelées ESE (*exonic splicing enhancer*) (Hentze and Kulozik 1999). Lorsque ces sites sont mutés, les facteurs qui reconnaissent ces ESE, en particulier les protéines SR, ne peuvent plus se fixer ce qui réduit la fréquence d'inclusion dans l'ARNm de l'exon qui contient la mutation. Par exemple, l'apparition d'un PTC sur l'exon 51 du gène de la fibrilline-1 (impliqué dans le syndrome de Marfan) détruit une séquence ESE reconnue par le facteur d'épissage SC35, ce qui a comme conséquence l'exclusion de l'exon 51 de l'ARNm mature (Caputi et al. 2002)

La mutation non-sens peut aussi provoquer l'apparition de séquences exoniques inhibitrices de l'épissage appelées ESS (*exonic splicing silencer*). Ces séquences sont reconnues par des facteurs inhibiteurs de l'épissage, dont la fixation perturbe la

reconnaissance des sites d'épissage conduisant à l'exclusion de l'exon porteur de la mutation non-sens. Par exemple, l'apparition d'un PTC sur l'exon 31 du gène de la dystrophine (impliqué dans les dystrophinopathies de Duchenne et Becker, voir paragraphe 5.2.2) crée une séquence ESS qui est alors reconnue par la protéine hnRNP A1 et provoque l'exclusion de l'exon 31 porteur du PTC de l'ARNm mature (Disset et al. 2006).

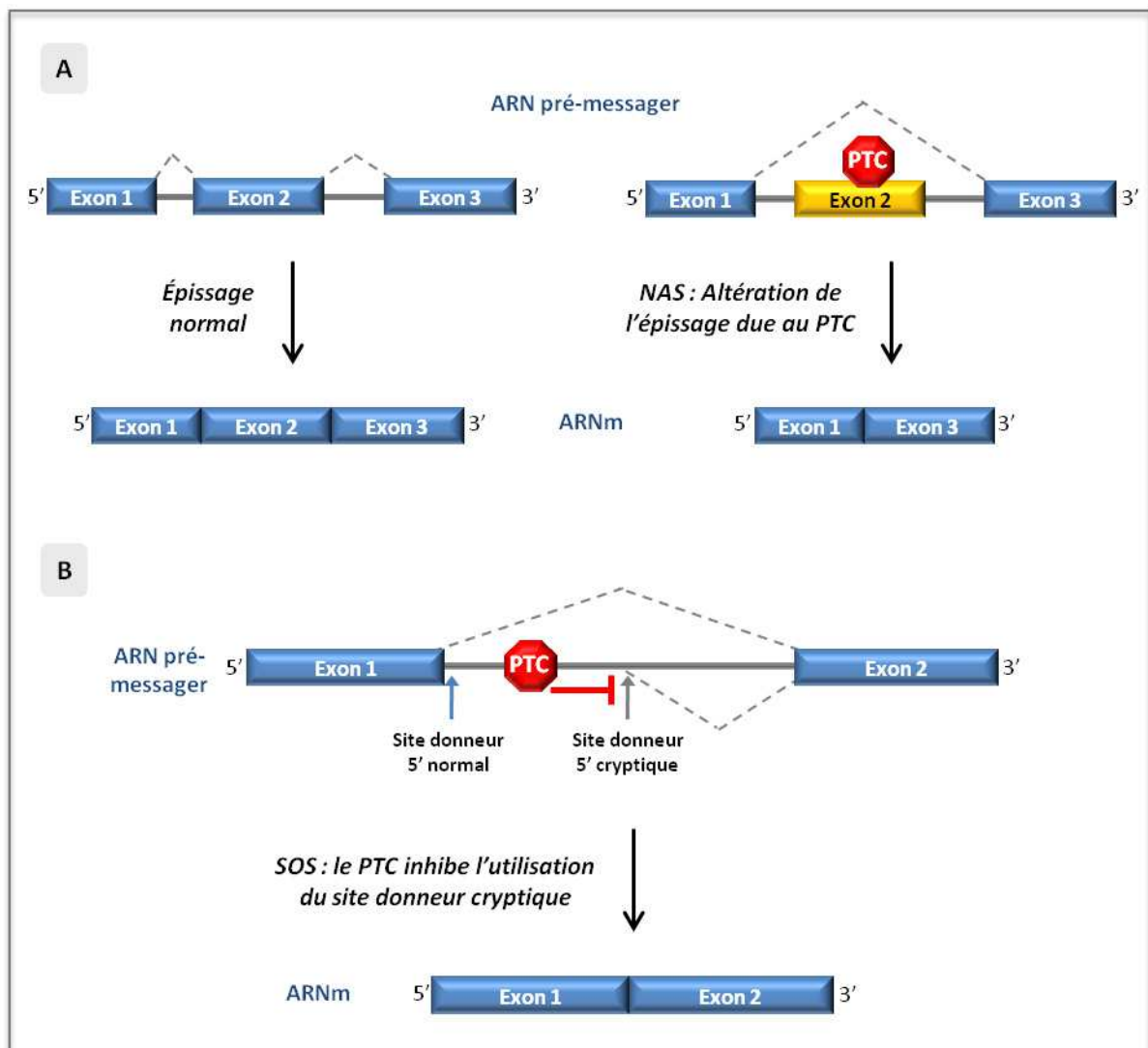
Il faut noter que non seulement les mutations non-sens, mais aussi des mutations faux-sens ou des mutations silencieuses peuvent induire ces altérations de l'épissage (Cartegni et al. 2002). Ces cas ne correspondent donc pas à un effet spécifique d'un codon non-sens et ne seraient pas du NAS à proprement parler, mais ils sont appelés par certains auteurs comme du NAS de type I (Chang et al. 2007).

Il existe un deuxième type de NAS (NAS de type II), dans lequel l'altération de l'épissage est due vraiment à l'apparition d'un codon non-sens sur le cadre de lecture, sans qu'il y ait altération de séquences ESE ou ESS. Plusieurs observations sur l'ARNm codant pour le TCR- $\beta$  supportent l'existence de ce type de NAS : (i) seules les mutations non-sens ou de décalage du cadre de lecture, et non des mutations silencieuses ou faux-sens, augmentent les niveaux des ARNm alternatifs du TCR- $\beta$  (Wang et al. 2002b) (ii) la sur-régulation des transcrits alternatifs est inhibée lorsque le codon d'initiation AUG ou la séquence consensus Kozak sont mutés (Wang et al. 2002a; Wang et al. 2002b) ; (iii) le NAS n'est plus induit lorsque qu'un décalage du cadre de lecture était à l'origine et que l'on restaure le cadre de lecture original (Wang et al. 2002b). De façon intéressante, seul le NAS de type II et non le NAS de type I, est inhibé lorsque hUPF1 est déplétée par ARNi (Chang et al. 2007).

Le NAS de type II et le NMD ont en commun la nécessité de faire intervenir la traduction et hUPF1 (Mendell et al. 2002; Chang et al. 2007). Cependant les observations que les fonctions de hUPF1 dans le NAS et dans le NMD sont indépendantes (Mendell et al. 2002) et que, à la différence du NMD, le NAS n'est pas affecté par la déplétion de hUPF2, hUPF3/3X, hSMG1 ou eIF4A3, indiquent que les deux mécanismes sont différents (Wang et al. 2002a; Chang et al. 2007).

Le SOS (*suppression of splicing*) est un autre phénomène observé sur certains ARN pré-messagers, dans lesquels la présence d'une mutation non-sens peut avoir une influence sur l'épissage, et plus particulièrement sur le choix du site d'épissage 5' (site donneur) (Li et al. 2002). En effet, la présence d'un codon stop sur un intron, entre le site donneur normal et un site donneur cryptique (situé à l'intérieur de l'intron), inhibe l'utilisation du site donneur cryptique (Figure 19B). Ce mécanisme permettrait à la cellule de choisir le bon site d'épissage et ainsi éviter la production d'une isoforme d'ARNm aberrante dans laquelle l'intron serait

partiellement retenu. On peut imaginer toutefois que ces sites cryptiques puissent être en effet utilisés, mais que les isoformes générées ne seraient pas détectées du fait qu'elles contiendraient des PTC et donc seraient dégradées par NMD. Si c'était le cas, l'inhibition du NMD devrait permettre de détecter ces transcrits aberrants qui retiendraient partiellement un intron. Cependant, le fait de bloquer le NMD par l'utilisation d'inhibiteurs de la traduction, par des ARNt suppresseurs ou par la déplétion de hUPF1 n'a pas permis de détecter ces isoformes aberrantes (Wachtel et al. 2004). A cet égard, le SOS semble être un mécanisme différent du NMD et du NAS de type II.



**Figure 19. Nonsense-associated altered splicing (NAS) et suppression of splicing (SOS).**

(A) NAS : la présence d'un PTC sur un ARN pré-messager peut induire une modification dans le choix des sites d'épissage afin d'exclure l'exon qui contient le PTC de l'ARNm mature. (B) SOS : la présence d'un PTC sur un intron, situé entre le site donneur normal et un site donneur cryptique, inhibe l'utilisation de ce dernier. Adaptation de (Lejeune and Maquat 2005).



L'observation que le SOS puisse avoir lieu indépendamment de la traduction et de la présence de hUPF1 ou de hUPF2 suggère que ce mécanisme ne serait pas impliqué dans la surveillance des ARNm mais plutôt des ARN pré-messagers (Isken and Maquat 2007). Cependant, le mécanisme par lequel un codon stop sur un intron est reconnu dans le noyau, avant l'épissage et de façon indépendante de la traduction, reste inconnu.

#### **4.4. Le *Staufen-mediated decay***

hUPF1 participe à une autre voie de dégradation des ARNm appelée *Staufen-mediated decay* (SMD). Cette voie est déclenchée lorsque la protéine *Staufen 1* (Stau1) se fixe sur des sites SBS (*Stau1-binding sites*) dans la partie 3'UTR d'un ARNm et interagit avec hUPF1 lors de la terminaison de la traduction (Kim et al. 2005; Kim et al. 2007b). Des analyses de microarray ont montré que la déplétion par ARNi de Stau1 stabilise environ 1.1% des ARNm dans les cellules HeLa (Kim et al. 2007b). Ces ARNm codent pour des protéines qui ne semblent pas avoir un lien fonctionnel entre elles.

Comme le NMD, le SMD nécessite hUPF1 et la traduction, mais à la différence du NMD, le SMD peut avoir lieu sur les ARNm associés à CBP80 et à eIF4E (Isken and Maquat 2008). De manière intéressante, les sites de fixation sur hUPF1 de Stau1 et de hUPF2 se recouvrent : Stau1 interagit avec les acides aminés 1-241 de hUPF1 (Gong et al. 2008) et hUPF2 interagit avec les acides aminés 123-213 de hUPF1 (Kadlec et al. 2006). La fixation de Stau1 et hUPF2 sur hUPF1 sont mutuellement exclusives ce qui suggère une compétition entre ces 2 voies de régulation. En effet, dans les coimmunoprécipitations où hUPF1 interagit avec hUPF2, Stau1 n'est pas détectée et vice-versa (Gong et al. 2008). La compétition entre le NMD et le SMD semble être importante dans certains processus physiologiques comme la régulation de la myogenèse étudiée dans les cellules C2C12 (Gong et al. 2008).

#### **4.5. Le métabolisme du virus de l'immunodéficience humaine HIV-1**

hUPF1 a été retrouvée comme composante des mRNP du virus HIV-1 où elle joue un rôle dans le métabolisme viral (Ajamian et al. 2008). La surexpression de hUPF1 augmente la synthèse de l'ARN et des protéines du virus. Inversement, la déplétion de hUPF1 déstabilise l'ARNm du HIV-1 et diminue la synthèse de protéines virales.

L'analyse de l'effet de la surexpression de différents mutants de hUPF1 sur la stabilité de l'ARNm HIV-1 a montré que la fonction de hUPF1 (i) est indépendante du NMD parce que les mutants R844C et RR857AA qui sont incompetents pour le NMD stabilisent l'ARNm HIV-1

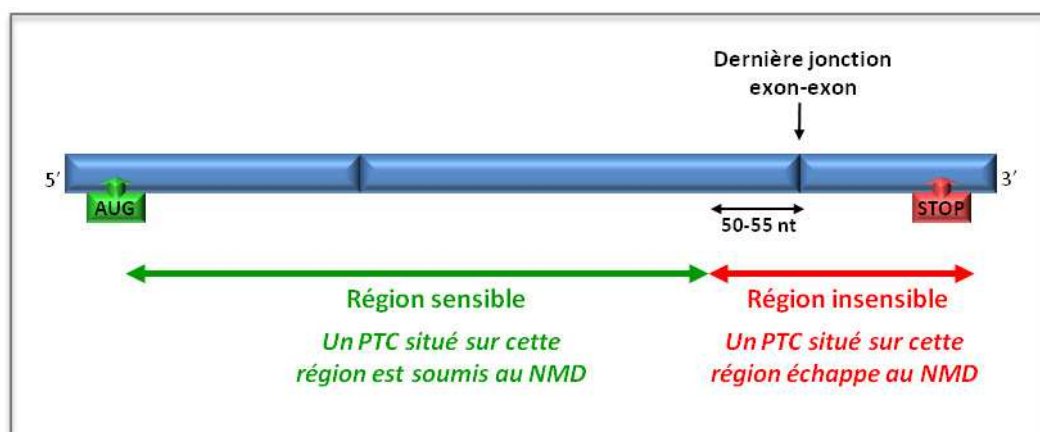
de la même manière que la protéine sauvage ; (ii) est dépendante de son activité ATPase puisque la stabilisation de l'ARN HIV-1 est diminuée avec le mutant DE637AA (Ajamian et al. 2008). Enfin, le recrutement de hUPF1 sur l'ARNm HIV-1 ne nécessite pas de hUPF2 et se ferait plutôt par l'intermédiaire de Stau1, qui fait elle aussi partie de la mRNP du HIV-1 (Chatel-Chaix et al. 2004; Ajamian et al. 2008) .

## 5. Les maladies associées aux PTC et approches thérapeutiques

On estime qu'un codon stop prématuré (PTC) est retrouvé dans environ un tiers des maladies génétiques. Ce PTC peut être dû à une mutation non-sens, à un décalage du cadre de lecture ou à la rétention d'une partie ou de la totalité d'un intron (Frischmeyer and Dietz 1999; Holbrook et al. 2004). Mais si le NMD est un mécanisme qui permet de dégrader efficacement les ARNm avec des PTC, comment l'apparition d'un PTC peut-elle être impliquée dans un nombre si important de maladies génétiques ?

### 5.1. Maladies provoquées par des PTC qui échappent au NMD

Un premier cas de figure est qu'il existe des PTC qui échappent à la surveillance parce qu'ils ne satisfont pas aux conditions pour être reconnus par la machinerie du NMD. Par exemple, lorsque le PTC est localisé soit dans le dernier exon, soit trop proche de la dernière jonction exon-exon (Figure 20).



**Figure 20. Représentation de la zone sensible ou insensible au NMD sur un ARNm.**

Dans la  $\beta$ -thalassémie, la plupart des mutations non-sens qui apparaissent sur le gène de la  $\beta$ -globine correspondent à des PTC qui sont soumis au NMD. Les porteurs hétérozygotes d'un allèle muté ne manifestent pas la maladie parce que l'allèle sain suffit à produire la quantité de  $\beta$ -globine dont l'organisme a besoin (Frischmeyer and Dietz 1999). Cependant, il existe des cas dans lesquels le PTC échappe à la surveillance parce qu'il apparaît sur le dernier exon. Dans ces cas, il y a synthèse d'une forme tronquée de la  $\beta$ -globine qui a un effet dominant négatif, puisque son association à l' $\alpha$ -globine produit une hémoglobine non fonctionnelle. (Hall and Thein 1994).

Des mutations non-sens dans le gène *SOX10* (un facteur de transcription qui participe au développement neuronal) peuvent entraîner des phénotypes plus ou moins graves selon si le PTC échappe ou non au NMD (Inoue et al. 2004). Lorsque le PTC est localisé sur le dernier exon et échappe au NMD, la protéine tronquée qui est synthétisée agit comme un dominant négatif et provoque une maladie très complexe appelée PCWH qui comprend plusieurs syndromes (neuropathie périphérique, leucodystrophie centrale dysmyélinisante, syndrome de Waardenburg et maladie de Hirschsprung). Lorsque le PTC est reconnu et l'ARNm est dégradé par le NMD, le phénotype est beaucoup moins sévère et les patients développent seulement le syndrome de Waardenburg et la maladie de Hirschsprung (Inoue et al. 2004). En effet, dans ce dernier cas, la maladie peut se manifester parce que le niveau de protéine synthétisée par un seul allèle *SOX10* sauvage n'est pas suffisant pour supporter complètement la fonction du gène dans la cellule (phénomène d'haploinsuffisance).

## 5.2. Maladies provoquées par des PTC qui déclenchent le NMD

Contrairement aux exemples cités précédemment, où le NMD peut jouer un rôle protecteur lorsqu'il empêche la synthèse de protéines tronquées avec des effets délétères, une autre catégorie de maladies associées aux PTC se développe parce que le NMD aggrave le phénotype, en empêchant la synthèse de protéines tronquées qui pourraient conserver partiellement ou totalement la fonctionnalité de la protéine sauvage. Certains cas de mucoviscidose et de dystrophie musculaire de Duchenne sont des exemples de ces cas de figure qui ont été bien décrits (Sheppard et al. 1994; Crawford et al. 2000). Je vais développer un peu plus ces deux maladies ainsi que le cas des mutations non-sens dans le gène *TP53* car nous disposons de ces trois modèles cellulaires de maladies génétiques au laboratoire et ce sont ceux que j'ai utilisés au cours de ma thèse. Néanmoins, ce ne sont que des exemples et il est possible d'imaginer le même scénario lorsqu'il s'agit d'une protéine dont la partie C-terminale n'est pas absolument nécessaire pour sa fonction.

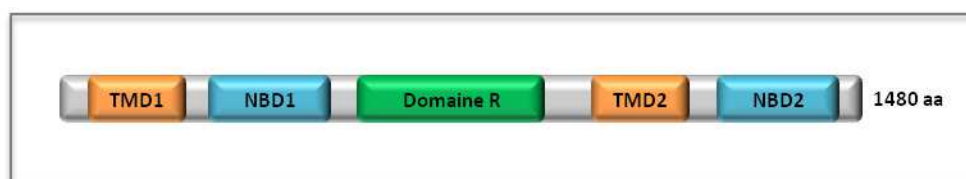
### 5.2.1. La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive provoquée par des mutations dans le gène *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) qui code pour une glycoprotéine présente à la membrane des cellules épithéliales et dont la fonction est la régulation du transport de chlore (Rowntree and Harris 2003). Le dysfonctionnement de la protéine CFTR induit une augmentation dans la viscosité du mucus qui s'accumule progressivement dans les voies respiratoires et digestives. L'obstruction des bronches

favorise le développement d'infections bactériennes et aboutit éventuellement à une insuffisance respiratoire qui est la cause de mortalité la plus fréquente chez ces patients.

La mucoviscidose affecte environ 1 naissance sur 2500 dans la population caucasienne, bien que la fréquence puisse varier entre les différentes régions. Grâce aux progrès dans la connaissance de la maladie et à l'amélioration de la prise en charge, l'espérance de vie de ces patients a augmenté considérablement dans les dernières décennies. En effet, elle est passée de moins d'1 an en 1960, à environ 40 ans en 2002. Cependant, à ce jour, il n'existe toujours pas de traitement curatif (Rowntree and Harris 2003).

Le gène *CFTR* est localisé sur le chromosome 7 et s'étend sur environ 190 kb d'ADN génomique (Ellsworth et al. 2000). Il est composé de 27 exons et code pour un ARNm mature de 6.5 kb (Riordan et al. 1989). La protéine CFTR est un canal de transport du chlore dépendant de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Elle se compose de 1480 acides aminés organisés en deux domaines transmembranaires, deux domaines NBD (*nucleotide-binding domains*) d'interaction avec les nucléotides et un domaine cytoplasmique de régulation R qui contient de nombreux sites potentiels de phosphorylation (Figure 21).



**Figure 21. Représentation schématique de la structure de la protéine CFTR.**

TMD, domaines transmembranaires ; NBD domaines d'interaction avec les nucléotides ; R, domaine de régulation ; aa, acides aminés.

A ce jour, 1889 mutations différents dans le gène *CFTR* ont été recensées (*Cystic Fibrosis Mutation Database* <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). La délétion de la phénylalanine 508 ( $\Delta F508$ ) qui aboutit à un défaut dans le repliement de la protéine et à sa rétention dans le réticulum endoplasmique, est la mutation la plus courante (environ 66% des cas) (Bobadilla et al. 2002). Les mutations non-sens sont associées à des phénotypes très sévères de la maladie à cause de l'absence de la protéine qui résulte de la dégradation de l'ARNm par NMD (Rowntree and Harris 2003). Elles représentent de 8 à 10% des mutations du gène *CFTR*, mais dans certaines ethnies comme par exemple, les juifs Ashkenazi, elles peuvent atteindre 57% des cas de mucoviscidose (Bobadilla et al. 2002).

### 5.2.2. Les dystrophinopathies

Les dystrophinopathies sont des maladies récessives liées à l'X causées par des mutations responsables d'un déficit quantitatif ou qualitatif de la protéine dystrophine, une protéine exprimée à la membrane des cellules musculaires et minoritairement dans le cerveau (Muntoni et al. 2003). La forme la plus sévère est la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) qui affecte environ 1 naissance de garçon sur 3500 (Tuffery-Giraud et al. 2009). Chez les patients atteints de DMD, l'absence de dystrophine induit progressivement l'atrophie, la dégénérescence et la nécrose des muscles squelettiques. La faiblesse musculaire rend la marche impossible vers l'âge de 10 ans. Des déficiences intellectuelles sont aussi observées, vraisemblablement dues à l'absence de la dystrophine dans le cerveau (Anderson et al. 2002). L'insuffisance cardiaque et/ou respiratoire due à l'atteinte du muscle cardiaque et/ou du diaphragme, constituent la cause de décès la plus fréquente, qui survient en moyenne à 25 ans (Eagle et al. 2002). Dans la dystrophie musculaire de Becker (BMD), la dystrophine est toujours synthétisée mais dans une quantité insuffisante ou une taille anormale (Tuffery-Giraud et al. 2009). Les phénotypes associés sont très hétérogènes mais en général, ils sont moins sévères que pour la DMD : la progression de la maladie est plus lente et le muscle cardiaque est peu ou pas affecté.

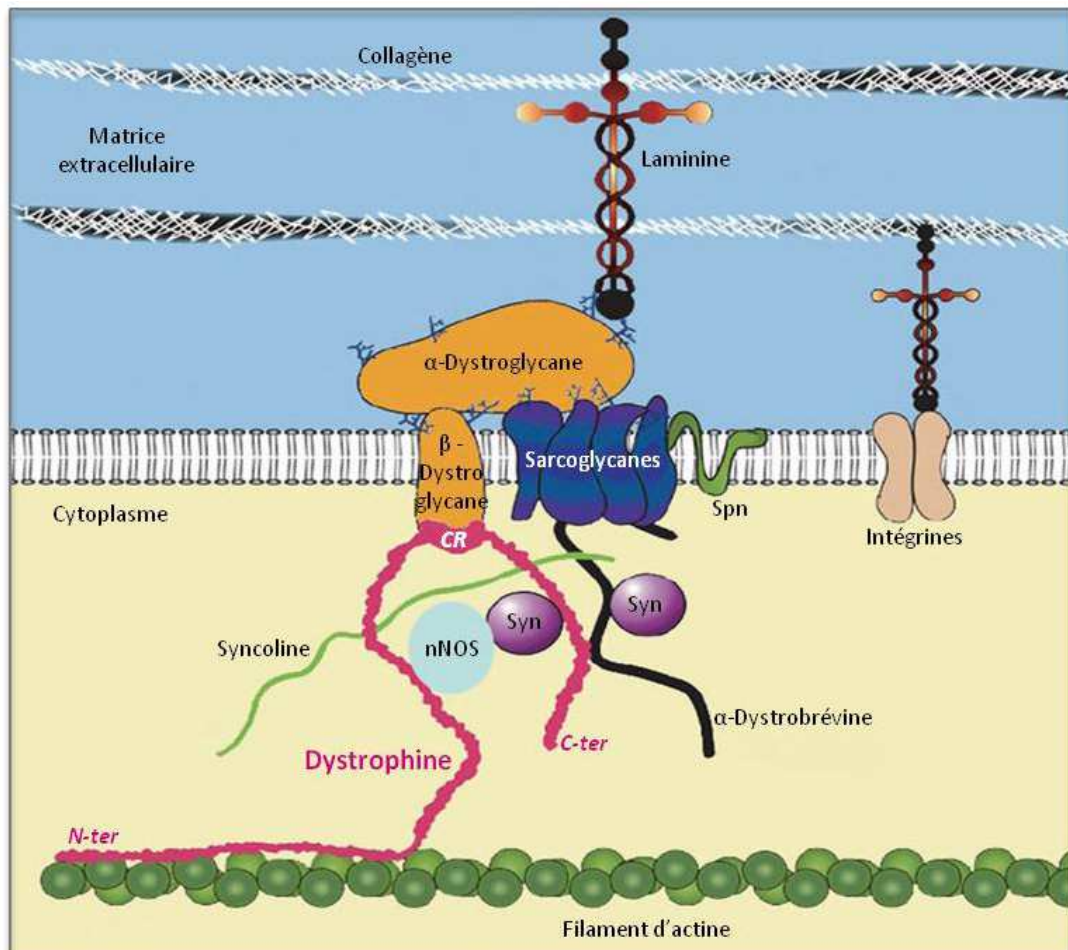
Le gène *DMD* est le plus grand du génome humain. Il s'étend sur environ 2400 kb, ce qui correspond à 1,5% du chromosome X où il se situe. Le transcrit qui code pour la dystrophine entière a une taille de 14 kb et est composé de 79 exons (Muntoni et al. 2003). Du fait de la présence de sept promoteurs dans ce gène, il peut y avoir trois isoformes longues et quatre isoformes courtes de la protéine. Les isoformes longues Dp427m, Dp427b et Dp427p sont composées des 79 exons et ne diffèrent que par leur premier exon. Ces trois promoteurs ont une activité tissu-spécifique conduisant à une expression de cette forme longue de la dystrophine dans le muscle, le cerveau et les cellules de Purkinje respectivement. Le gène contient aussi quatre promoteurs internes qui donnent lieu à quatre isoformes tronquées en N-terminale Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71.

La protéine dystrophine entière se compose de 3684 acides aminés et a un poids moléculaire de 427 kDa (Koenig et al. 1988). Elle est organisée en quatre domaines (Figure 22) : (i) un domaine N-terminal qui se lie à l'actine, (ii) un domaine central « rod » composé de 24 répétitions du motif « spectrin like », (iii) un domaine riche en cystéines qui contient des sites d'interaction avec le  $\beta$ -dystroglycane, et (iv) un domaine C-ter avec un domaine d'interaction avec la dystrobrevine et la syntrophine (Pichavant et al. 2011).



**Figure 22. Représentation schématique de la structure de la protéine dystrophine.** ABD, domaine de liaison à l'actine ; Cys-rich, domaine riche en cystéines d'interaction avec le  $\beta$ -dystroglycane ; DSBD, domaine d'interaction avec la dystrobrevine et la syntrophine.

L'association de la dystrophine avec ces protéines constitue le complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC) qui sert de pont entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire (Figure 23). Le rôle de ce complexe est de stabiliser le sarcolemme et de protéger les fibres musculaires des dommages causés par la contraction à long terme (Lapidos et al. 2004).



**Figure 23. Composition du complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC).** C-ter, domaine C-terminal de la dystrophine ; CR, domaine riche en cystéines de la dystrophine ; N-ter, domaine N-terminal de la dystrophine ; nNOS, oxyde nitrique synthétase neuronale ; Syn, syntrophine ; Spn, sarcospane. Image de (Pichavant et al. 2011).

Environ 9% des patients atteints de DMD présentent un PTC dans le gène de la dystrophine (Tuffery-Giraud et al. 2009). En général, l'apparition d'un PTC est associée à des phénotypes très sévères de DMD du fait de l'absence de la dystrophine par l'action du NMD sur l'ARNm. De façon intéressante, on a rapporté l'existence de certains cas dans lesquels, malgré l'apparition d'un PTC sur des exons de la partie centrale du gène, il y a toujours synthèse d'une dystrophine légèrement différente de la forme sauvage, qui conduit à des phénotypes moins sévères de type BMD (Ginjaar et al. 2000; Disset et al. 2006). En fait, on retrouve chez ces patients une dystrophine avec une délétion dans le domaine rod. Puisque ce domaine est composé de multiples répétitions du motif « spectrin like », il apparaît que leur nombre peut être diminué tout en conservant une fonctionnalité partielle de la protéine (Aartsma-Rus et al. 2009).

Disset et collaborateurs ont montré que la synthèse d'une telle dystrophine mutée mais partiellement fonctionnelle est possible lorsque la mutation non-sens provoque une altération dans l'épissage qui conduit à l'exclusion de l'exon contenant le PTC de l'ARNm mature (Disset et al. 2006). Par exemple, la mutation c.4250T→A provoque l'apparition d'un codon stop sur l'exon 31 du gène de la dystrophine et en même temps génère l'apparition d'une séquence ESS. Les auteurs ont démontré que cette séquence sert de site de fixation à la protéine hnRNP A1 qui est un répresseur de l'épissage, et par conséquent inhibe l'inclusion de l'exon 31. Puisque l'exclusion de cet exon ne décale pas la phase de lecture de l'ARNm, celui-ci peut être traduit en sa totalité et une protéine dystrophine avec une délétion interne est synthétisée. Notons que la possibilité d'éliminer certains exons internes sans altérer significativement la fonctionnalité de la dystrophine, a conduit au développement d'une des approches thérapeutiques proposées pour le traitement de certains cas de DMD, comme nous verrons un peu plus loin (paragraphe 5.3.1.2).

D'autre part, les travaux du groupe du Dr. Jeffrey Chamberlain sur des souris transgéniques ont permis de montrer que le domaine C-ter codé par les 9 derniers exons du gène de la dystrophine (sur le total de 79) peut être aussi dispensable à la fonction de la protéine, dans le muscle en tout cas (Rafael et al. 1994; Crawford et al. 2000). Comme évoqué plus haut, cette région contient des sites d'interaction de la dystrophine avec la syntrophine et la dystrobrevine. Toutefois, ces protéines peuvent être localisées à la membrane en l'absence du domaine C-ter de la dystrophine, probablement via des interactions directes de la dystrobrevine avec les sarcoglycanes (Crawford et al. 2000).

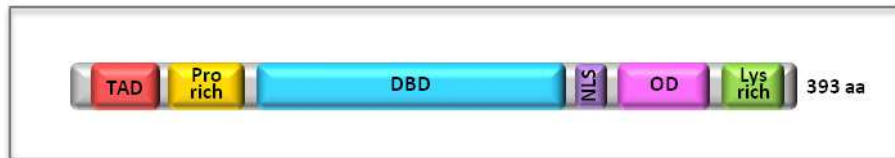


### 5.2.3. Perte de l'expression de protéines suppresseurs de tumeurs

Une analyse des mutations sur 37 oncogènes et 39 gènes suppresseurs de tumeurs a montré que tandis que la plupart des mutations des oncogènes sont des mutations faux-sens, les gènes suppresseurs de tumeurs montrent un nombre plus élevé de mutations non-sens (Mort et al. 2008). La perte de l'expression d'un gène suppresseur de tumeurs à cause de la dégradation de l'ARNm par NMD peut avoir un effet défavorable dans le développement du cancer. Environ 80% des mutations dans le gène de l'E-cadhérine-1 (*CDH1*), fréquemment muté dans certains cancers gastriques, sont des mutations qui provoquent l'apparition d'un PTC (Karam et al. 2008). Il a été observé que les PTC qui induisent le NMD sur l'ARNm *CDH1* induisent un développement du cancer de manière plus précoce que ceux qui échappent au NMD (Karam et al. 2008). Ceci suggère que la présence éventuelle d'une protéine E-cadhérine-1 tronquée serait plus bénéfique que son absence totale, et donc le NMD sur cet ARNm a un effet préjudiciable puisqu'il empêche la synthèse de la protéine. En accord avec cette hypothèse, il a été montré qu'une forme d'E-cadhérine-1 tronquée dans sa partie C-ter (exprimée à partir d'un ADNc) peut être fonctionnelle et garder son rôle de suppresseur de la prolifération cellulaire (Sasaki et al. 2000).

Le gène *TP53* est muté dans plus de 50% des cancers humains, ce qui fait de lui le gène le plus fréquemment muté dans cette pathologie (Joerger and Fersht 2007). Il code pour la protéine p53, un facteur de transcription qui est activé en réponse à différents stress cellulaires, comme les dommages à l'ADN ou l'hypoxie, pour inhiber la prolifération cellulaire et induire l'apoptose (Joerger and Fersht 2007).

Le gène *TP53* est localisé sur le chromosome 17 et compte 11 exons. La protéine p53 se compose de 393 acides aminés et a un poids moléculaire de 53 kDa. La région N-ter contient le domaine de transactivation nécessaire pour l'activation spécifique des gènes cibles et un domaine riche en prolines qui est important dans son rôle pro-apoptotique. La région centrale contient un grand domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA binding domain*) à travers lequel p53 se lie à ses cibles. Enfin, la région C-ter contient un domaine de localisation nucléaire NLS, un domaine d'homo-oligomérisation nécessaire pour la tétramérisation de p53 (forme active de la protéine) et un domaine riche en lysines qui régule son activité (Figure 24).



**Figure 24. Représentation schématique de la structure de la protéine p53.**

TAD, domaine de transactivation ; Pro rich, domaine riche en prolines ; DBD, domaine de liaison à l'ADN ; NLS, signal de localisation nucléaire ; OD, domaine d'homo-oligomérisation ; Lys rich, domaine riche en lysines ; aa, acides aminés.

Environ 8% des mutations dans le gène *TP53* sont des mutations non-sens (Petitjean et al. 2007). La conséquence de ces mutations lorsqu'elles sont à l'état homozygote est l'absence de protéine p53 détectable. L'effet qu'auraient les protéines tronquées en C-terminal produites à partir des ARNm non-sens de p53 n'est pas bien connu, puisqu'elles sont absentes dans les cellules tumorales étudiées du fait du NMD (Lehman et al. 1991; Kawasaki et al. 1994; Liu and Bodmer 2006). Yeudall et collaborateurs ont mené une étude dans laquelle ils ont transfecté des cellules Saos-2 (qui n'ont pas d'expression de p53 endogène) avec des séquences d'ADNc (donc non soumis au NMD) codant pour des formes de p53 tronquées en C-ter retrouvées chez des patients atteints du cancer des cellules squameuses de la peau (Yeudall et al. 1997). L'analyse de la capacité de ces formes à transactiver un gène rapporteur a montré qu'aucune ne peut accomplir son rôle de facteur de la transcription, probablement dû à l'absence du domaine d'oligomérisation situé en C-ter, puisque la forme active de p53 est un tétramère (Yeudall et al. 1997). De façon intéressante, ces formes ont des effets différents dans l'induction de la tumorigénèse. En effet, lorsque le même groupe a exprimé ces protéines tronquées dans des fibroblastes NIH/3T3 qu'ils ont ensuite injectés dans des souris, ils ont observé que la forme de p53 la plus sévèrement tronquée (dérivée d'un ARNm avec un PTC sur l'exon 1) induisait rapidement la tumorigénèse, alors qu'une forme moins sévèrement tronquée (insertion entre les exons 6 et 7 provoquant l'apparition d'un PTC sur l'exon 7) générait des tumeurs beaucoup plus petites et avec une moindre fréquence. Enfin, la protéine tronquée plus longue (qui contient les 7 premiers exons et retient partiellement l'intron 7 qui contient un PTC) n'induisait pas la tumorigénèse chez la souris (Cardinali et al. 1997).

### 5.3. Approches pour la correction des PTC

Différents approches thérapeutiques ont été proposées dans le but de corriger les effets de l'apparition d'un PTC. Ces approches discutées ci-dessous, peuvent se regrouper en trois catégories : (i) l'utilisation d'oligoribonucléotides anti-sens qui permettent de modifier

l'épissage afin d'éviter l'apparition d'un PTC ou d'exclure un exon qui en contient un, (ii) l'utilisation de composés qui induisent la translecture afin de permettre la synthèse d'une protéine entière et (iii) l'inhibition du NMD afin de permettre la synthèse de protéines tronquées qui peuvent être fonctionnelles.

### 5.3.1. Utilisation d'oligoribonucléotides anti-sens

Cette stratégie consiste à utiliser des oligoribonucléotides anti-sens de type 2'-O-méthylphosphorothioate (2OMePS) ou des oligomères phosphorodiamidate morpholino (PMO) qui se lient aux sites d'épissage sur l'ARN pré-messager afin de rediriger l'épissage.

#### 5.3.1.1. Correction d'épissages aberrants

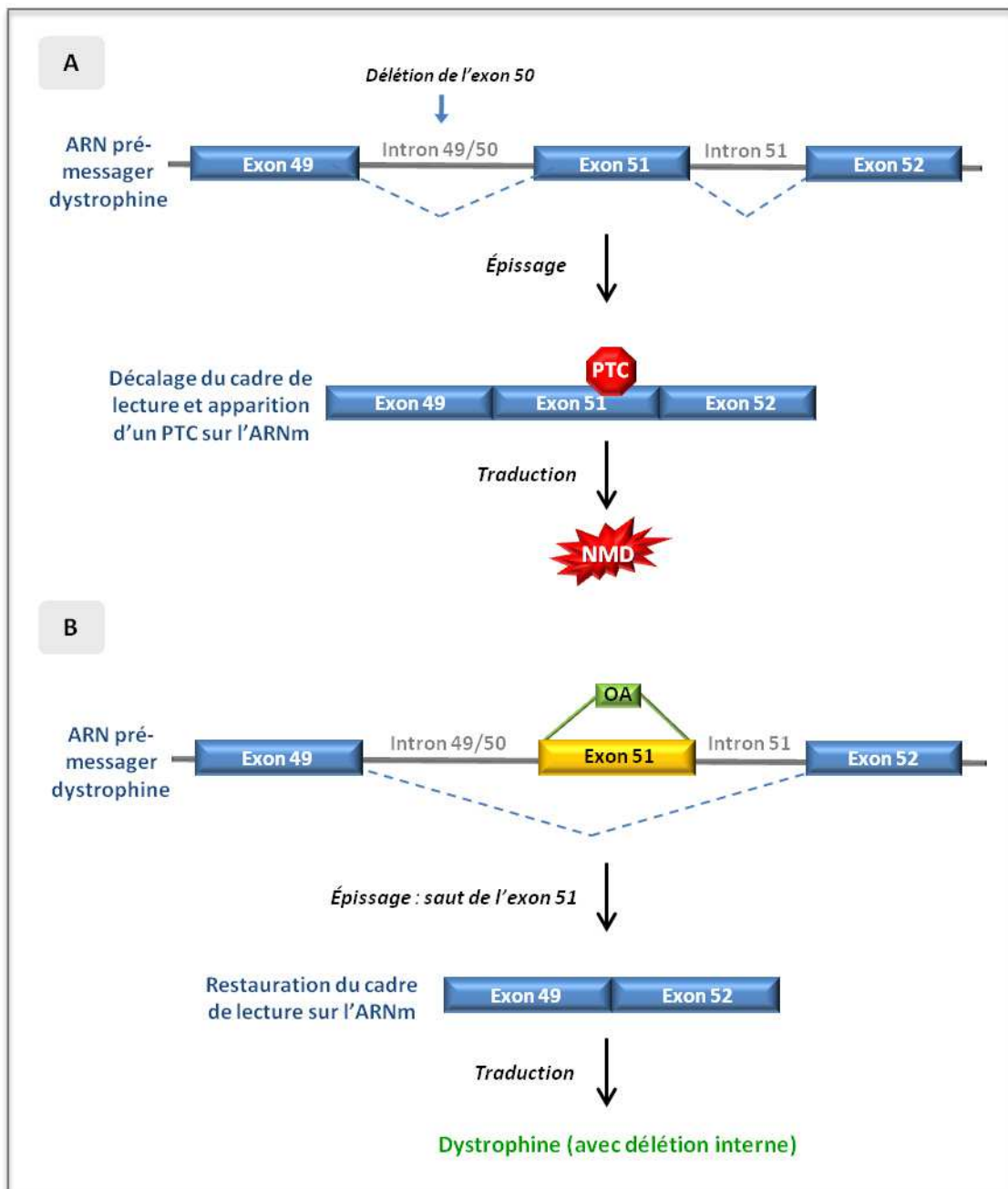
Des oligoribonucléotides anti-sens de type 2OMePS ont été utilisés pour la première fois pour corriger des épissages aberrants dans l'ARN pré-messager de la  $\beta$ -globine (Dominski and Kole 1993). Postérieurement, cette stratégie a été utilisée pour corriger une mutation d'épissage dans le gène *CFTR* retrouvée chez certains patients de mucoviscidose (Friedman et al. 1999). La mutation 3849 +10 kb C→T crée un nouveau site donneur d'épissage 10 kilobases à l'intérieur de l'intron 19 du gène *CFTR* ce qui active l'utilisation d'un site accepteur 3' cryptique. Comme conséquence, on trouve chez les porteurs de cette mutation un transcrit dans lequel un nouvel « exon » composé d'une séquence de 84 pb de l'intron 19 est introduit entre les exons 19 et 20 (Highsmith et al. 1994). De plus, ce nouvel exon contient un PTC dans le cadre de lecture et par conséquent ces ARNm sont des substrats pour le NMD. Toutefois, puisque les sites sauvages d'épissage sont intacts, on peut trouver aussi des ARNm normalement épissés (environ 8% du niveau d'ARNm *CFTR* chez un individu sain), ce qui expliquerait le phénotype moins sévère qui est observé chez les patients porteurs de cette mutation (Highsmith et al. 1994). Afin de bloquer l'épissage aberrant provoqué par la mutation 3849 +10kb C→T et de favoriser l'épissage normal, Friedman et collaborateurs ont développé des oligoribonucléotides anti-sens 2OMePS dirigés contre le site donneur muté et aussi contre le site accepteur cryptique, puis ils les ont utilisés pour traiter des cellules exprimant un minigène *CFTR* qui récapitule l'épissage aberrant provoqué par la mutation 3849 +10kb C→T (Friedman et al. 1999). Le traitement avec ces oligoribonucléotides anti-sens a montré être capable de bloquer l'épissage aberrant en permettant la synthèse majoritaire de l'ARNm *CFTR* correctement épissé et de la protéine *CFTR* fonctionnelle (Friedman et al. 1999).

### 5.3.1.2. *Exon skipping*

Les oligoribonucléotides anti-sens peuvent être aussi utilisés pour induire l'élimination d'exons (*exon skipping*) parce qu'ils contiennent des PTC et/ou pour restaurer le cadre de lecture. Cette approche est utile lorsque l'exon éliminé ne code pas pour une partie essentielle à la fonction de la protéine, comme dans le cas des exons codant pour le domaine rod centrale de la dystrophine (voir paragraphe 5.2.2) (Aartsma-Rus et al. 2009). Ainsi, cette stratégie a montré des résultats prometteurs sur des modèles cellulaires de dystrophie et dans la souris mdx (modèle pour la myopathie de Duchenne dans laquelle une mutation non-sens est présente dans l'exon 23 du gène de la dystrophine) traitées avec des oligoribonucléotides anti-sens 2OMePS ou PMO (Wilton et al. 1999; Mann et al. 2001; Lu et al. 2003).

Cette stratégie est utile aussi pour corriger des décalages de la phase de lecture qui produisent l'apparition de PTC. Par exemple chez certains patients de DMD, l'absence de l'exon 50 produit un décalage de la phase de lecture sur l'ARNm qui entraîne l'apparition d'un PTC dans l'exon 51 et par conséquent la dégradation de l'ARNm par NMD. Un oligoribonucléotide anti-sens 2OMePS dirigé contre l'exon 51 a été développé par la compagnie « Prosensa Therapeutics » pour induire le saut de cet exon et restaurer ainsi le cadre de lecture (Figure 25) (van Deutekom et al. 2007). Les premiers essais cliniques chez l'homme avec cet oligoribonucléotide anti-sens semblent encourageants dans le sens où le traitement est bien toléré par les patients et la dystrophine sans la partie codée par les exons 50 et 51 a pu être observée (van Deutekom et al. 2007). Cependant, il reste à vérifier si cette délétion interstitielle n'affecte pas la fonctionnalité de la protéine et s'il y a un bénéfice clinique pour les patients (Aartsma-Rus 2010).

Le principal inconvénient de cette stratégie est que du fait de la courte durée de vie des oligoribonucléotides, ils doivent être injectés de façon répétée, et les effets des 2OMePS et PMO à long terme ne sont pas connus à présent (Aartsma-Rus 2010).



**Figure 25. Exemple d'exon skipping chez des patients de DMD.**

(A) L'absence de l'exon 50 produit un décalage de la phase de lecture sur l'ARNm qui provoque l'apparition d'un PTC dans l'exon 51 et la dégradation de l'ARNm par NMD. (B) L'utilisation d'un oligoribonucléotide anti-sens (OA) dirigé contre l'exon 51 induit le saut de cet exon pendant l'épissage, en restaurant la phase de lecture et en permettant la synthèse d'une dystrophine avec une délétion interne. Adaptation de (van Deutekom et al. 2007).

### 5.3.2. La translecture ou suppression de la terminaison de la traduction

Chez les eucaryotes, la terminaison de la traduction a lieu lorsque l'un des trois codons stop UAA, UAG ou UGA occupe le site A du ribosome. Ces codons stop ne sont reconnus par aucun aminoacyl-ARNt mais par le facteur de terminaison de la traduction eRF1 qui, en association avec eRF3, va induire le relargage du peptide par le ribosome (Rospert et al. 2005). La terminaison de la traduction est un processus très efficace. En effet, dans des conditions normales, la suppression de la terminaison de la traduction n'a lieu que dans 0.001% à 0.1% des cas (Rospert et al. 2005). Ce phénomène de suppression de la terminaison de la traduction, appelé aussi translecture, peut avoir lieu lorsqu'un aminoacyl-ARNt proche-cognat (dont l'anticodon est complémentaire à deux des trois bases du codon stop) entre en compétition avec eRF1 et occupe le site A du ribosome en conduisant à l'incorporation d'un acide aminé à la place du codon stop (Fearon et al. 1994). Différents événements qui altèrent l'efficacité de la terminaison de la traduction peuvent augmenter le taux de translecture, tels que des mutations dans les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3, dans les aminoacyl-ARNt et/ou dans les ARN ribosomiaux (ARNr) (Keeling et al. 2005).

De façon intéressante, les trois codons stop ne promeuvent pas la terminaison de la traduction avec la même efficacité et par conséquent ils n'ont pas le même potentiel de translecture. En effet, le codon UAA induit une terminaison de la traduction très efficace et a donc un potentiel de translecture faible. Le codon UGA est moins efficace et par conséquent peut être transluc plus facilement. Enfin, le codon UAG présente une capacité à être transluc qui est généralement meilleure que le codon UAA et moins bonne que le codon UGA. Par ailleurs, le contexte nucléotidique en amont et en aval du codon stop n'est pas aléatoire mais au contraire, influence aussi l'efficacité de la terminaison de la traduction. Chez la levure notamment, plusieurs travaux utilisant des constructions rapporteurs de translecture portant différents contextes nucléotidiques, ont permis de montrer que l'identité des deux nucléotides en amont et des six nucléotides en aval du codon stop a un rôle déterminant. En effet, la présence de la séquence AA en amont, et de la séquence consensus CA(A/G)N(U/C/G) en aval du codon stop est associée à des taux de translecture élevés sur les ARNm rapporteurs (Bonetti et al. 1995; McCaughan et al. 1995; Namy et al. 2001; Tork et al. 2004).

Une analyse bioinformatique a permis d'identifier dans le génome de la levure des gènes dont les séquences entourant le codon stop concordent avec cette séquence consensus, ce qui suggère une régulation potentielle de leur expression par translecture. Par exemple, le gène *PDE2* présente la séquence CAA UAG CAA, qui est transluc avec une fréquence de 2.2 % (Namy et al. 2002). Ce gène code pour la phosphodiesterase Pde2 qui catalyse l'hydrolyse de

l'AMP cyclique en AMP pendant la réponse au stress cellulaire. La translecture du codon stop de l'ARNm Pde2 conduit à la synthèse d'une protéine allongée de 20 acides aminés dans sa partie C-terminale qui est très instable puisqu'elle est dégradée par le protéasome. La diminution dans les quantités de protéine Pde2 fonctionnelle a comme conséquence l'augmentation des niveaux d'AMPc intracellulaire et la modification de certaines voies de signalisation. Ainsi, la régulation de la fréquence de translecture de l'ARNm Pde2 pourrait être un moyen de moduler la réponse métabolique de la cellule au stress (Namy et al. 2002).

En outre, la séquence CAA UAG CAA UUA est trouvée chez le virus de la mosaïque du tabac (TMV). La terminaison de la traduction dans les cellules végétales hôtes est très inefficace sur cette séquence, de sorte que le codon stop UAG est translu avec une fréquence d'environ 5% en permettant l'expression de l'ARN hélicase du virus nécessaire à sa réplication (Skuzeski et al. 1991). D'autres virus ont développé des mécanismes différents pour exploiter la machinerie traductionnelle de la cellule hôte et stimuler la translecture sur des ARNm viraux portant des codons stop. Par exemple, chez le rétrovirus de la leucémie murine de Moloney (Mo-MuLV) les ORF des gènes *gag* et *pol* sont séparés par un codon stop UAG (Yoshinaka et al. 1985). La traduction par la machinerie de l'hôte résulte en général dans la synthèse de Gag, une polyprotéine précurseur des protéines structurales du virus. Cependant, lorsque le codon stop entre les deux ORF est translu, ceci résulte dans la synthèse d'une grande polyprotéine de fusion Gag-Pol, dont dériveront les protéines structurales du virus, une protéase et la rétro-transcriptase du virus (Yoshinaka et al. 1985). De manière intéressante, cette reverse transcriptase est capable de se lier à l'eRF1 en empêchant sa fixation au site A du ribosome et en stimulant de cette façon la translecture du codon UAG entre les ORF *gag* et *pol* (Orlova et al. 2003). De cette façon le codon stop est translu avec une fréquence d'environ 5%.

Une approche pour la correction des PTC est de stimuler le processus de translecture qui est naturellement très inefficace afin d'introduire un acide aminé à la place du PTC et de permettre la synthèse de la protéine entière en quantité suffisante pour restaurer le phénotype (Kuzmiak and Maquat 2006). Un inconvénient potentiel de stimuler la translecture sur les PTC serait d'agir aussi sur les codons stops physiologiques et de conduire à la synthèse de protéines anormalement allongées en C-terminal qui pourraient avoir des effets délétères. Toutefois, cette éventualité est estimée peu probable étant donné qu'à la différence d'un PTC, les codons stop physiologiques (i) se trouvent dans un contexte nucléotidique qui favorise la terminaison de la traduction, (ii) se trouvent à proximité de la PABP qui stimule la terminaison efficace de la traduction, et (iii) sont suivis d'un ou plusieurs autres codons stop dans la même phase de lecture (Linde and Kerem 2008).

### 5.3.2.1. Les ARNt supprimeurs

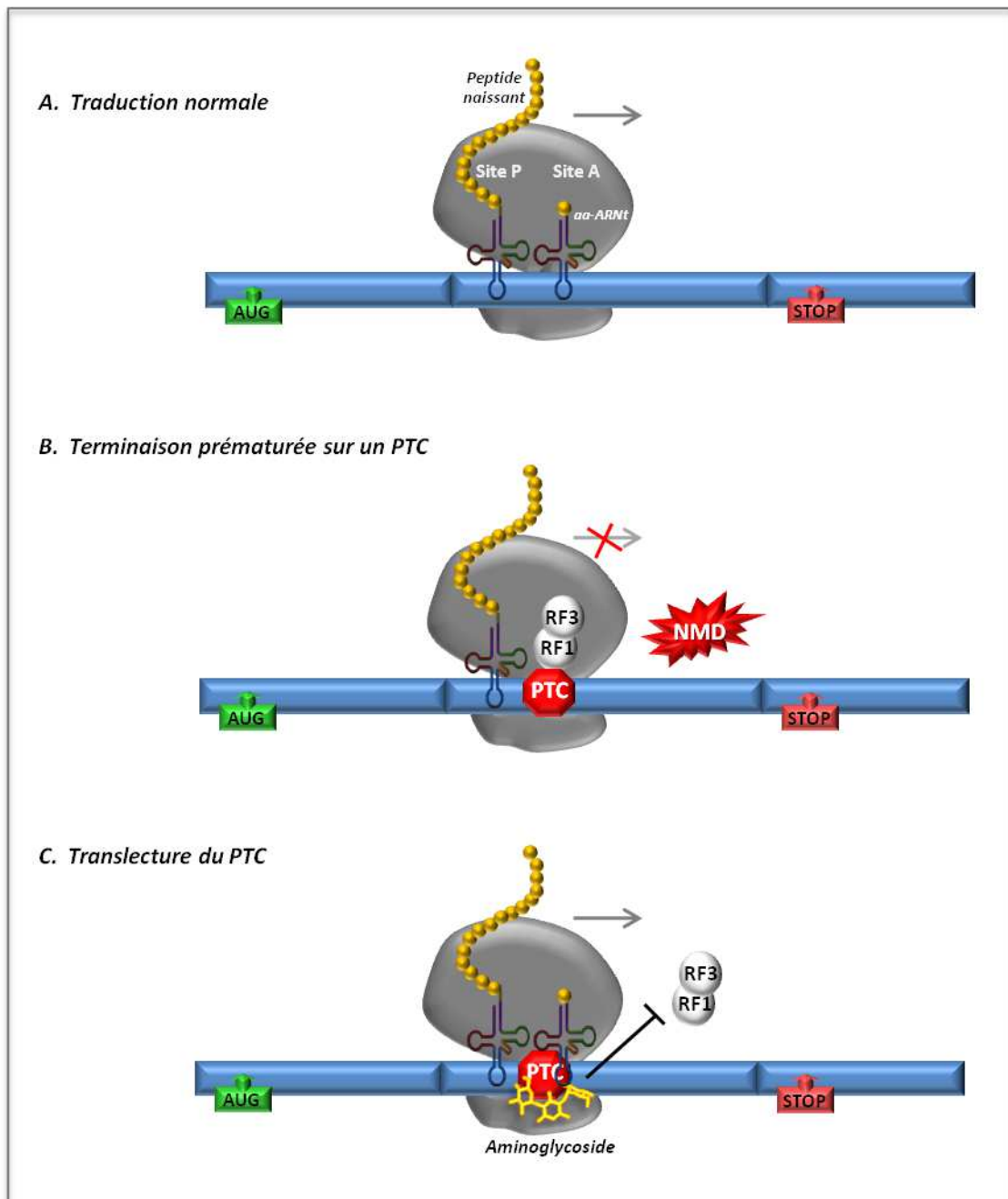
Un moyen pour induire la translecture est l'utilisation d'ARNt supprimeurs, c'est-à-dire des aminoacyl-ARNt dont l'anticodon a été modifié pour reconnaître les trois bases d'un des codons stop et entrer en compétition de façon plus efficace avec eRF1 (Keeling et al. 2005). Cette approche a montré son efficacité *in vitro* pour la correction des PTC dans l'ARNm  $\beta$ -globine (Temple et al. 1982) et dystrophine (Kiselev et al. 2002), et *in vivo* sur un modèle de souris transgénique exprimant un ARNm rapporteur chloramphénicol acétyltransférase porteur d'un PTC (Buvoli et al. 2000). La principale difficulté pour l'utilisation de cette approche en thérapeutique est le manque d'un mode d'administration efficace pour l'introduction et le maintien des niveaux d'expression suffisants des ARNt supprimeurs dans les tissus cibles (Keeling et al. 2005).

### 5.3.2.2. Les aminoglycosides

Le moyen qui a été le plus utilisé pour induire la translecture est l'utilisation d'antibiotiques de type aminoglycoside tels que la gentamicine, la tobramicine, l'amikacine ou le G418. Ces molécules ont la particularité de se lier au site de décodage de l'ARNr 16S ou 18S des ribosomes procaryotes ou eucaryotes respectivement. Chez les procaryotes, la fixation est très efficace et conduit à l'inhibition de la synthèse protéique, d'où leur effet antibiotique. Chez les eucaryotes, la fixation est moins efficace et conduit à un changement de conformation qui diminue la capacité du ribosome à reconnaître le codon stop ce qui permet l'incorporation d'un acide aminé à partir d'un aminoacyl-ARNt proche cognat (Rospert et al. 2005) (Figure 26).

Les aminoglycosides sont capables d'induire la translecture des PTC impliqués dans des modèles cellulaires de maladies comme la mucoviscidose, la DMD, le syndrome de Hurler pour ne citer que ces trois là mais la liste est bien plus longue (Keeling et al. 2005; Linde and Kerem 2008). Ils ont été utilisés également dans des modèles cellulaires qui possèdent un PTC dans le gène *TP53* (Keeling and Bedwell 2002; Floquet et al. 2010). Dans certains cas, en plus de provoquer la translecture, l'utilisation d'aminoglycosides permet aussi de stabiliser les ARNm non-sens (Bedwell et al. 1997; Correa-Cerro et al. 2005; Salvatori et al. 2009; Floquet et al. 2010).





**Figure 26. Translecture des PTC par des aminoglycosides.**

(A) Traduction normale : la reconnaissance entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ainoacyl-ARNt (aa-ARNt) a lieu dans le site A du ribosome, et la liaison peptidique a lieu dans le site P. (B) Terminaison prématurée de la traduction sur un PTC : lorsque le ribosome rencontre un PTC les facteurs de terminaison de la traduction (RF1 et RF3) sont recrutés et s'il y a présence d'un EJC en aval du PTC, le NMD est déclenché (C) Translecture d'un PTC : les aminoglycosides se fixent au site A, altèrent la capacité du ribosome à reconnaître le codon stop et empêchent la fixation des facteurs RF. Un acide aminé peut alors être incorporé à partir d'un aa-ARNt proche cognat et la synthèse protéique peut continuer jusqu'à l'obtention d'une protéine entière. Adaptation de (Linde and Kerem 2008).

Des essais cliniques avec des aminoglycosides ont été conduits notamment sur des patients atteints de mucoviscidose ou de DMD avec des résultats très variables. Dans trois essais cliniques sur des patients atteints de mucoviscidose, une réponse au traitement avec gentamicine a pu être observée chez la plupart des individus : dans 7 patients sur 9 (Wilschanski et al. 2000), 4 sur 5 patients (Clancy et al. 2001) et 17 sur 19 (Wilschanski et al. 2003), le traitement a permis de restaurer partiellement l'activité du canal CFTR. Cependant, dans un autre essai clinique, aucun patient sur 11 n'a répondu au traitement avec gentamicine ou tobramicine (Clancy et al. 2007). Dans une étude sur 4 patients atteints de DMD, aucun n'a montré une réponse histologique ou fonctionnelle suite au traitement avec gentamicine (Wagner et al. 2001). Là encore, les résultats sont très variables puisque dans une autre étude menée sur des patients DMD, la présence de dystrophine a été détectée dans des biopsies musculaires de 3 patients sur 4 (Politano et al. 2003).

Il faut noter que l'ampleur de la réponse aux traitements par aminoglycosides est très variable même au sein d'une même étude, c'est-à-dire que parmi des groupes de patients traités de la même manière, certains répondent bien, d'autres moins et d'autres pas du tout. Il a été proposé que cette variabilité dépende en grand partie de l'identité du codon stop et de la séquence qui l'entoure. En effet, comme mentionné précédemment, ces paramètres affectent l'efficacité de la terminaison de la traduction et donc le potentiel de translecture. De façon intéressante, dans l'étude de Politano et collaborateurs citée ci-dessus, dans les 3 patients dans lesquels l'expression de la dystrophine a pu être restaurée, le PTC était un UGA, et dans le patient où aucune réponse n'a été détectée, il s'agissait d'un UAA (Politano et al. 2003).

Enfin, une réponse variable est même observée dans des groupes de patients qui présentent le même PTC à la même position et donc avec le même contexte nucléotidique, comme cela a été observé dans l'étude de Wilschanski et collaborateurs (2003) réalisée sur des patients atteints de mucoviscidose. L'examen des niveaux des ARNm dans les patients porteurs de la même mutation (W1282X) a montré que ceux qui n'ont pas répondu au traitement avec gentamicine avaient des niveaux d'ARNm CFTR très faibles, contrairement aux patients qui ont répondu au traitement, chez qui des niveaux plus élevés d'ARNm CFTR ont été mesurés (Linde et al. 2007b). Ces observations suggèrent que l'efficacité de la translecture dépend de la quantité de l'ARNm non-sens disponible, qui à son tour dépend de l'efficacité du NMD. Par conséquent, des différences dans l'efficacité du NMD entre les patients expliqueraient les différences dans la réponse au traitement avec gentamicine au sein d'un groupe de patients qui présentent la même mutation non-sens (Linde et al. 2007b).

Cela signifie qu'une inhibition du NMD pourrait éventuellement améliorer le traitement de ces maladies lorsque l'approche translecture est envisagée.

Un inconvénient majeur de l'utilisation des aminoglycosides est qu'il est bien connu que leur utilisation à long terme a des effets secondaires indésirables, notamment en raison d'une néphrotoxicité et d'une ototoxicité, ce qui limite fortement leur intérêt thérapeutique (Kuzmiak and Maquat 2006). C'est pourquoi, un grand intérêt a été porté sur le développement de nouveaux aminoglycosides qui sont capables d'induire la translecture mais avec une toxicité moindre. Récemment le développement de nouveaux aminoglycosides dérivés de la paromomycine ou du G418, avec une toxicité moindre, a été rapporté (Nudelman et al. 2006; Nudelman et al. 2009; Nudelman et al. 2010). Ces composés ont été testés sur des modèles cellulaires humains et sur des modèles murins de mucoviscidose (Rowe et al. 2011) et du syndrome de Rett (Brendel et al. 2011). Sur ces modèles, l'efficacité de ces composés a été au moins équivalente voire supérieure à celle de la gentamicine, avec une toxicité réduite.

### 5.3.2.3. Autres composés non-aminoglycosides

Un crible réalisé par la compagnie « PTC Therapeutics » spécifiquement dessiné pour détecter des molécules capables d'induire la translecture sur un ARNm rapporteur luciférase a permis de trouver une molécule structurellement différente des aminoglycosides, la molécule PTC124 (Ataluren) (Welch et al. 2007). Son mode d'action n'a pas encore été caractérisé, mais il semblerait qu'elle se lie à la sous-unité 60S du ribosome. Il faut noter que PTC124 n'induit pas la translecture sur les codons stop physiologiques et ne stabilise pas les ARNm non-sens (Welch et al. 2007).

PTC124 a été testée *in vitro* et *in vivo* sur des modèles cellulaires ou murins porteurs d'ARNm non-sens dystrophine ou CFTR (Welch et al. 2007; Du et al. 2008). Les résultats de ces études ont montré la réexpression partielle de ces deux protéines dans les modèles testés. Son efficacité a aussi été testée dans d'autres modèles cellulaires de maladies, avec des résultats relativement variables, allant d'une translecture significative à une absence d'expression du gène porteur de la mutation non sens. PTC124 a montré son efficacité par exemple, sur des ARNm non-sens du gène *USH1C* (impliqué dans le syndrome d'Usher de type C) (Goldmann et al. 2011), du gène *CPT1A* (impliqué dans le déficit de carnitine palmitoyltransférase 1A) (Tan et al. 2011) et du gène de la dysferline (impliqué dans la myopathie de Miyoshi) (Wang et al. 2010).

En revanche PTC124 n'a pas été capable d'induire la translecture sur l'ARNm non-sens du gène *PEX7* (impliqué dans la chondrodysplasie rhizomélique punctata type 1) (Dranchak et al. 2011) et du gène *MC4R* (impliqué dans l'obésité) (Brumm et al. 2011). Il faut noter que dans ces deux derniers cas, il ne s'agit pas d'une situation complètement défavorable à de la translecture puisque l'utilisation de l'aminoglycoside G418 s'est montrée plutôt efficace dans l'obtention de protéines translues.

Suite à plusieurs essais cliniques, PTC124 a montré qu'elle peut être administrée par voie orale et qu'elle est bien tolérée. Dans un essai clinique phase II sur des patients atteints de mucoviscidose, 17 sur 23 malades traités avec PTC124 ont montré une réponse au traitement, mesurée en termes d'augmentation du transport du chlore dans le tissu nasal (Kerem et al. 2008). Comme pour les essais cliniques avec la gentamicine mentionnés précédemment, la réponse au traitement avec PTC124 a pu être observée seulement dans les patients chez qui un minimum d'ARNm CFTR était détecté. De façon intéressante, le seuil minimum de quantité d'ARNm nécessaire pour observer un effet dépend de la mutation non-sens. En effet, pour les transcrits avec la mutation W1282X, une expression d'au moins 20% du niveau du transcrit sauvage est requise pour observer une réponse électrophysiologique, tandis que pour ceux qui ont la mutation G542X, des niveaux moins importants (inférieurs à 10%) ont été suffisants pour avoir une réponse (Kerem et al. 2008). Ceci reflète probablement des différences d'efficacité de translecture de PTC124 sur les deux PTC, puisque des observations précédentes avaient montré que la molécule est plus efficace sur UGAG (la séquence de G542X) que sur la séquence UGAA (la séquence de W1282X) (Welch et al. 2007). Deux autres essais cliniques avec PTC124 ont montré aussi des améliorations du transport du chlore dans le tissu nasal des patients traités (Sermet-Gaudelus et al. 2010; Wilschanski et al. 2011). Toutefois, il n'a pas encore été établi si ces améliorations peuvent conduire à un réel bénéfice clinique pour les patients atteints de mucoviscidose. Un essai clinique de phase III qui est actuellement en cours sur plus de 200 patients devrait apporter des éléments de réponse.

Si les résultats sur la mucoviscidose sont plutôt encourageants, en revanche, les essais cliniques entrepris dans le cadre de la myopathie de Duchenne ont donné des résultats assez décevants. En effet, trois essais cliniques de phase II qui avaient été entrepris dans des patients atteints de DMD et BMD ont été arrêtés prématurément, puisque même si la molécule a été bien tolérée chez ces patients, l'objectif primaire (une amélioration significative dans le test de marche de 6 minutes) n'a malheureusement pas été atteint (Pichavant et al. 2011).

Enfin, la molécule PTC124 est testée actuellement sur des patients de deux autres maladies génétiques que sont l'acidémie méthylmalonique et l'hémophilie A et B. Ces tests constituent deux essais cliniques de phase II dont les résultats n'ont pas encore été dévoilés.

Récemment, un autre crible a permis d'identifier d'autres composés capables de faire de la translecture (Du et al. 2009). Ce système couple la transcription et la traduction *in vitro* d'un plasmide qui contient le gène *ATM* portant un PTC avec la détection par ELISA de la protéine entière obtenue en présence d'un composé induisant la translecture. Par ce système, deux molécules appelés RTC13 et RTC14 ont déjà été identifiées comme des composés capables d'induire la translecture. Leur efficacité a été démontrée dans des cellules dérivées de patients atteints d'ataxie télangiectasie dans lesquels le gène *ATM* porte un PTC, et aussi sur des myoblastes dérivés de souris *mdx* (Du et al. 2009). Le mécanisme d'action de ces composés n'a pas encore été décrit, mais on sait qu'ils ne présentent pas de similarité structurale avec les aminoglycosides.

### 5.3.3. Inhibition du NMD

Comme discuté précédemment, parmi les maladies génétiques associées à l'apparition d'un PTC on distingue (i) celles qui sont provoquées parce que le PTC échappe au NMD et une protéine tronquée délétère est synthétisée et (ii) celles qui sont provoquées parce que le PTC déclenche le NMD qui empêche la synthèse protéique, même dans des cas où une protéine tronquée pourrait être fonctionnelle. De façon intéressante, des analyses sur des banques de données suggèrent que la plupart des maladies génétiques associées aux PTC se retrouvent dans la deuxième catégorie. Mort et collaborateurs ont analysé 5.316 mutations non-sens répertoriées dans *The Human Gene Mutation Database* qui est une base de données qui recense toutes les mutations qui touchent aux régions codantes des gènes nucléaires et qui ont été trouvés dans des maladies héréditaires (Mort et al. 2008). En suivant la règle des 50-55 nucléotides, ils ont classé ces mutations non-sens en PTC qui échappent au NMD et PTC qui déclenchent le NMD. Ils ont trouvé que les PTC qui déclenchent le NMD sont les plus fréquemment observés dans les maladies, ce qui est attendu du fait de la proportion de la phase codante qui peut être sensible au NMD versus la proportion qui peut y être immune (Figure 20). Cela suggère aussi qu'en général, la perte de la protéine ou l'haploinsuffisance est plus délétère pour le phénotype que la synthèse d'une protéine tronquée et par conséquent, une proportion importante des patients avec des mutations non-sens pourrait bénéficier d'une thérapie visant à inhiber le NMD.

Dans les cas où la protéine tronquée ne peut pas remplir la fonction de la protéine sauvage, l'inhibition du NMD pourrait être utile pour augmenter l'efficacité des molécules qui induisent la translecture sur des ARNm portant un PTC, afin d'obtenir des quantités plus importantes de protéines entières. En effet, les quantités de protéines entières synthétisées par translecture en général sont faibles, parce que la plupart des ARNm qui peuvent servir de substrat sont dégradés par NMD (Holbrook et al. 2004). Comme discuté précédemment, la réponse des patients aux traitements avec des molécules qui stimulent la translecture dépend en partie de l'efficacité du NMD : chez les patients où le NMD est très efficace, très peu ou pas de réponse est détectée, contrairement aux patients chez qui le NMD est moins efficace et plus de transcrits non-sens peuvent subir la translecture (Linde et al. 2007b).

Le NMD peut être inhibé *in vitro* de façon indirecte en utilisant des inhibiteurs de l'élongation de la traduction comme la puromycine ou la cycloheximide (Carter et al. 1995). Une molécule inhibitrice de l'initiation de la traduction appelée pateamine A a montré aussi une capacité à inhiber le NMD (Dang et al. 2009). Néanmoins il est impossible d'utiliser en thérapeutique des composés qui inhibent la traduction générale.

Des composés qui inhibent l'activité kinase de hSMG1 en empêchant la phosphorylation de hUPF1, ont été utilisés pour inhiber le NMD dans des fibroblastes dérivés de patients atteints de la maladie d'Ullrich (Usuki et al. 2004). Ces patients portent un PTC dans le gène qui code pour le collagène VI $\alpha$ 2 dont l'absence provoque des défauts fonctionnels de la matrice extracellulaire. L'inhibition du NMD par traitement avec la caféine ou la wortmannine a permis la stabilisation de l'ARNm et la synthèse d'une forme tronquée de collagène VI $\alpha$ 2 capable de restaurer les défauts dans la matrice extracellulaire (Usuki et al. 2004). Ces résultats soutiennent l'utilisation de l'inhibition du NMD comme approche thérapeutique pour cette maladie. Cependant, ces molécules n'inhibent pas seulement hSMG1 mais aussi toutes les autres PI3KK indispensables dans les voies de réponse aux dommages de l'ADN, ce qui rend difficile leur utilisation en thérapeutique.

Un premier inhibiteur spécifique du NMD a été identifié en 2007 (Durand et al. 2007). Cette molécule, appelée NMDI1 (pour *NMD inhibitor 1*), induit efficacement la stabilisation de deux ARNm rapporteurs du NMD qui codent pour la  $\beta$ -globine et la glutathion peroxydase. Le traitement des cellules avec NMDI1 induit l'exclusion de hSMG5 des P-bodies et provoque l'accumulation de la forme hyperphosphorylée de hUPF1 dans ces granules. Malheureusement, l'utilité de NMDI1 en thérapeutique est limitée puisque sa structure plate est caractéristique des agents intercalants de l'ADN (Hendry et al. 2007).

Dans le but de trouver des nouveaux inhibiteurs du NMD nous avons développé un système cellulaire pour le criblage de composés chimiques. Afin d'orienter le criblage vers des molécules qui peuvent être utilisées comme approche thérapeutique pour la correction de maladies liées à l'apparition d'un PTC, nous avons utilisé une banque composée des principes actifs de médicaments qui ont déjà été mis sur le marché. Notre criblage nous a permis de trouver une molécule dont le potentiel thérapeutique pour des maladies génétiques causées par l'apparition des PTC est très prometteur.

---

# RÉSULTATS

## 1. Correction de mutations non-sens avec la molécule amlexanox

### 1.1. Article 1 : Rescue of nonsense mutations by amlexanox in mammalian cells

Dans le but d'identifier de nouveaux inhibiteurs du mécanisme de NMD, nous avons développé un système qui permet de cribler des banques de petites molécules chimiques au moyen de lignées cellulaires qui reproduisent artificiellement le mécanisme de NMD sur l'ARNm codant pour la Firefly luciférase. Après avoir criblé environ 1500 molécules, nous avons identifié la molécule amlexanox comme étant capable d'inhiber le NMD sur l'ARNm luciférase. Nos expériences subséquentes ont confirmé que l'amlexanox est capable de stabiliser les ARNm non-sens de dystrophine, p53 et CFTR sur trois modèles cellulaires de maladies (dystrophie musculaire de Duchenne, cancer et mucoviscidose respectivement). De façon intéressante, le traitement avec l'amlexanox a permis aussi la synthèse de protéines entières à partir de ces ARNm non-sens, suggérant que cette molécule peut induire la translecture des PTC. Puisque l'amlexanox est un médicament qui est sur le marché depuis plusieurs années (il est utilisé dans le traitement d'aphtes, de l'asthme et de la rhinite allergique), il apparaît comme un candidat très intéressant pour l'usage thérapeutique dans la correction de mutations non-sens dans certains cas des maladies génétiques.

*Article soumis à PLoS Medicine (09/2011)*



Title: Rescue of nonsense mutations by amlexanox in mammalian cells

Authors: Sara Gonzalez-Hilarion<sup>1,2,3</sup>, Terence Beghyn<sup>3,4,5,6</sup>, Nadège Debreuck<sup>3</sup>, Kamel Mamchaoui<sup>7,8,9,10</sup>, Vincent Mouly<sup>7,8,9,10</sup>, Dieter C. Gruenert<sup>11,12</sup>, Benoit Depez<sup>3,4,5,6</sup> and Fabrice Lejeune<sup>1,2,3\*</sup>.

#### Address

1 Université Lille Nord de France, IFR142, Lille, France

2 Inserm, Equipe AVENIR, Lille, France

3 Institut Pasteur de Lille, Lille, France

4 INSERM U761 Biostructures and Drug Discovery, Lille F-59000, France, [www.deprezlab.fr](http://www.deprezlab.fr)

5 Faculté de Pharmacie, Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

6 PRIM ([www.drugdiscoverylille.org](http://www.drugdiscoverylille.org))

7 Institut de Myologie, UM76, Paris, France

8 Université Pierre et Marie Curie, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, Paris, France

9 Inserm, UMRS 974, Paris, France

10 CNRS, UMR 7215, Paris, France

11 Departments of Otolaryngology-Head and Neck Surgery and of Laboratory Medicine, Eli and Edythe Broad Center for Regenerative Medicine and Stem Cell Research, Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, Institute for Human Genetics, University of California, San Francisco, San Francisco, CA, USA

12 Department of Pediatrics, University of Vermont College of Medicine, Burlington, VT, USA

\*Corresponding author: F. Lejeune, Institut Pasteur de Lille – 1 Rue du Professeur Calmette – 59019 Lille, France; [fabrice.lejeune@inserm.fr](mailto:fabrice.lejeune@inserm.fr)

#### Abstract

Nonsense mutations are at the origin of many cancers and inherited genetic diseases. The consequence of nonsense mutations is often the absence of mutant gene expression as a result of the activation of an mRNA surveillance mechanism known as nonsense-mediated mRNA decay (NMD). The studies presented here demonstrate that amlexanox can be used as an NMD inhibitor

that will not only stabilize the nonsense-containing mRNA, but will also lead to the synthesis of the full-length protein. As a result of its ability to inhibit NMD and facilitate stop codon readthrough, Amlexanox may also be useful as a therapy for diseases caused by nonsense mutations.

### Introduction

One third of genetic inherited diseases involve a premature termination codon (PTC) [1]. In most cases, the primary mechanism whereby a nonsense mutation has an effect is through the degradation of that mRNA by a surveillance mechanism called nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and not through translation of the mutant mRNA into a truncated protein (for reviews see [2,3,4,5,6,7,8]). NMD prevents the synthesis of truncated proteins that could be deleterious or non-functional. NMD also prevents the synthesis of truncated proteins that may retain their functional integrity. Thus, inhibition of NMD may represent a very attractive way to treat nonsense-mutation-mediated genetic diseases [9,10,11].

Although NMD has been found in eukaryotes from yeast to human, the mechanism underlying degradation of PTC-containing mRNAs appears to be species-specific. In mammalian cells, NMD involves 4 main factors: UPF1, UPF2, UPF3 (also called UPF3a) and UPF3X (also called UPF3b). The actual role of UPF proteins remains unclear and certain UPFs are not required for all NMD reactions [12,13,14]. UPF proteins are recruited to the mRNP in a sequential manner: UPF3 or UPF3X arriving first, then UPF2 and finally UPF1. It is the presence of UPF proteins downstream of a PTC that promotes the activation of NMD on a specific mRNA during the first/pioneer round of translation [15]. As was first demonstrated by tethering any UPF protein to the 3'UTR of  $\beta$ -globin mRNA [16], the presence of UPF proteins downstream of a normal mRNA stop codon activates NMD.

Several strategies have been developed to overcome the presence of nonsense mutations. One approach involves exon skipping thereby excluding the PTC-containing exon from the mRNA transcript. For example, this approach has been successfully used to eliminate exon 51 mutations of

dystrophin gene of patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) [17,18,19]. The technical limitations of this approach are: 1) to reach a sufficiently high level of the skipped exon mRNA to have functional significance, 2) to control the number of exons skipped such that the resultant mRNA is in-frame with an intact open reading frame (ORF), and 3) to ensure that the truncated protein is functionally viable.

A second strategy involves the incorporation of a random amino-acid at the PTC position through PTC read-through mechanism. PTC read-through results in the synthesis of a full-length protein that is functionally intact, unless the PTC is at a position crucial for protein function and the incorporated amino acid is not compatible with this function. A limited number of molecules have been shown to activate PTC read-through. These include aminoglycoside family members or PTC124 (ataluren) [20,21]. However, even in presence of these molecules, the efficiency of PTC read-through is low [20,22]. One reason for this low read-through efficiency is that mutated mRNA are often substrates for NMD depleting substrates available for PTC read-through. Therefore, inhibition of NMD may augment PTC read-through [23]. Alternatively, the low apparent efficiency of read-through compounds could be the result of the incorporation of different amino acids at each translational run, only a fraction of which giving a functional protein.

NMD inhibition should result in the synthesis of a truncated protein, thus NMD inhibitors has the potential of being therapeutically viable if the PTC is located in the 3'-end of the ORF. Alternatively, a combined NMD inhibitor-PTC-read-through strategy could rescue the expression of a nonsense mutation-containing mRNA regardless of the PTC location.

In our attempt to identify NMD inhibitors that could potentially enhance PTC-read-through as new therapies for nonsense mutation-mediated diseases, we previously identified the first NMD-specific inhibitor, NMDI 1 [24]. This compound is a new chemical entity that would require a long and risky optimization and development process before any clinical use. In order to accelerate access to the clinic, we have screened a library of 1200 marketed drugs. We present here evidences that

amlexanox is a new NMD inhibitor that leads to the synthesis of full-length proteins from nonsense mutation-containing mRNAs and might represent a potential new therapeutic molecule to abolish the consequences of a nonsense mutation.

## Results

### *Identification of amlexanox as NMD inhibitor*

A tethering-based screening system [16] was developed to identify NMD inhibitors from chemical libraries. Briefly, firefly luciferase (Fluc) mRNA was stabilized when the function of hUPF1, hUPF2, hUPF3 or hUPF3X was blocked by a chemical molecule. The assay relies on the transfection of a cell line that stably expresses a Fluc mRNA with 6 MS2-binding sites in the 3'UTR, with vectors that express MS2 fusion protein with one of the four hUPF proteins. Cells were incubated in 96 well-plates with the test compounds. Luciferase activity was measured by adding a luciferase substrate mixed with a lysis buffer. After screening amlexanox (Sequoia Research Products, UK) was observed to have a high luciferase activity in the four cell lines expressing one of the MS2-UPF proteins, suggesting that this compound might block NMD after recruitment of hUPF1 (Figure 1). The luciferase activity with amlexanox is 3 to 4 times higher than the background luciferase activity detected on the plate.

To further characterize amlexanox we determined whether it is able to suppress NMD on endogenous PTC-containing mRNAs. We collected 3 cell lines issued from patients suffering from nonsense-mutation-mediated lung cancer, Duchenne muscular dystrophy (DMD) or cystic fibrosis (CF), where the mutated mRNAs code respectively for p53, dystrophin and the CF transmembrane conductance regulator (CFTR). Interestingly, with these cell lines, it was possible to measure the effect of our compound on the three possible nonsense codons located in three different nucleotide environments.

The lung cancer cell line, Calu-6 (ATCC, USA) has a homozygous TGG->TGA mutation at codon 196 of p53. These cells were incubated with increasing concentrations of amlexanox ranging from 0.2 to 25  $\mu$ M for 20 hrs or with DMSO as a control (Figure 2A). Reverse transcribed RNAs from Calu-3 cells (ATCC, USA) were used as a reference. Calu-3 cells are derived from a lung adenocarcinoma and they express both p53 and CFTR at relatively high level (RNA and protein). A greater than 2-fold stabilization of p53 mRNA was observed at 25  $\mu$ M of amlexanox in Calu-6 cells indicating inhibition of NMD. At higher concentrations, a change in the cell morphology was observed, suggesting that amlexanox concentrations higher than 25  $\mu$ M might interfere with cellular metabolism (data not shown). However, the cell viability even at 125  $\mu$ M was comparable to that observed with the DMSO alone (Figure 3A). Therefore, to avoid any confounding results, 25  $\mu$ M was the highest concentration used. A faint band corresponding to p53 mRNA was detected in the DMSO sample. This residual expression of p53 in Calu-6 cells has already been observed previously [25] and could represent a subpopulation of NMD-protected p53 mRNAs (such as nuclear p53 mRNAs) or cytoplasmic untranslated p53 mRNAs.

The next cell line tested is an immortalized myocyte cell line from a DMD patient with nonsense mutation (TCT ->TAA) in exon 71 at codon 3420 of the dystrophin gene (see Materials and Methods). These cells were treated with amlexanox for 48 hrs while they were exposed to conditions that promote differentiation and dystrophin expression. As with the Calu-6 cells, increasing concentrations of amlexanox resulted in increased levels (up to 5-fold) of the mutant mRNA (Figure 2B). Unlike the Calu-6 cells which reached maximum mRNA stability at 25 $\mu$ M, maximal effect was reached at 5  $\mu$ M. This suggests that either amlexanox enters myocytes more efficiently than it does Calu-6 cells or that NMD of dystrophin mRNA is more efficiently inhibited by amlexanox than of p53 mRNA.

The final cell line, 6CFSMEo-, used is an immortalized CF airway epithelial cell line derived from a population enriched for submucosal gland epithelial cells [26]. The 6CFSMEo- cells are from a patient

that is compound heterozygous. One allele is a CTT deletion spanning codons 507 and 508 of CFTR that results in the in frame deletion of a phenylalanine ( $\Delta$ F508). The other allele is a CAG->TAG nonsense mutation at the codon 2 (Q2X) of the CFTR gene [26]. A previous study indicated that there was little or no expression of the  $\Delta$ F508 and the Q2X alleles in the 6CFSMEo- cells [27]. When the cells were treated with increasing concentrations of amlexanox a 3- to 4-fold stabilization of the CFTR mRNA was detected at 25  $\mu$ M of amlexanox (Figure 2C). Even though we favor the hypothesis that amlexanox stabilized PTC-containing CFTR mRNAs since amlexanox showed the capacity of stabilizing PTC-containing mRNAs in other cell models, we cannot exclude the possibility that amlexanox activated the expression of the  $\Delta$ F508 CFTR allele. As with Calu-6 cells (p53 PTC-containing mRNA), 25  $\mu$ M was the most effective for facilitating CFTR mRNA expression in 6CFSMEo- cells (Figure 2A and 2C). Altogether these results confirm that molecule amlexanox is an NMD inhibitor and is able to block NMD on various PTCs and PTC environments.

#### *Cytotoxicity, translation efficiency and stabilization of natural NMD targets*

The specificity of the amlexanox action and cytotoxicity was evaluated. The effect of amlexanox on cell survival was evaluated at the working concentrations (0.2 to 25  $\mu$ M) or at 125  $\mu$ M. Calu-6 cells were incubated with increasing concentrations of amlexanox and then assayed for viability after 20 hrs with propidium iodide. The results indicate that within this 20 hrs interval, amlexanox is nontoxic for cells even at 125  $\mu$ M. The viability after amlexanox or DMSO incubation is between 95 and 98% (Figure 3A).

Inhibition of translation by amlexanox was assayed by transfecting Calu-6 cells with a YFP- $\beta$ Globin expression vector. Cells were exposed to DMSO or amlexanox 2 hrs after transfection or cycloheximide 4 hrs before assessing fluorescence (Figure 3B). Since the cells were incubated soon after transfection and the fluorescence measured 24 hrs after transfection, the level of fluorescence

should be proportional to the translation efficiency and not to the accumulation of synthesized YFP- $\beta$ Globin before drug exposition. Unlike cycloheximide, which has a dramatic effect on the level of fluorescence, amlexanox does not appear to have a significant effect on the efficiency of translation.

In addition, it was possible to assess whether amlexanox can induce eIF2 $\alpha$  phosphorylation as a function of inhibiting NMD [28,29]. The expression of eIF2 $\alpha$  was analyzed in both the DMD and 6CFSMEo- cells with an antibody specific for the phosphorylated isoform of eIF2 $\alpha$  (Figure 4B and C). No phosphorylation of eIF2 $\alpha$  was observed, suggesting that NMD inhibition does not always require the phosphorylation of eIF2 $\alpha$ .

The effect of amlexanox-mediated-NMD inhibition was also assessed on genes that normally use the NMD pathway to regulate their expression. The mRNA levels of three genes that are natural NMD targets (Nat9, Tbl2 and SC35) [30] were assayed in Calu-6 cells (Figure 3C). For each of these targets, we measured an average of 1.2 -fold stabilization and no dose-related effect. This suggests that amlexanox does not affect the regulation of natural targets of NMD.

#### *Inhibition of NMD by amlexanox and protein synthesis*

Protein synthesis from nonsense mutation mRNAs was analyzed after amlexanox inhibition of NMD. All three cell lines with the PTCs described above were assayed by Western-blot for the presence of truncated p53, dystrophin or CFTR protein. An N-terminal antibody was initially used to detect truncated as well as full-length proteins (Figure 4). After amlexanox treatment, a truncated p53 protein was detected in Calu-6 cells. This truncated protein was not present in DMSO treated Calu-6 cells or in whole-cell extracts from Calu-3 cells. A very low level of full-length p53 was also detected when cells were treated with 1 to 25  $\mu$ M amlexanox. In Calu-6 cells, it appears that the PTC containing P53 mRNA stabilized by amlexanox can be translated into proteins. These results also suggest that amlexanox can directly or indirectly elicit PTC-readthrough on this particular PTC.

Previous studies clearly demonstrated that PTC-readthrough depends on the identity of the PTC and its nucleotide context [22,31,32,33]. To determine whether the dystrophin and CFTR PTCs resulted in full-length and/or truncated protein, the two other cell lines were also treated with increasing amounts of amlexanox. Increasing concentrations of amlexanox in the culture medium of DMD cells during differentiation induced the synthesis of dystrophin protein with maximum synthesis at a concentration of 5 $\mu$ M amlexanox (Figure 4B). This result is consistent with the observation that maximal dystrophin mRNA stabilization occurs at 5 $\mu$ M (Figure 2B). Using anti-N-term antibody, it was difficult to distinguish the full length from the truncated form because of their high and similar molecular weights (427 vs 400 kDa). Therefore, a C-terminal anti-dystrophin antibody (with an epitope in exons 77-78 of dystrophin so upstream of the PTC position) was used. Since this antibody still detected dystrophin after amlexanox treatment, it appears as if at least a portion of the dystrophin synthesized is the full-length protein (Figure 4B middle gel).

Analysis of CFTR protein expression in 6CFSMEo- cells after treatment with increasing concentrations of amlexanox was a bit more challenging, since detection of a truncated CFTR protein with a stop at the second codon would be purely theoretical [27]. As with the other two cell lines, a band was detected that was consistent with the full-length wild-type CFTR protein produced in Calu-3 cells (Figure 4C).

Figure 4 demonstrates that full-length proteins are synthesized after amlexanox treatment from mRNAs containing nonsense mutations. This suggests that amlexanox is not only able to inhibit NMD, but also to activate PTC-readthrough. It was not possible to determine whether amlexanox was equally efficient on any PTC, because the appropriate cell models were not available. For example Calu-3 cells over-express CFTR and synthesize relatively high levels of p53 protein. In the case of DMD cells, both cell lines come from different people and cannot be effectively compared, because inter-individual variation in the expression of the same gene [34]. However, it does appear that amlexanox induces the synthesis of full-length proteins from any PTC at a level detectable by Western blot.



### *Functional analysis of proteins generated after amlexanox treatment*

Dystrophin immunolocalization with an antibody that recognized an epitope in exons 77-78 was distinctly different when comparing WT cells to DMD cells (Figure 5). An intense fluorescent signal (green) was observed under the cytoplasmic membrane of WT cells, but not in the DMD cells treated with DMSO where there appears to be some staining in the nucleus. This nuclear staining could reflect the cellular localization of other dystrophin isoforms such as the DP71 proteins [35]. In presence of amlexanox, dystrophin staining becomes more apparent and can be readily detected at the plasma membrane (Figure 5, right panel). Thus, these images are consistent with the Western blot analysis, and confirm that full-length dystrophin is synthesized after amlexanox treatment. Moreover, dystrophin localizes at the cell membrane in the DMD cells in a fashion similar to what is observed with the wild-type dystrophin protein.

Since the Calu-6 and 6CFSMEo- cell lines encode a nonfunctional truncated p53 or CFTR proteins, respectively, it was interesting to verify that a treatment with amlexanox actually rescues the lost functions in these cells. The function of the full-length p53 protein in the Calu-6 cells was determined by measuring the level of p21 mRNA (a transcriptional target of p53 [36]). The rationale for this analysis was that amlexanox-induced increases in functional p53 should result in an increase in the amount of p21 mRNA. The level of p21 mRNA showed a correlation between the increase in p53 mRNA (at 5 and 25  $\mu$ M in particular), and p21 mRNA (Figure 2A). The function of CFTR was evaluated by measuring cAMP-dependent halide efflux as a function of SPQ fluorescence in 6CFSMEo- cells [37]. Cells were loaded with SPQ and incubated with increasing amounts of amlexanox or with DMSO alone. The medium was sequentially switched to 1) an iodide solution to quench the SPQ fluorescence, and 2) to a nitrate solution containing forskolin and IBMX to elevate intracellular cAMP levels. If CFTR is functional, iodide will be secreted from cells after cAMP activation and result in a rapid increase in the SPQ fluorescence. A dose-dependant in iodide efflux with a maximum effect at

25  $\mu$ M amlexanox was observed in 6CFSMEo- (Figure 6). This result clearly indicates that amlexanox can induce the synthesis of functional CFTR protein in 6CFSMEo- cells.

#### *Comparison of amlexanox with PTC-readthrough molecules*

Since amlexanox was able to induce the synthesis of full-length proteins from PTC-containing mRNAs, the efficacy of amlexanox was compared to that of G418 or PTC124, which have already been shown to facilitate PTC-readthrough [20,38,39]. The effect of each molecule and their combinations was evaluated quantitatively by measuring iodide efflux across the plasma membrane. Amlexanox, G418 or PTC124 were added to 6CFSMEo- cells either alone or in combinations between amlexanox and either G418 or PTC124 for 20 hrs (Figure 7). Amlexanox was used at 5  $\mu$ M (suboptimal) and 25  $\mu$ M (optimal) and G418 was used at 100 and 400  $\mu$ M, concentrations used previously to show G418 readthrough [22,40,41]. PTC124 was used at 5 and 25  $\mu$ M, which were previously shown to be optimal for readthrough [20]. At 5  $\mu$ M amlexanox (Figure 7A), all molecules or combinations of molecules behave with similar efficacy leading to a weak, but significant increase in the export of iodide through the cell membrane when compared to treatment with DMSO alone. Interestingly, the combination of amlexanox (5  $\mu$ M) and PTC124 (25  $\mu$ M) seems to slightly improve the effect of each molecule alone (Figure 7A lower panel). At 25  $\mu$ M, amlexanox alone is more effective than any of the single molecules or combinations (Figure 7B). In the contrary, combinations with amlexanox appear to reduce the effect of 25  $\mu$ M amlexanox.

#### Discussion

The studies presented here outlined the features of a new NMD inhibitor, amlexanox (Figure 1). Amlexanox is shown to efficiently inhibit NMD of the three different nonsense mutation-containing mRNAs from three cellular human disease models (Figure 2). Amlexanox appears to be capable of

not only stabilizing nonsense mutation-containing mRNAs, but it also induces the synthesis of truncated and/or full-length proteins from PTC-containing mRNAs, suggesting activation of PTC-readthrough (Figure 4). This ability to both stabilize PTC-containing mRNAs and promote PTC readthrough has been previously described for G418 [38]. G418 is an aminoglycoside analog, unfortunately, its unfavorable therapeutic index makes it unsuitable for medical applications. Amlexanox is effective at concentrations (5 or 25  $\mu\text{M}$ ) that are generally lower than those required for aminoglycosides. It is possible that the relative effectiveness of amlexanox or G418 depends on the nature of the nonsense mutation, on the nucleotide environment, on the mRNA or on the cell type. Therefore, each cell model with a nonsense mutation needs to be independently assayed to determine the most effective amlexanox working concentration. The nonsense-mutation DMD cell model was the only one cellular model tested in this study requires only 5  $\mu\text{M}$  as the optimal amlexanox concentration. However, DMD cells are distinct from the other cell systems studied, since they require cellular differentiation to activate expression of nonsense-mutation containing dystrophin mRNA. Furthermore, the decrease of the efficacy of amlexanox at 25  $\mu\text{M}$  when compared to effect at 5  $\mu\text{M}$  may be due to a cellular defense that inhibits the entrance of amlexanox into the cells when a specific concentration is reached. Alternatively, amlexanox could be affecting muscle differentiation process or dystrophin expression.

The mode of amlexanox action requires further elucidation to determine which NMD step is blocked by amlexanox and facilitates PTC-readthrough. It is probable that amlexanox inhibits NMD at a late stage, since its effect is not abolished by tethering the MS2-UPF1 protein in the 3'UTR of the Fluc mRNA (Figure 1). The ability of amlexanox to inhibit NMD and facilitate PTC-readthrough of all the PTCs tested suggests that its mode of action is different from certain PTC-readthrough molecules [22], but similar to that of G418.

Recent studies have shown that protein synthesis occurs during the pioneer round of translation [42]. If amlexanox causes nonsense-mutation readthrough during this round of translation, it would

suggest that NMD inhibition and readthrough are concomitant. If readthrough occurs directly after the pioneer round, it would suggest that each these modes of amlexanox action are distinct. Clearly, further analysis of amlexanox activity will have important implications for: 1) development of amlexanox as a novel therapy for nonsense mutation mediated diseases, and 2) assessment of the mechanisms underlying NMD mechanism. Moreover, a better understanding of amlexanox action would provide insight into why the combination of amlexanox with PTC-readthrough molecules can be more effective than amlexanox at 5  $\mu$ M, but not at 25  $\mu$ M. While amlexanox appears to be the most potent molecule among the three tested, further studies using other quantifiable PTC-readthrough systems will be required to determine whether this is a specific or a general property of amlexanox. Indeed, PTC124 has been shown to be efficacious for some nonsense-mutations [20,43] and totally ineffective with others [44,45].

The studies presented here also demonstrate that it is possible to inhibit NMD without dramatically altering cellular metabolism. Both cell viability (Figure 3A) and translation are not affected by amlexanox treatment (Figure 3B). The observed lack of toxicity caused by NMD inhibition could be explained by the redundancy of mRNA level regulation. In our study, the levels of natural NMD substrates are not up-regulated after treatment with amlexanox (Figure 3C), a point that can be explained by the fact that genes using NMD to regulate their expression often use several regulatory mechanisms. For example, SR protein genes use NMD to regulate their expression [46]. The regulation of SR protein gene expression also involves transcription, splicing, translation and/or post-translational events to maintain a functional level of SR proteins [47,48]. These are likely backup regulatory mechanisms to compensate for a lack of response in a specific regulatory pathway. Furthermore, an initiating event must to occur to involve NMD regulation as with the SR proteins that employs an NMD mechanism that reduces the amount of translated mRNA and is activated only when the level of a specific SR protein becomes abnormally high [46,49]. These studies and the results of the studies presented here suggest that complexity of gene regulation allows inhibition of NMD without significantly affecting the profile of gene expression (Figure 3C). Clinically, it is also

important to note that amlexanox has been used for > 30 years without any reports of toxicity linked to regulation of gene expression. Clinically, amlexanox has been used per os or topically to treat aphthous ulcers and asthma [50,51], has anti-allergic [51,52] and anti-inflammatory properties [53,54]. Together with its activity on PTC containing genes, the relative safety of amlexanox and its current use as an oral treatment of asthma, encourage us to investigate in details its therapeutic potential in other pulmonary diseases such as nonsense mutation mediated cystic fibrosis but not only. Thus, amlexanox appears to be a reasonable candidate for a novel therapy to treat disease states that are the result of nonsense mutations. As with PTC124, amlexanox provides a means for development of a personalized therapy for treating a specific type of mutation.

#### Acknowledgements

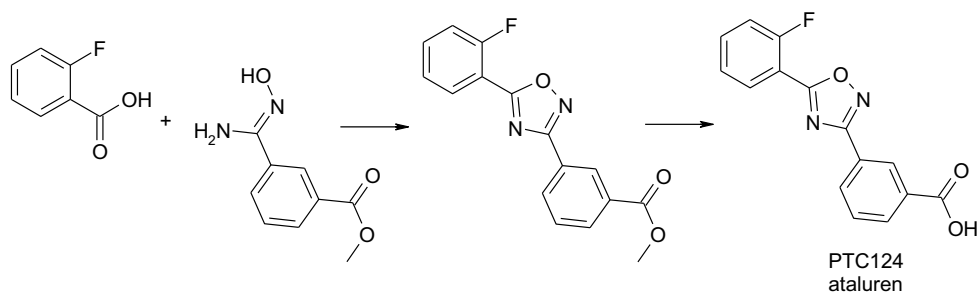
Authors thank Dr Jens-Lykke Andersen, Pr. Lynne Maquat and Pr. Lee Sweeney for reagents. We also would like to thank Dr. France Leturcq and Dr. Valérie Allamand for technical advices and Dr. Florence Petit for critical reading of the manuscript. This work was supported by Inserm Avenir program, the Association Française contre les Myopathies, Vaincre la Mucoviscidose, la Fondation pour la Recherche Médicale, la Ligue Régionale du Nord-Pas-de-Calais contre le Cancer and l'Institut Pasteur de Lille. SGH is supported by a grant Inserm/Région Nord-Pas-de-Calais. KM and VM received funding from TREAT-NMD (contract LSHM-CT-2006-036825) from the European Commission 6th FP, the ANR Genopath-INAFIB, the Duchenne Parent Project Netherlands, CNRS, INSERM, University Pierre and Marie Curie, Parents Project of Monaco, and European Parent Project. DCG is supported by funds from CF Research, Inc and Pennsylvania CF, Inc.

Authors declare that they have no competing interests.

## Materials and methods

### Chemistry

NMR spectra were recorded on a Bruker Avance 300. Chemical shifts are in parts per million (ppm). Mass spectra were recorded with a LCMS (Waters ZQ Micromass). HPLC analyses were performed using a C18 XBridge 3.5  $\mu\text{m}$  particle size column (50 x 4.6 mm). HPLC gradient started from 98% H<sub>2</sub>O/0.1% formic acid, reaching 98% CH<sub>3</sub>CN/0.1% formic acid within 5 or 10 min at a flow rate of 2 mL/min. All commercial reagents and solvents were used without further purification. Purification yields were not optimized.



#### 3-(N-Hydroxycarbamimidoyl)-benzoic acid methyl ester

3.398mmol of 3-Cyano-benzoic acid (Sigma Aldrich Fluka, 15,716-3, CAS 1877-72-1) were suspended in dichloromethane (10mL) containing 5% of methanol. A 0.1 equivalent of 4-dimethylaminopyridine and 1.1 equivalent of dicyclohexyl carbodiimide was added at 0°C and stirred for 5 hrs. Dicyclohexylurea was then filtered, and the solvent was removed by evaporation. After a second precipitation of dicyclohexylurea in diethylether, filtration and evaporation to dryness, 3-Cyano-benzoic acid methyl ester was obtained as a white powder. The crude residue was then dissolved in absolute ethanol (10mL) containing a 1.4 equivalent of diisopropylethylamine. Hydroxylamine chlorhydrate (1.3 eq) was added to the mixture, which was refluxed for 4 hrs and then ethanol was evaporated to dryness. The residue was dissolved in ethyl acetate and washed with water and brine.

The organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness to yield 510mg of a white powder (yield = 77%, Purity LC = 88%)

LC: tR= 1.07 min (5min), MS (ESI+): m/z= 195.1 [M+H]<sup>+</sup>

The 3-(N-Hydroxycarbamimidoyl)-benzoic acid methyl ester (2.626mmol) was suspended in toluene (10mL) in presence of pyridine (1.1eq), followed by the addition of 2-Fluoro-benzoyl chloride (Sigma Aldrich Fluka, 120847-25G, CAS 393-52-2) and 3 hrs of reflux. Toluene and pyridine were removed by evaporation. The crude residue was then dissolved in ethyl acetate and washed with aqueous acidic and basic solutions. The organic layer was dried over magnesium sulfate and evaporated to dryness to give 700mg of a white powder (yield = 89%, Purity LC = 92%).

LC: tR= 3.35 min (on 5min), MS (ESI+): m/z= 298.91 [M+H]<sup>+</sup>

The 3-[5-(2-Fluoro-phenyl)-[1,2,4] oxadiazol-3-yl]-benzoic acid methyl ester (2.35mmol) was suspended in a 1M NaOH solution in methanol 1M (10 mL). After 2 hrs, the suspension was heated to 50°C and stirred overnight. After 16 hrs, the reaction mixture was acidified to pH 4 with 1M chlorhydric acid. The methanol was evaporated and the product was extracted from aqueous solution with ethyl acetate. The organic layer was then dried over MgSO<sub>4</sub>. The product was crystallized in a mixture 60/40 ethanol/DCM and yielded 245 mg of a white crystal (yield = 36%, purity LC = 97%).

LC: tR= 6.64 min (on 10min), MS (ESI+): m/z= 284.95 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): δ 8.61 (t, J=1.4 Hz, 1H), 8.30 (dt, J=7.8 Hz and J=1.2 Hz 1H), 8.24 (td, J=7.6 Hz and J=1.7 Hz, 1H), 8.15 (dt, J=7.8 Hz and J=1.4 Hz, 1H), 7.9 (m, 1H), 7.72 (t, J=7.7 Hz, 1H), 7.55 (d, J=8.5 Hz, 1H), 7.49 (q, J=7.6 Hz, 1H).

The « drugs on the market » library is a new and original proprietary chemical library that contains more than 1200 pure active pharmaceutical compounds from international pharmacopeias. They were selected for being repositionable and collected as pure powders. Screening of the compounds was carried out 96-well plates at 10 μM in DMSO.

#### Cell Culture and Chemical Exposure

HeLa cells, expressing firefly luciferase mRNA and one of the fusion protein MS2-UPF, were grown in DMEM supplemented with 10% FBS, 2.5 mg/ml blasticidin and a mixture of 1 U/ml penicillin and 1 mg/ml of streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Calu-3 and Calu-6 cells were grown in RPMI medium supplemented with 10% FBS and a mixture of 1 U/ml penicillin and 1 mg/ml of streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. DMD cells were grown in 4 DMEM/199 medium (4:1) supplemented with 20% FBS, 10<sup>-7</sup> M dexamethasone, 2.5 ng/ml HGF and a mixture of 1 U/ml penicillin and 1mg/ml streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cell differentiation was initiated in DMEM supplemented with 10 mg/ml insulin and 100 mg/ml transferrin. 6CFSMEo- cells were grown in α-MEM supplemented with 10% FBS, 1 mM L-glutamine and a mixture of 1 U/ml of penicillin and 1 mg/ml of streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Compounds were added 20 hrs before harvesting the cells with the exception of the DMD cells which were exposed to the compounds for 48 hrs starting with the addition of the differentiation medium.



### Immortalization of DMD cells

*hTERT* and *Cdk4* cDNA were cloned into distinct lentiviral vectors containing respectively the puromycin and neomycin selection markers. Transduction with lentiviral vectors were performed overnight in the presence of Polybrene (4 mg/ml; Sigma-Aldrich). Transduced cell cultures were submitted to selection in the presence of puromycin (0,2µg/ml) and/or neomycin (0,3mg/ml) for 8 days. The infected cells were then seeded at clonal density. Clones selected were isolated using glass cylinders and their proliferation and differentiation capacities were characterized in the culture conditions described above. The clone used in this study presented growth and differentiation capacity similar to that observed on the original primary culture (data not shown).

### Expression Constructs

HeLa cells stably expressing firefly luciferase mRNA with MS2 binding sites (bs) in the 3'UTR were obtained by transferring Fluc cDNA with MS2 bs from pCFluc (gift from Dr. Jens Lykke-Andersen) to the pLenti6/V5 using the PCR-based TOPO directional cloning system (Life Technologies) (sense primer: 5'CACCATGGAAGACGCCAAAAACAT3' and antisense primer: 5'TGACTATAGAATAGGGCC3'). The lentiviral particles produced with ViraPower Lentiviral Expression System (Life Technologies) were used to transduce the HeLa cells. Stable Fluc expressing clones were selected and isolated using a selective medium containing 2.5mg/ml Blasticidin.

The MS2-UPF expression vectors were constructed by transferring MS2-UPF cDNA from the pMS2-UPF proteins vector (gift from Dr. Jens Lykke-Andersen) into pLenti4/V5-DEST vector using Gateway Cloning according the manufacturer's instructions. Each MS2-UPF cDNA was cloned using the following primers: sense: 5'GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCACCATGGCTTCTAACTTTACTCAG3'; and antisense: 5'GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAATTTAGGTGACTATAGAA3'

### Screening

HeLa cells stably expressing firefly luciferase were transduced with the recombinant lentiviral constructs containing one of the four pLenti4/V5-MS2-UPF plasmids. Cells were seed into 96 well plates two days after infection and then exposed to the chemical compounds for 20 hrs. Plates were loaded into a Tristar LB 941 microplate reader (Berthold) after the addition of SteadyLite luciferase substrate (PerkinElmer) in order to measure Luciferase activity in each well for 1 second. Each plate was read 3 times.

### RNA analysis

RNA was purified using RNazol (MRC) according to the manufacturer's instructions. A portion (1/5) of the RNA preparation was evaluated by reverse-transcription (RT) PCR (RT-PCR) using Superscript II (Life Technologies) for 2 hrs at 42°C in presence of random hexamer for RT. The resultant cDNAs were PCR amplified in presence of dCTP(  $\alpha^{33}$ P) (Perkin Elmer) with primers:

\_GAPDH: sense: 5'CATTGACCTCAACTACATGG3' and antisense: 5'GCCATGCCAGTGAGCTTCC3'

\_p53: sense: 5'ATGTGCTCAAGACTGGCGC3' and antisense: 5'GACAGCATCAAATCATCC3'

\_dystrophin: sense: 5'TCCTGGCATCAGTTACTGTG3' and antisense: 5'CCAGTGGAGGATTATATTCC3'

\_CFTR: sense: 5'GGCCAGAGGGTGGCCTCTT3' and antisense: 5'CACCCTGTCCGAGGGGCTGA3'

\_p21: sense: 5'CGAGGCACTCAGAGGAG3' and antisense: 5'TCCAGGACTGCAGGCTTCC3'

PCR products were quantified using Personal Molecular Imager and QuantityOne quantification software (Bio-Rad).

### Western Blot Hybridization

Proteins were isolated in the following lysis buffer: 50 mM Tris pH7, 20 mM EDTA and 5% SDS. All protein extracts, with the exception of dystrophin, were analyzed by 10% SDS-PAGE. Dystrophin analysis was carried out using 7.5% SDS-PAGE. After migration, proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane and then exposed to the primary antibody. The primary antibodies used were: anti-p53 (D01; Santa-Cruz), anti-dystrophin against an N-terminal epitope (4C7; Santa-Cruz), anti-dystrophin against a C-terminal epitope (exons 77-78) (Abcam), anti-CFTR against an N-terminal epitope (MM13-4; Millipore), anti-tubulin (Epitomics) and anti-phosphorylated eIF2 $\alpha$  (Epitomics). The primary antibody incubation is followed by a secondary antibody incubation using anti-mouse or rabbit antibody (Jackson Immuno Research). Proteins finally detected using SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce).

#### SPQ Halide-efflux Assay

Cells were seeded in 96-well plates and loaded overnight with 10 mM SPQ fluorophore (6-methoxy-N-(3-sulfopropyl)-quinolinium) (Invitrogen). Cells were washed twice with I<sup>-</sup> buffer (135 mM NaI, 2.4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1mM CaSO<sub>4</sub>, 10 mM dextrose and 10 mM Hepes, pH 7.3) and then incubated in iodide buffer for 30 min. After establishing the basal fluorescence (2 min), the iodide buffer was replaced with NO<sub>3</sub><sup>-</sup> buffer (135 mM NaNO<sub>3</sub> instead of NaI) containing 20  $\mu$ M forskolin and 200  $\mu$ M IBMX. Fluorescence was the evaluated for a further 10 min. Fluorescence intensities were measured every 15 seconds using the Tristar LB 941 microplate reader (Berthold) equipped with a 340 nm excitation filter and a 450 nm emission filter.

#### Translation efficiency

Calu-6 cells were transfected with the 1  $\mu$ g pYFP-globin expression vector [42]. The cells were exposed to DMSO or 25  $\mu$ M amlexanox 2 hrs after transfection for 20 hrs. Cycloheximide (200  $\mu$ g/ml)

was added to specific cell samples 4 hrs before harvesting cells. Cells were harvested by trypsinization and YFP fluorescence was measured using Tali image-based cytometer (Life Technologies).

#### Cell Viability

Cells were harvested by trypsinization, centrifuged 3 min at 200g and resuspended in PBS. Tali dead cell red (propidium iodide) reagent was then added to the cells. After a 5 min incubation in the dark, the cells were loaded into Tali image-based cytometer (Life Technologies).

#### Immunofluorescence

DMD cells were grown on ibiTreat surface  $\mu$ -dishes (Ibidi) and differentiated as described above. Cells were fixed 10 min in 95% ethanol at room temperature 48 hrs after initiating differentiation. The fixed cells were washed twice in PBS and incubated with the C-terminal anti-dystrophin antibody for 1 hr at room temperature, washed twice with PBS and incubated with the secondary anti-rabbit antibody conjugated with Alexa 488 fluorophore (Life Technologies) for 1 hr at room temperature. The cells were then incubated with Hoechst stain for 1 min at room temperature before adding Vectashield (ABCYS) mounting medium and sealing a coverslip.

## Figure legends

Figure 1: Identification of amlexanox as putative NMD inhibitor. Luciferase activity was measured from cells expressing the Firefly luciferase with MS2 binding site in its 3'UTR and MS2-UPF1 (up and left), MS2-UPF2 (up and right), MS2-UPF3 (down and left) or MS2-UPF3X (down and right). Tested drugs were added in columns 2 to 11, the vehicle (DMSO) was added in positions A1 to C1. No compounds were added in the rest of column 1 and column 12 as negative controls. An average luciferase activity measure is indicated under the histogram and the luciferase activity measured in the well amlexanox. The luciferase activity is provided in arbitrary units.

Figure 2: Amlexanox stabilizes nonsense mutation-containing mRNAs. Increasing amounts of amlexanox are added to the cell culture medium of Calu-6 cells (A), DMD cells (B) or 6CFSEo- cells (C). RNAs are purified, reverse transcribed and PCR is performed to measure the level of p53, dystrophin or CFTR mRNA, respectively. GAPDH level is used to normalize the amount of the nonsense mutation-containing mRNAs level. The three left lanes represent a two-fold serial dilution of RNA from untreated cells. Quantification is based on at least 3 independent experiments and the average quantification is indicated under each gel with standard deviation.

Figure 3: Amlexanox is not toxic, does not inhibit general translation and does not affect natural NMD substrates expression. (A) Calu-6 Cell viability was measured after 20 hours of cell incubation with increasing amounts of amlexanox or with DMSO. These results combine three independent experiments. (B) Measure of translation efficiency after amlexanox treatment. Calu-6 Cells were transfected with an expression vector coding for YFP-Globin protein, and then treated with 25 $\mu$ M amlexanox, DMSO or as positive control cycloheximide. YFP Fluorescence which reflects the translation efficiency was measured using a cytometer. This result is representative of 2 independent

experiments (C) The level of three NMD natural target mRNAs was measured from Calu-6 cells as described in Materials and Methods from three independent experiments.

Figure 4: Amlexanox treatment leads to the synthesis of truncated and/or full length proteins from nonsense mutation-containing mRNAs. Calu-6 (A), DMD (B) or 6CFSMEo- (C) cells were incubated with amlexanox molecule or with DMSO (-) as a control before purifying proteins and performing Western blot to detect p53, dystrophin or CFTR protein, respectively, using antibodies raised against N-terminal part of the proteins (and C-terminal part of the protein for B as mentioned). The three left lanes represent a two-fold serial dilution of a non treated cell extract. Each gel is representative of at least 2 independent experiments. On the left of each gel is indicated the molecular weight ladder (BenchMark pre-stained for A and C, or HiMark pre-stained for B (Life Technologies)).

Figure 5: Dystrophin is found at the cell membrane of DMD cells after amlexanox treatment. WT (left panel) or DMD cells (two right panels) were incubated in differentiation medium in presence of DMSO or 5 $\mu$ M of amlexanox for 48 hours. Then cells were fixed and nuclei (blue) were stained using Hoechst reagent and dystrophin (green) was localized using anti-dystrophin raised against the C-terminal part of the protein. White arrows indicate dystrophin localization at the cellular membrane.

Figure 6: Amlexanox treatment of 6CFSMEo- cells leads to the synthesis of functional CFTR. 6CFSMEo- cells were loaded with the halide-sensitive fluorophore SPQ and treated with DMSO (■), 0.2 $\mu$ M amlexanox ( $\Delta$ ), 1 $\mu$ M amlexanox (●), 5 $\mu$ M amlexanox ( $\square$ ) or 25 $\mu$ M amlexanox ( $\blacktriangle$ ) for 20 hours. At time (t) = 2 min cAMP-stimulating cocktail was added (arrow). The increase in iodide efflux is shown as mean  $\pm$  SEM from at least four independent experiments. Ft represents the measure of the fluorescence at the reading time; F0 is an average fluorescence before addition of cAMP agonists.

Figure 7: Comparison of the efficiency of amlexanox alone or in combination with PTC-readthrough molecules. 6CFSMEo- cells were incubated with 5  $\mu$ M (A) or 25  $\mu$ M (B) of amlexanox alone or with G418 (upper panel) or PTC124 (lower panel). At time (t) = 2 min cAMP-stimulating cocktail was added (arrow). The increase in iodide efflux is shown as mean  $\pm$  SEM from at least four independent experiments. Ft represents the measure of the fluorescence at the reading time; F0 is an average fluorescence before addition of cAMP agonists.

## References

1. Frischmeyer PA, Dietz HC (1999) Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* 8: 1893-1900.
2. Brogna S, Wen J (2009) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol* 16: 107-113.
3. Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* 76: 51-74.
4. Isken O, Maquat LE (2007) Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* 21: 1833-1856.
5. Rebbapragada I, Lykke-Andersen J (2009) Execution of nonsense-mediated mRNA decay: what defines a substrate? *Curr Opin Cell Biol* 21: 394-402.
6. Rehwinkel J, Raes J, Izaurralde E (2006) Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends Biochem Sci* 31: 639-646.
7. Silva AL, Romao L (2009) The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Lett* 583: 499-505.
8. Muhlemann O, Eberle AB, Stalder L, Zamudio Orozco R (2008) Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1779: 538-549.
9. Linde L, Kerem B (2008) Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* 24: 552-563.
10. Kuzmiak HA, Maquat LE (2006) Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends Mol Med* 12: 306-316.
11. Bhuvanagiri M, Schlitter AM, Hentze MW, Kulozik AE (2010) NMD: RNA biology meets human genetic medicine. *Biochem J* 430: 365-377.
12. Gehring NH, Kunz JB, Neu-Yilik G, Breit S, Viegas MH, et al. (2005) Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol Cell* 20: 65-75.

13. Chan WK, Bhalla AD, Le Hir H, Nguyen LS, Huang L, et al. (2009) A UPF3-mediated regulatory switch that maintains RNA surveillance. *Nat Struct Mol Biol* 16: 747-753.
14. Kunz JB, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE, Gehring NH (2006) Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *RNA* 12: 1015-1022.
15. Ishigaki Y, Li X, Serin G, Maquat LE (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106: 607-617.
16. Lykke-Andersen J, Shu MD, Steitz JA (2000) Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* 103: 1121-1131.
17. Goyenvallé A, Babbs A, van Ommen GJ, Garcia L, Davies KE (2009) Enhanced exon-skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. *Mol Ther* 17: 1234-1240.
18. Denti MA, Rosa A, D'Antona G, Sthandier O, De Angelis FG, et al. (2006) Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum Gene Ther* 17: 565-574.
19. Chaouch S, Mouly V, Goyenvallé A, Vulin A, Mamchaoui K, et al. (2009) Immortalized skin fibroblasts expressing conditional MyoD as a renewable and reliable source of converted human muscle cells to assess therapeutic strategies for muscular dystrophies: validation of an exon-skipping approach to restore dystrophin in Duchenne muscular dystrophy cells. *Hum Gene Ther* 20: 784-790.
20. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, et al. (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447: 87-91.
21. Keeling KM, Du M, Bedwell DM (2006) Therapies of Nonsense-Associated Diseases. *Nonsense-mediated mRNA Decay - Landes Bioscience Editor* : Lynne E. Maquat: 121-136.
22. Bidou L, Hatin I, Perez N, Allamand V, Panthier JJ, et al. (2004) Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. *Gene Ther* 11: 619-627.
23. Linde L, Boelz S, Nissim-Rafinia M, Oren YS, Wilschanski M, et al. (2007) Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* 117: 683-692.
24. Durand S, Cougot N, Mahuteau-Betzer F, Nguyen CH, Grierson DS, et al. (2007) Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J Cell Biol* 178: 1145-1160.
25. Caamano J, Ruggeri B, Momiki S, Sickler A, Zhang SY, et al. (1991) Detection of p53 in primary lung tumors and nonsmall cell lung carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 139: 839-845.
26. Cozens AL, Yezzi MJ, Chin L, Simon EM, Finkbeiner WE, et al. (1992) Characterization of immortal cystic fibrosis tracheobronchial gland epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 5171-5175.
27. da Paula AC, Ramalho AS, Farinha CM, Cheung J, Maurisse R, et al. (2005) Characterization of novel airway submucosal gland cell models for cystic fibrosis studies. *Cell Physiol Biochem* 15: 251-262.
28. Wang D, Zavadil J, Martin L, Parisi F, Friedman E, et al. (2011) Inhibition of nonsense-mediated RNA decay by the tumor microenvironment promotes tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 31: 3670-3680.
29. Chiu SY, Lejeune F, Ranganathan AC, Maquat LE (2004) The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes Dev* 18: 745-754.
30. Viegas MH, Gehring NH, Breit S, Hentze MW, Kulozik AE (2007) The abundance of RNPS1, a protein component of the exon junction complex, can determine the variability in efficiency of the Nonsense Mediated Decay pathway. *Nucleic Acids Res* 35: 4542-4551.
31. Namy O, Hatin I, Rousset JP (2001) Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO Rep* 2: 787-793.



32. Bonetti B, Fu L, Moon J, Bedwell DM (1995) The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* 251: 334-345.
33. Tork S, Hatin I, Rousset JP, Fabret C (2004) The major 5' determinant in stop codon read-through involves two adjacent adenines. *Nucleic Acids Res* 32: 415-421.
34. Storey JD, Madeoy J, Strout JL, Wurfel M, Ronald J, et al. (2007) Gene-expression variation within and among human populations. *Am J Hum Genet* 80: 502-509.
35. Acosta R, Montanez C, Fuentes-Mera L, Gonzalez E, Gomez P, et al. (2004) Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res* 296: 265-275.
36. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, et al. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75: 817-825.
37. Mansoura MK, Biwersi J, Ashlock MA, Verkman AS (1999) Fluorescent chloride indicators to assess the efficacy of CFTR cDNA delivery. *Hum Gene Ther* 10: 861-875.
38. Correa-Cerro LS, Wassif CA, Waye JS, Krakowiak PA, Cozma D, et al. (2005) DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* 42: 350-357.
39. Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, et al. (2008) Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* 372: 719-727.
40. Bedwell DM, Kaenjak A, Benos DJ, Bebok Z, Buben JK, et al. (1997) Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* 3: 1280-1284.
41. Murphy GJ, Mostoslavsky G, Kotton DN, Mulligan RC (2006) Exogenous control of mammalian gene expression via modulation of translational termination. *Nat Med* 12: 1093-1099.
42. Apcher S, Daskalogianni C, Lejeune F, Manoury B, Imhoos G, et al. (2011) Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11572-11577.
43. Du M, Liu X, Welch EM, Hirawat S, Peltz SW, et al. (2008) PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2064-2069.
44. Dranchak PK, Di Pietro E, Snowden A, Oesch N, Braverman NE, et al. (2011) Nonsense suppressor therapies rescue peroxisome lipid metabolism and assembly in cells from patients with specific PEX gene mutations. *J Cell Biochem*.
45. Brumm H, Muhlhaupt J, Bolze F, Scherag S, Hinney A, et al. Rescue of Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Nonsense Mutations by Aminoglycoside-Mediated Read-Through. *Obesity* (Silver Spring).
46. Lareau LF, Inada M, Green RE, Wengrod JC, Brenner SE (2007) Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* 446: 926-929.
47. Ni JZ, Grate L, Donohue JP, Preston C, Nobida N, et al. (2007) Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev* 21: 708-718.
48. Bourgeois CF, Lejeune F, Stevenin J (2004) Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 78: 37-88.
49. Sureau A, Gattoni R, Dooghe Y, Stevenin J, Soret J (2001) SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *EMBO J* 20: 1785-1796.
50. Meng W, Dong Y, Liu J, Wang Z, Zhong X, et al. (2009) A clinical evaluation of amlexanox oral adhesive pellicles in the treatment of recurrent aphthous stomatitis and comparison with amlexanox oral tablets: a randomized, placebo controlled, blinded, multicenter clinical trial. *Trials* 10: 30.
51. Saijo T, Kuriki H, Ashida Y, Makino H, Maki Y (1985) Mechanism of the action of amoxanox (AA-673), an orally active antiallergic agent. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 78: 43-50.

52. Saijo T, Makino H, Tamura S, Kuriki H, Ashida Y, et al. (1986) The antiallergic agent amoxanox suppresses SRS-A generation by inhibiting lipoxygenase. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 79: 231-237.
53. Saijo T, Kuriki H, Ashida Y, Makino H, Maki Y (1985) Inhibition by amoxanox (AA-673) of the immunologically, leukotriene D<sub>4</sub>- or platelet-activating factor-stimulated bronchoconstriction in guinea pigs and rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 77: 315-321.
54. Sakakibara H (1988) *Japanese journal of clinical and experimental medicine* 65: 2960-2966.

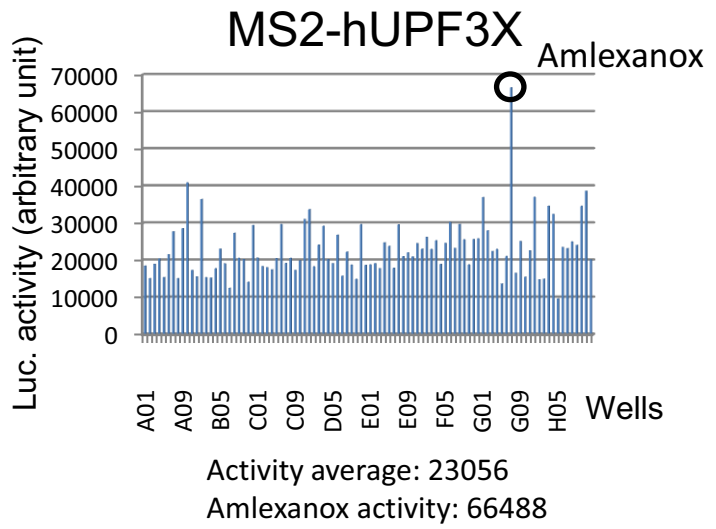
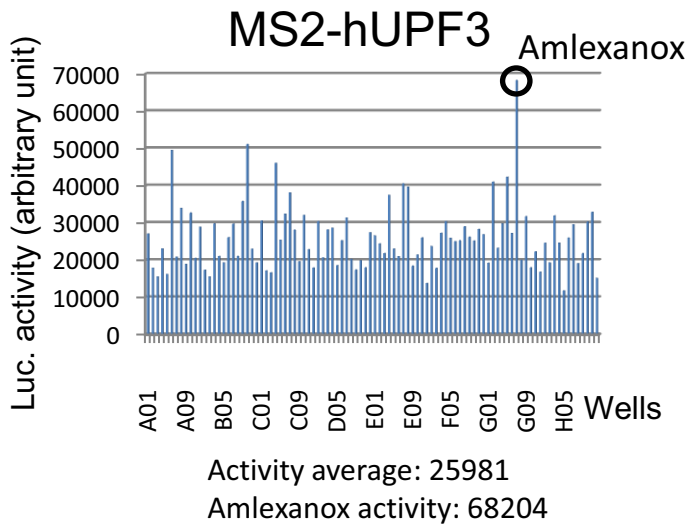
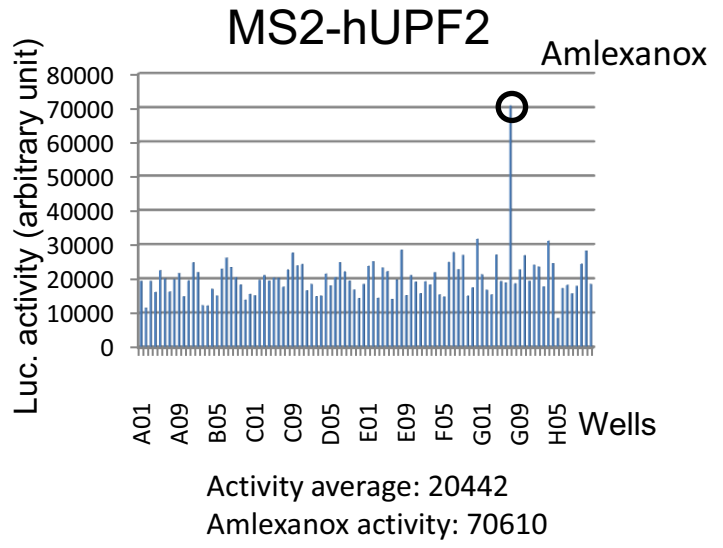
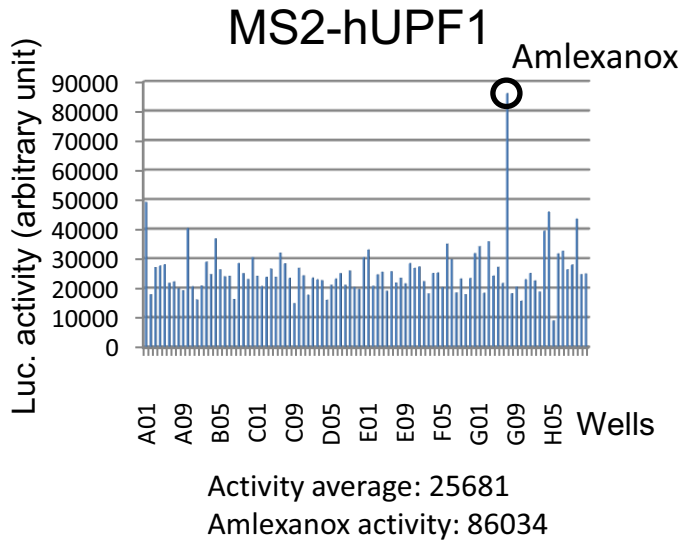
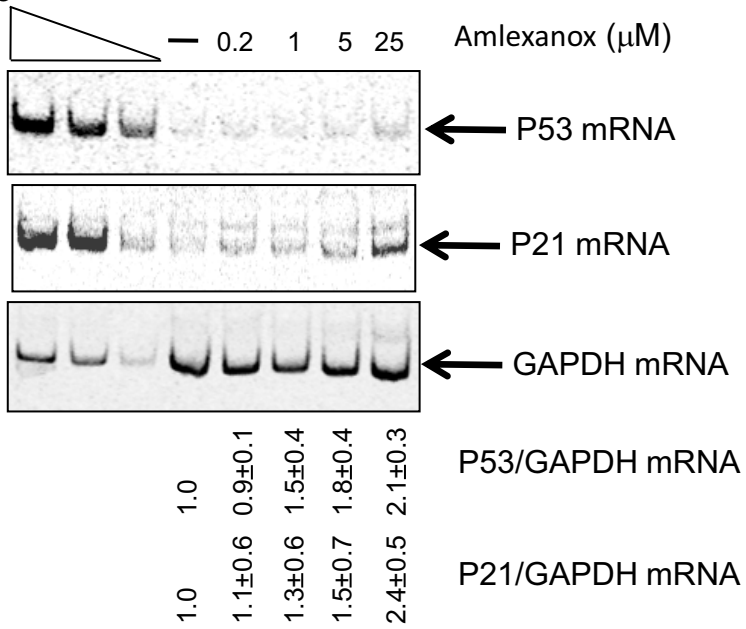
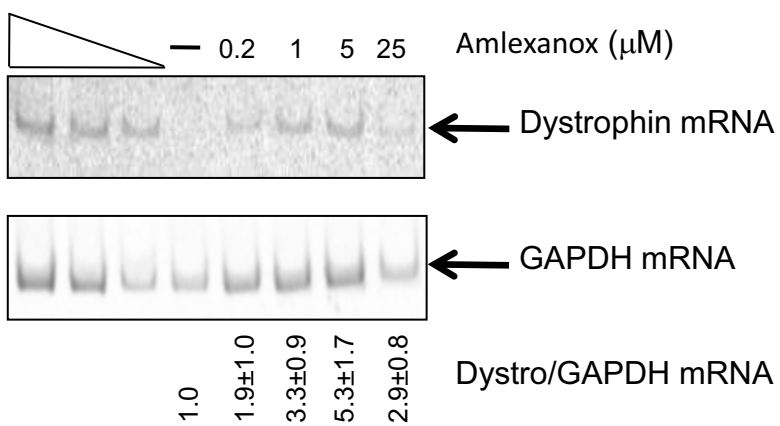


Figure 1

A. Calu-6



B. DMD



C. 6CFSMEo-

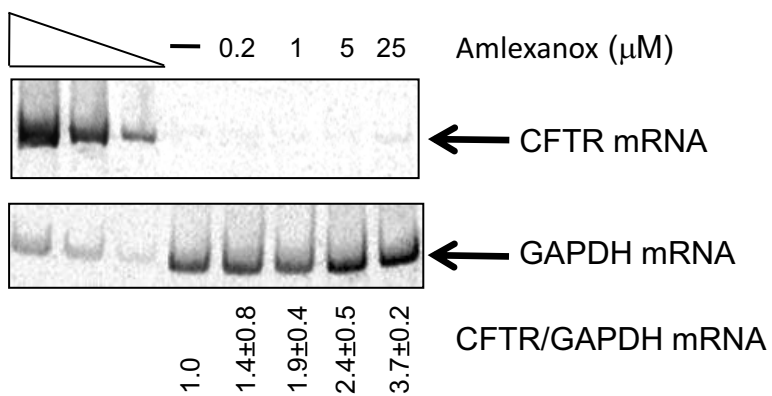


Figure 2

A

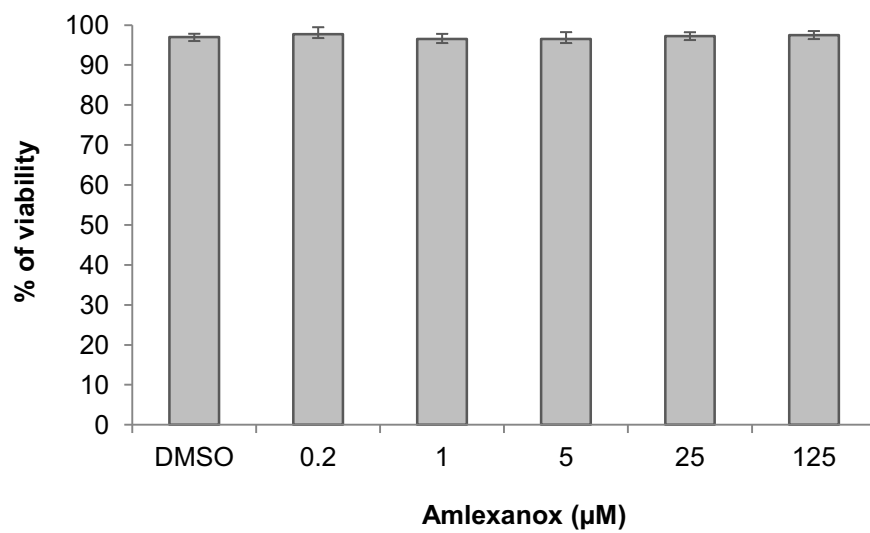


Figure 3A

**B**

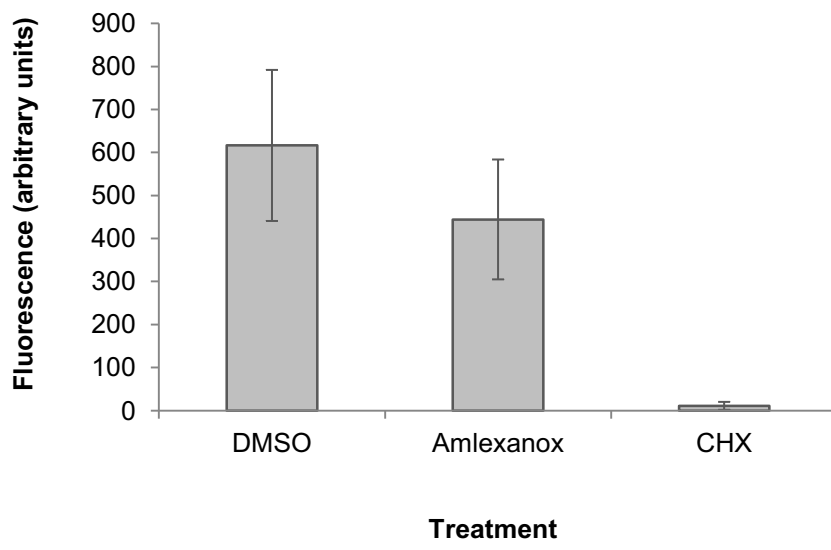


Figure 3B

C

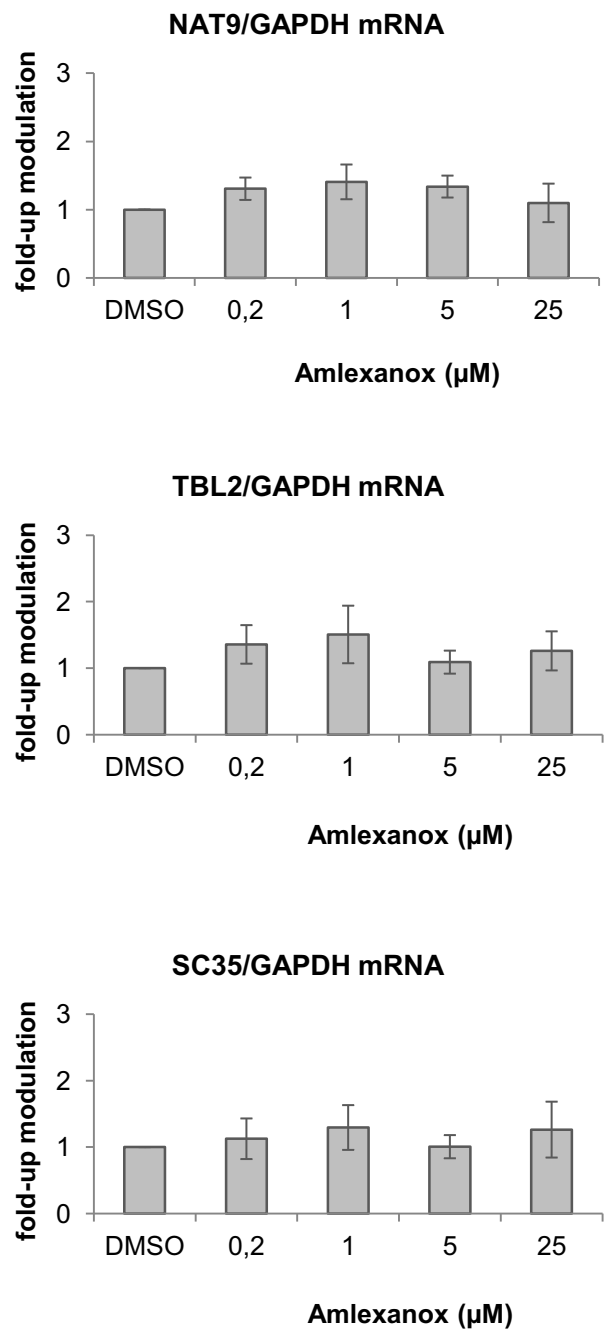


Figure 3C

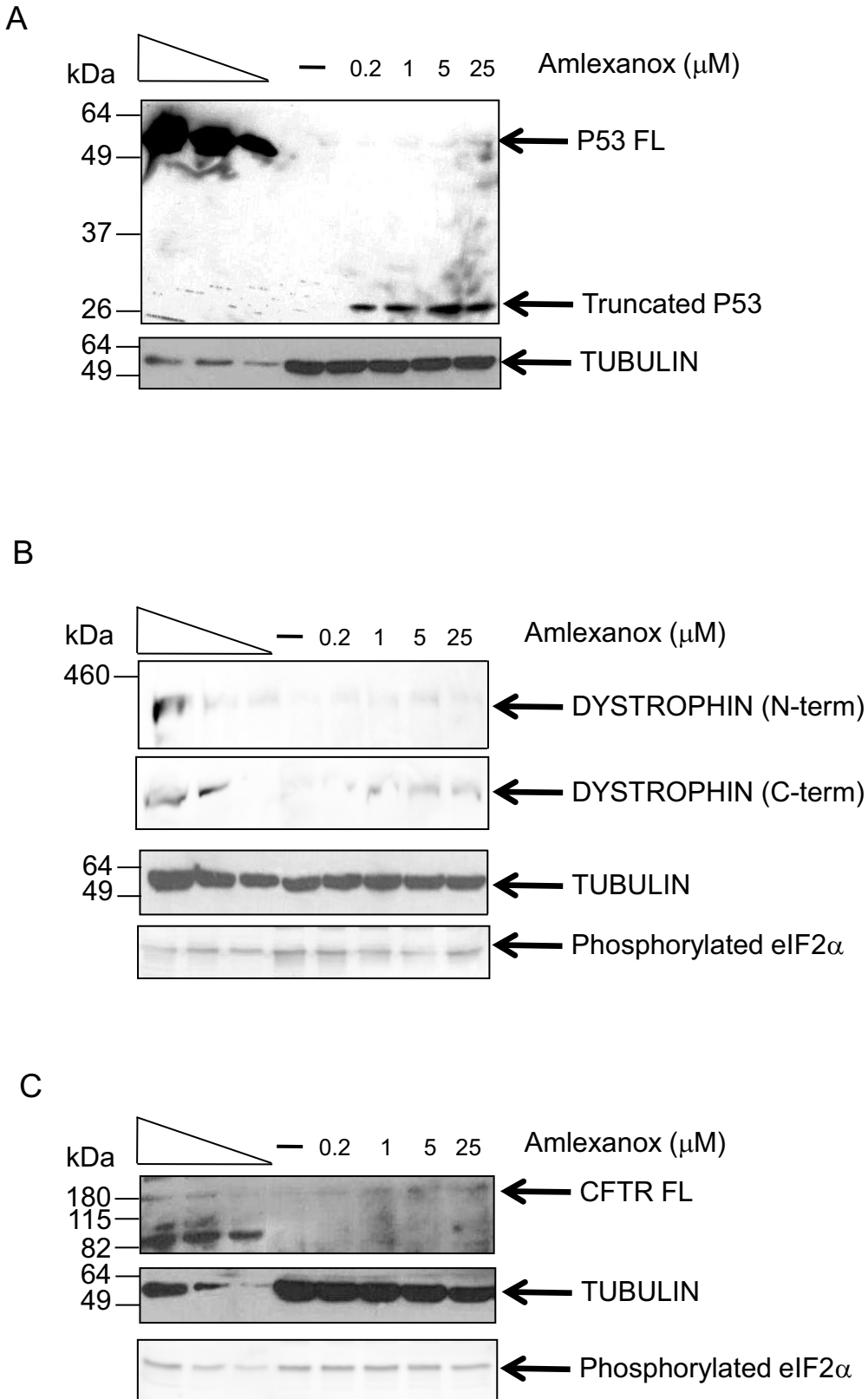
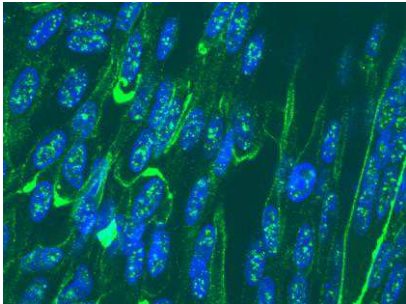


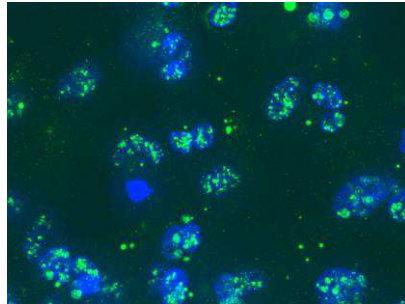
Figure 4



Dystrophin gene WT  
treatment -



PTC  
DMSO



PTC  
Amlexanox

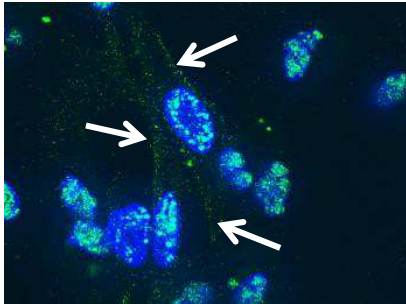


Figure 5

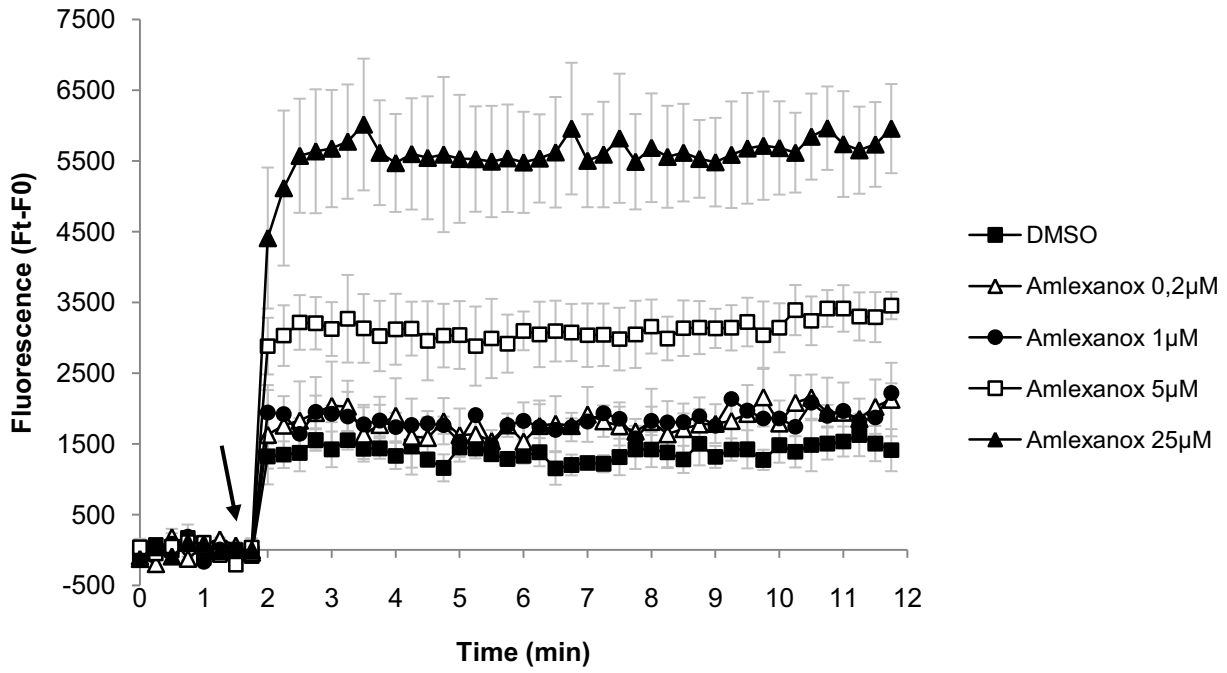


Figure 6

A

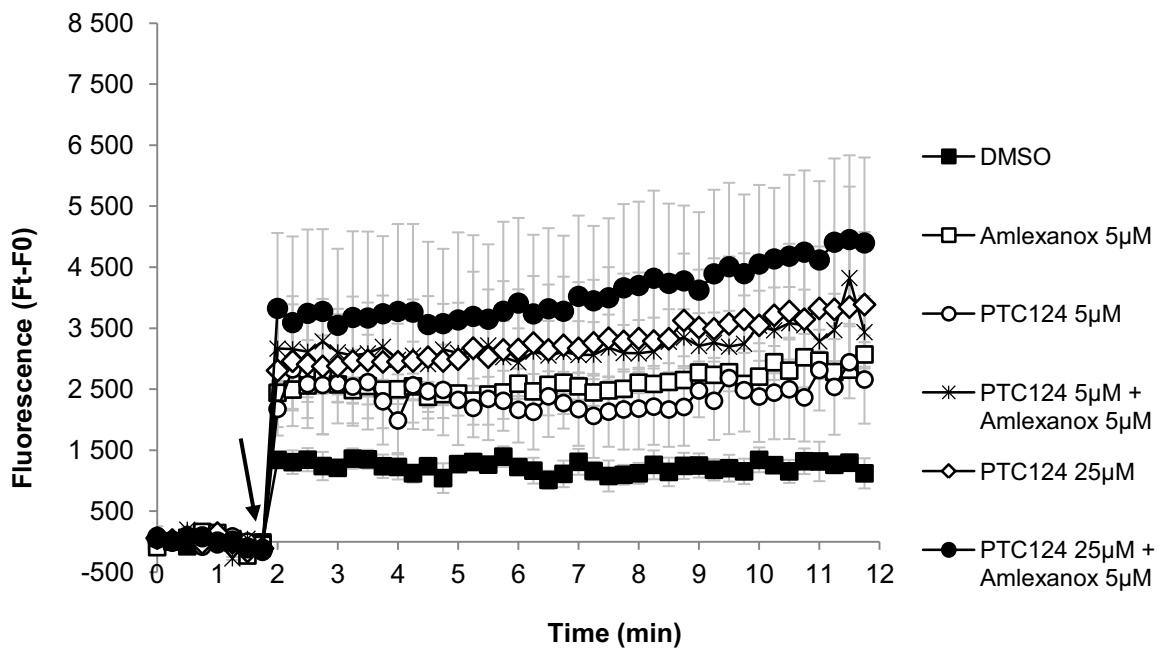
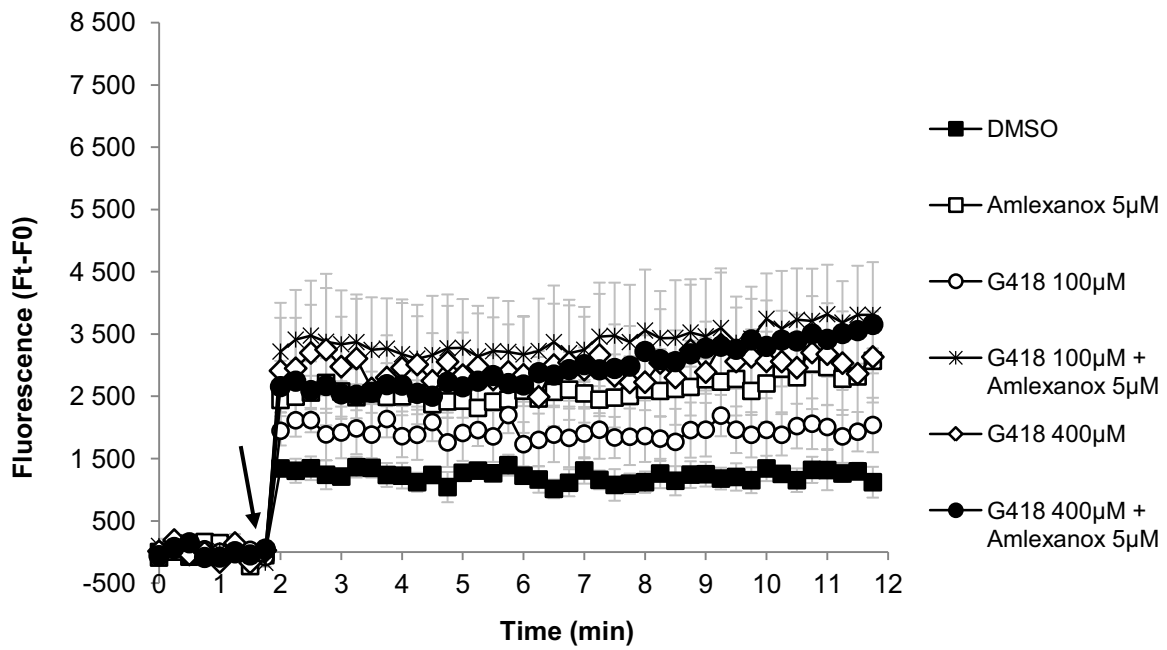
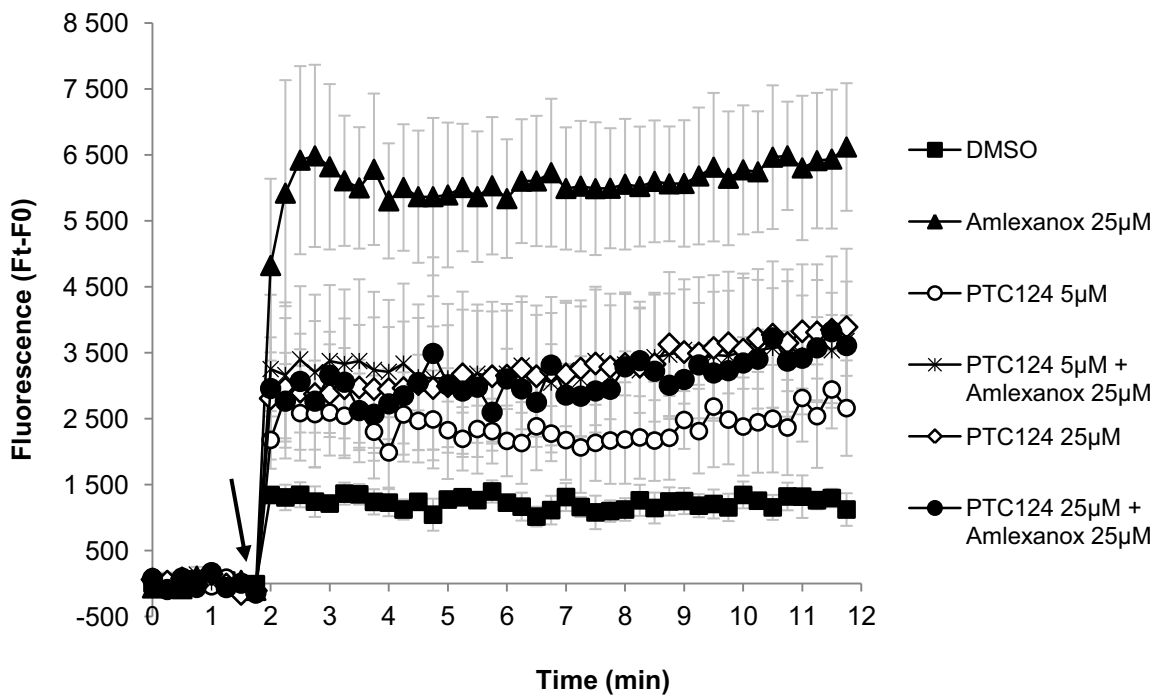
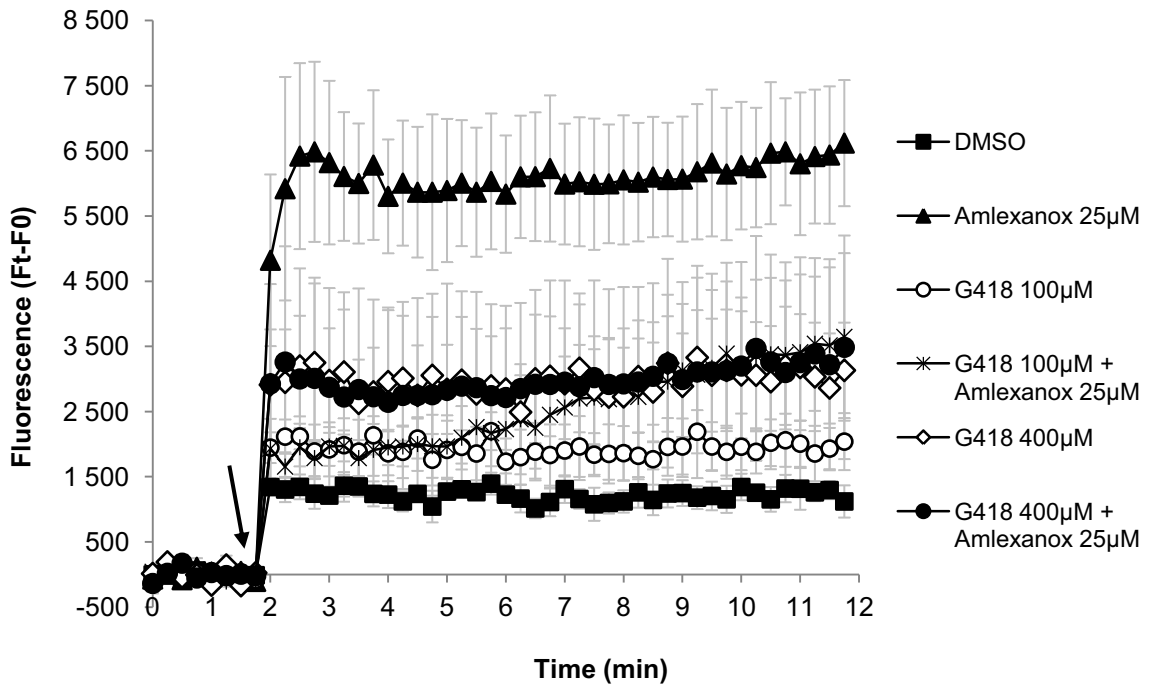


Figure 7A

**B****Figure 7B**

## 1.2. Principe du criblage

Les travaux de Lykke-Andersen et collaborateurs ont permis de montrer que la fixation dirigée de l'une des protéines hUPF en aval du codon stop physiologique de l'ARNm  $\beta$ -globine a pour effet la reconnaissance de ce codon stop comme un PTC et la dégradation de l'ARNm par NMD (Lykke-Andersen et al. 2000). En nous basant sur cette approche, nous avons construit des lignées cellulaires qui expriment d'une part, un ARNm Firefly luciférase (Fluc) qui porte dans sa partie 3'UTR des séquences pour la fixation de la protéine MS2, et d'autre part, l'une des quatre protéines hUPF fusionnées à la protéine MS2. De cette façon les protéines hUPF-MS2 se fixent de manière dirigée dans la partie 3'UTR de l'ARNm de la luciférase et induisent sa dégradation. Pour le criblage, chaque lignée cellulaire est cultivée en plaques de 96 puits et incubée avec les composés chimiques à tester. Après une vingtaine d'heures d'incubation, le substrat de la luciférase est ajouté et l'activité luciférase est mesurée au moyen d'un luminomètre. Si les cellules se trouvent en présence d'une molécule capable de bloquer le NMD, l'ARNm luciférase est stabilisé et une activité luciférase supérieure au bruit de fond peut alors être détectée au luminomètre. (Figure 27).

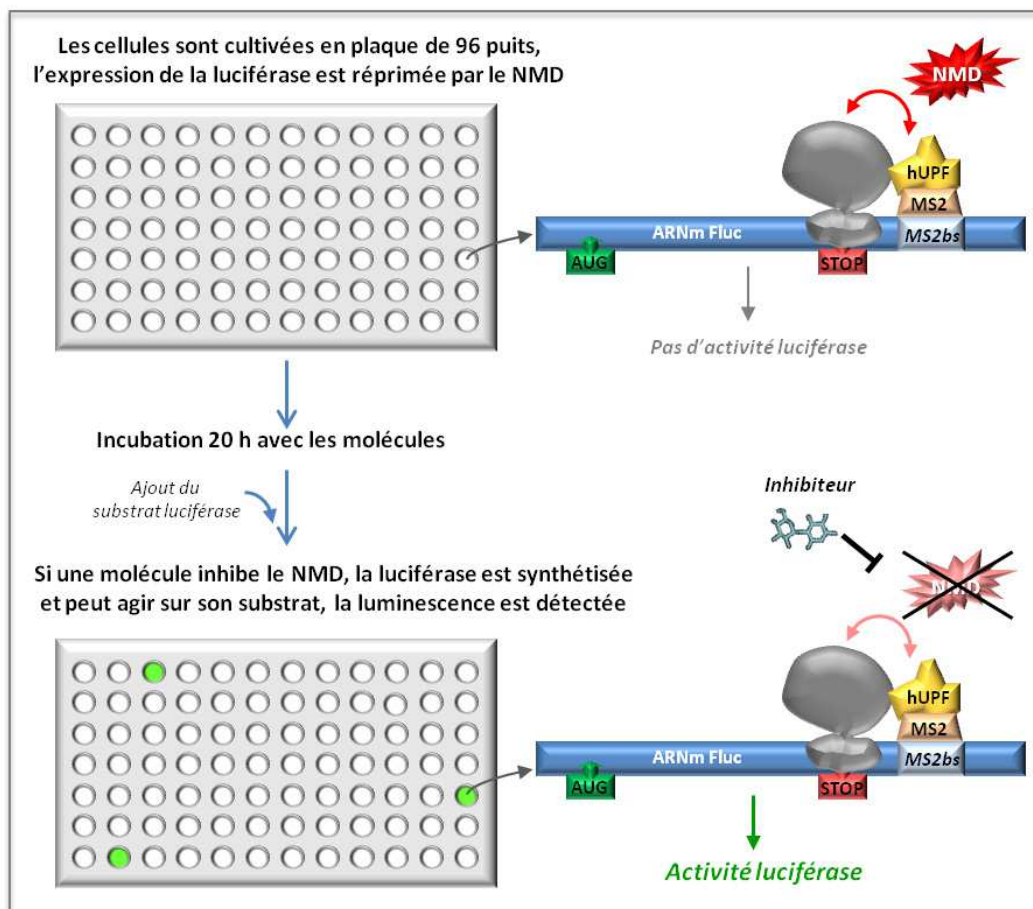


Figure 27. Principe du criblage permettant d'identifier des inhibiteurs du NMD.

### 1.1. Identification de l'amlexanox comme un nouvel inhibiteur du NMD

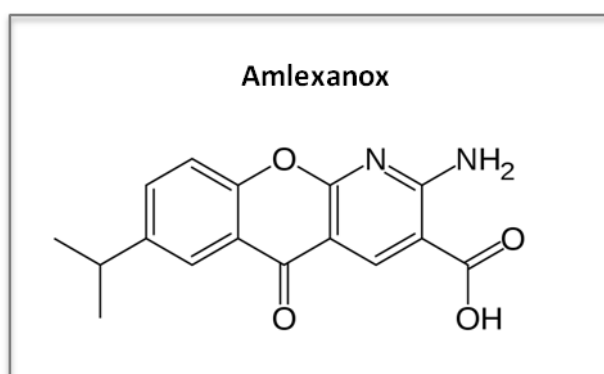
Dans les cellules incubées avec la molécule amlexanox, nous avons observé une activité luciférase significativement supérieure au bruit de fond, suggérant que cette molécule pouvait être un candidat pour l'inhibition du NMD. Le rapport entre l'activité luciférase en présence d'amlexanox et le bruit de fond moyen était très similaire entre les quatre lignées cellulaires (Figure 1 de l'article), avec une moyenne de 3 fois d'augmentation dans le signal luciférase mesuré.

L'inhibition du NMD par l'amlexanox dans un contexte physiologique, a été mesurée en faisant des courbes de dose-réponse sur des lignées cellulaires de cancer, de DMD et de mucoviscidose porteuses des mutations non-sens sur les gènes codant pour les protéines p53, dystrophine et CFTR respectivement. Les cellules de cancer et de DMD sont homozygotes pour la mutation non-sens. Les cellules de mucoviscidose sont hétérozygotes pour la mutation non-sens mais il n'y a pas d'expression à partir de l'autre allèle (qui est aussi muté puisqu'il présente une délétion) (da Paula et al. 2005). La stabilisation maximale des ARNm non-sens de CFTR et p53 a été de 3.7 fois et 2.1 fois respectivement, à une concentration de 25  $\mu$ M d'amlexanox (Figure 2A et 2B de l'article). Dans les cellules musculaires DMD, la stabilisation maximale des ARNm non-sens dystrophine a été de 5.3 fois à une concentration de 5  $\mu$ M d'amlexanox (Figure 2C de l'article). Ces résultats confirment que la molécule identifiée par le criblage est un inhibiteur du NMD. Il nous est par contre impossible de déterminer un pourcentage d'inhibition du NMD par l'amlexanox. En effet, nous voyons tout d'abord que l'efficacité d'inhibition est différente entre les trois modèles que nous avons testés. Ensuite, pour pouvoir déterminer un pourcentage d'inhibition, il nous faudrait pouvoir comparer les niveaux d'ARNm porteurs du PTC avec les niveaux des mêmes ARNm sauvages. Sachant que l'expression d'un gène varie d'un individu à un autre (Storey et al. 2007), même si nous disposions d'une lignée cellulaire de même type que nos modèles de maladies génétiques, nous ne pourrions pas les comparer.

### 1.2. L'amlexanox

La molécule amlexanox (2-amino-7-isopropyl-5-oxo-5H-chromeno[2,3-b]pyridine-3-carboxylic acid) (Figure 28) constitue le principe actif de certains médicaments utilisés comme antiallergiques et anti-inflammatoires. Bien que la structure de la molécule puisse ressembler à celle de certains agents intercalants de l'ADN, les tests précliniques ont montré que l'amlexanox n'est pas mutagène ou clastogène. Ces études ont montré aussi que l'amlexanox n'est pas toxique, n'affecte pas la fertilité et n'induit pas la tumorigénèse (dossier

disponible sur [www.fda.gov](http://www.fda.gov)). Les effets secondaires rapportés sont rares, seul <1% des patients peut expérimenter des troubles digestifs (nausées, diarrhée, vomissements).



**Figure 28. Structure de l'amlexanox.**

L'amlexanox est commercialisé au Japon depuis 1987 sous forme de tablettes pour le traitement de l'asthme ou de solution nasale pour le traitement de la rhinite allergique (Softal®, Takeda Pharmaceuticals). Les réactions d'hypersensibilité immédiate ou allergies surviennent lorsque la stimulation par un allergène induit l'activation de cellules spécialisées du système immunitaire, les mastocytes, qui libèrent des médiateurs inflammatoires tels que les histamines (processus de dégranulation). De plus, les mastocytes activés synthétisent des leucotriènes dont la surproduction est à l'origine de la broncho-constriction qui provoque les crises d'asthme (Robbie-Ryan and Brown 2002). Les tests précliniques de l'amlexanox *in vitro* ont montré que son effet bénéfique dans le traitement de l'asthme et des allergies est dû vraisemblablement à la capacité de la molécule à inhiber la dégranulation des mastocytes et aussi à inhiber la lipoxygénase qui est l'enzyme responsable de la synthèse des leucotriènes (Saijo et al. 1985b; Saijo et al. 1986). En accord avec ces observations, les tests *in vivo* ont montré que l'amlexanox est capable de supprimer les réactions d'hypersensibilité (Saijo et al. 1985a).

L'amlexanox est aussi commercialisé aux États-Unis depuis 1996 sous forme d'une crème pour le traitement local des aphtes (Aphthasol®, Acces Pharmaceuticals). Il est le seul médicament approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) pour le traitement des aphtes à répétition. Toutefois, le mécanisme par lequel l'amlexanox accélère la guérison des lésions buccales n'a pas encore été établi (Acces Pharmaceuticals).

Des expériences de chromatographie d'affinité en utilisant des lysats de cerveau bovin ont permis d'identifier certaines protéines sur lesquelles l'amlexanox se fixe avec une haute affinité. Parmi ces protéines, on retrouve notamment des membres de la famille des protéines

S100, telles que S100A1, S100A12 et S100A13 (Shishibori et al. 1999; Okada et al. 2002). Les protéines S100 constituent une famille diverse d'une vingtaine de protéines qui ont comme caractéristique commune leur capacité à fixer le calcium, mais qui sont impliquées dans des fonctions très variées telles que la transduction des signaux, la différenciation cellulaire, la réponse inflammatoire, la régulation de la prolifération et l'assemblage du cytosquelette, entre autres (Kraemer et al. 2008). Le rôle exact de l'interaction de l'amlexanox avec ces protéines n'est pas encore bien connu, cependant l'observation que l'interaction de l'amlexanox avec S100A13 inhibe la libération du facteur FGF1 (*acidic fibroblast growth factor*) impliqué dans l'inflammation, suggère que ces protéines peuvent être des médiateurs de l'effet anti-inflammatoire de l'amlexanox (Mouta Carreira et al. 1998). Il n'a cependant jamais été fait de relation entre les effets thérapeutiques de l'amlexanox et une action éventuelle de ce composé sur le NMD.



## 2. Effet de l'altération des filaments d'actine sur le NMD

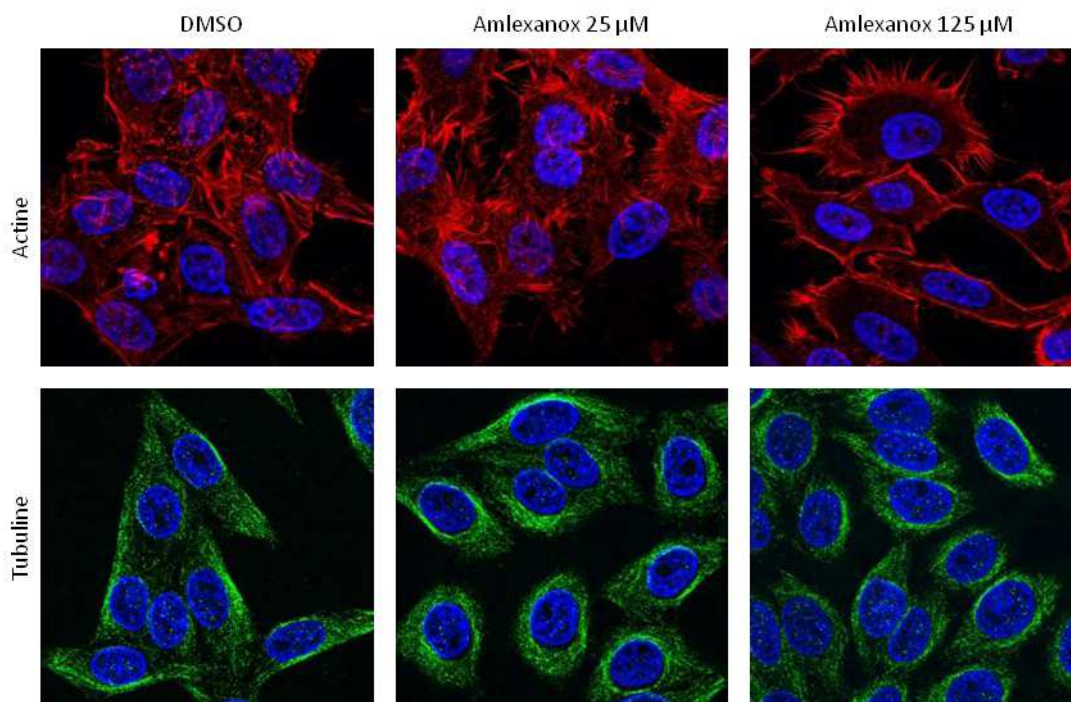
### 2.1. Introduction

Dans les cellules eucaryotes, l'actine existe sous forme monomérique (actine globulaire ou actine G) ou assemblée dans des polymères (filaments d'actine ou actine F). Les filaments d'actine s'associent à diverses protéines pour former des faisceaux d'actine. Ceux-ci forment à leur tour des réseaux dynamiques qui dans l'ensemble constituent le cytosquelette d'actine (dos Remedios et al. 2003).

Landriscina et collaborateurs ont montré que le traitement de différents types cellulaires avec de l'amlexanox affecte la fonction de la protéine cortactine, une protéine d'échafaudage qui interagit avec diverses protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine et qui intervient dans l'assemblage des faisceaux d'actine (Landriscina et al. 2000). Comme conséquence, le traitement avec amlexanox à des concentrations supérieures à 375  $\mu\text{M}$  induit le désassemblage des faisceaux d'actine (ou fibres de stress) dans plusieurs types cellulaires : les cellules humaines du cordon ombilical HUVEC, les fibroblastes de souris NIH/3T3 et les myoblastes de rat L6, entre autres (Landriscina et al. 2000). Les auteurs ont observé qu'en revanche, l'amlexanox n'affecte pas l'organisation des microtubules ou des filaments intermédiaires, qui sont les autres composants du cytosquelette cellulaire dans les cellules eucaryotes (Landriscina et al. 2000). Au cours de nos expériences avec l'amlexanox nous avons observé que le traitement des cellules avec des concentrations supérieures à 125  $\mu\text{M}$  induisait des changements dans la morphologie cellulaire. Des analyses d'immunofluorescence nous ont permis de voir que, en accord avec les observations précédentes, le traitement à l'amlexanox avec de fortes doses affecte l'organisation des filaments d'actine, mais pas celle des microtubules *a priori* (Figure 29).

Nous nous sommes interrogés sur la possibilité que l'altération dans l'organisation des filaments d'actine puisse avoir un effet sur l'efficacité du NMD. Une des façons les plus rapides d'altérer l'organisation de l'actine consiste en l'utilisation de toxines capables de se lier à l'actine en affectant sa polymérisation ou sa dépolymérisation (Allingham et al. 2006). Les filaments d'actine sont des structures polarisées : ils présentent une extrémité positive ou bout barbé par lequel se fait préférentiellement la polymérisation, et une extrémité négative ou bout pointu. La cytochalasine D est un composé isolé du champignon *Helminthosporium* qui se lie au bout barbé en empêchant l'ajout de nouveaux monomères d'actine G (Cooper

1987). La latrunculine A est un macrolide isolé de l'éponge marine *Latrunculia magnifica* qui se lie aux monomères d'actine G, en inhibant leur polymérisation et en stimulant leur dépolymérisation. (Spector et al. 1983; Spector et al. 1989). Le jasplakinolide est un peptide cyclique isolé de l'éponge marine *Jaspis johnstoni* qui stabilise les filaments d'actine et induit leur agrégation (Bubb et al. 1994; Bubb et al. 2000). Nous avons donc mesuré l'effet du traitement avec ces composés sur le NMD.



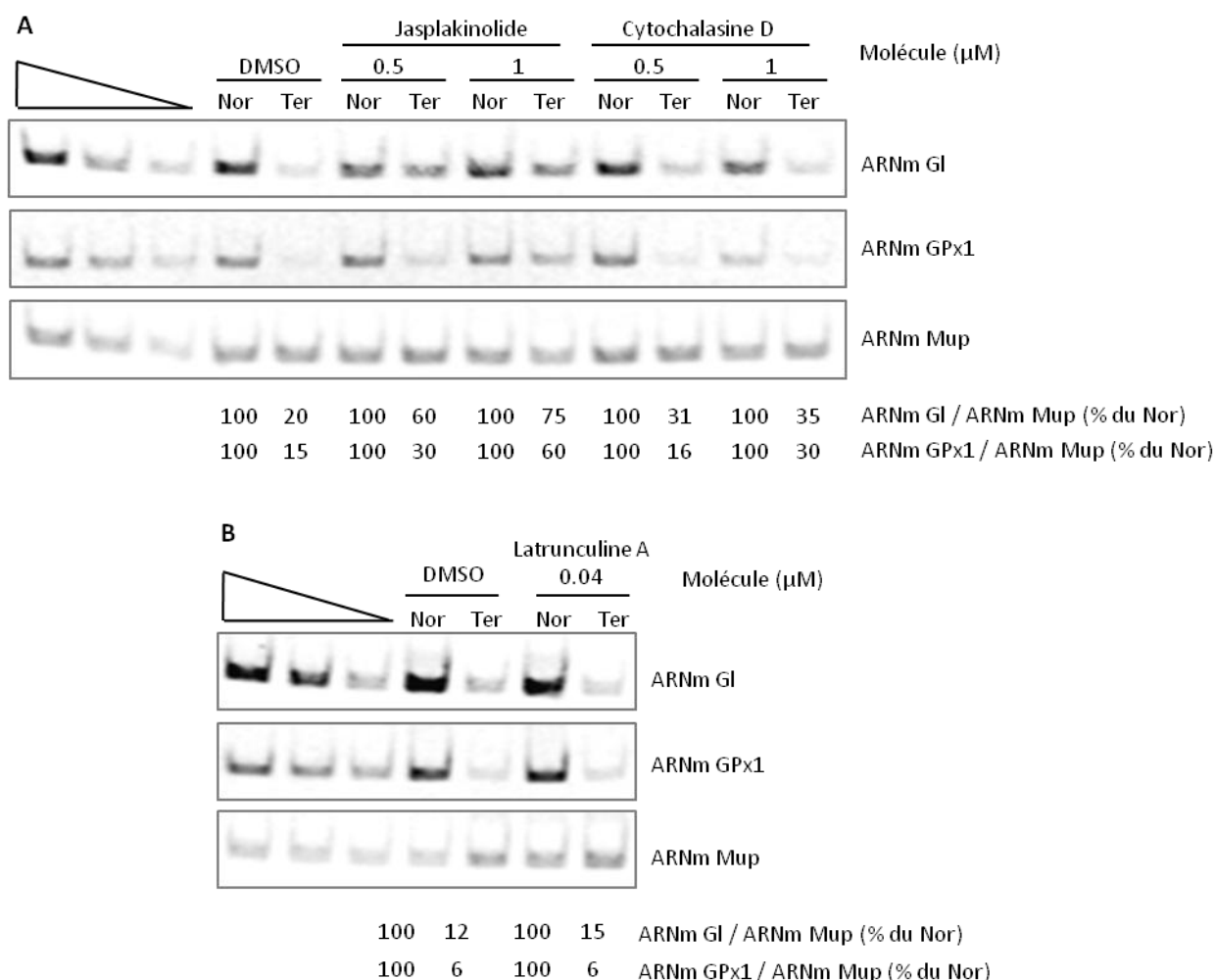
**Figure 29. Effet de l'amlexanox sur le cytosquelette.**

Les cellules ont été traitées pendant 20h avec les doses d'amlexanox indiquées ou avec du DMSO comme contrôle. Bleu : coloration Hoechst, rouge : marquage de l'actine avec la phalloïdine-Alexa568, vert : marquage de la tubuline avec un anticorps couplé à l'Alexa488.

## 2.2. Résultats

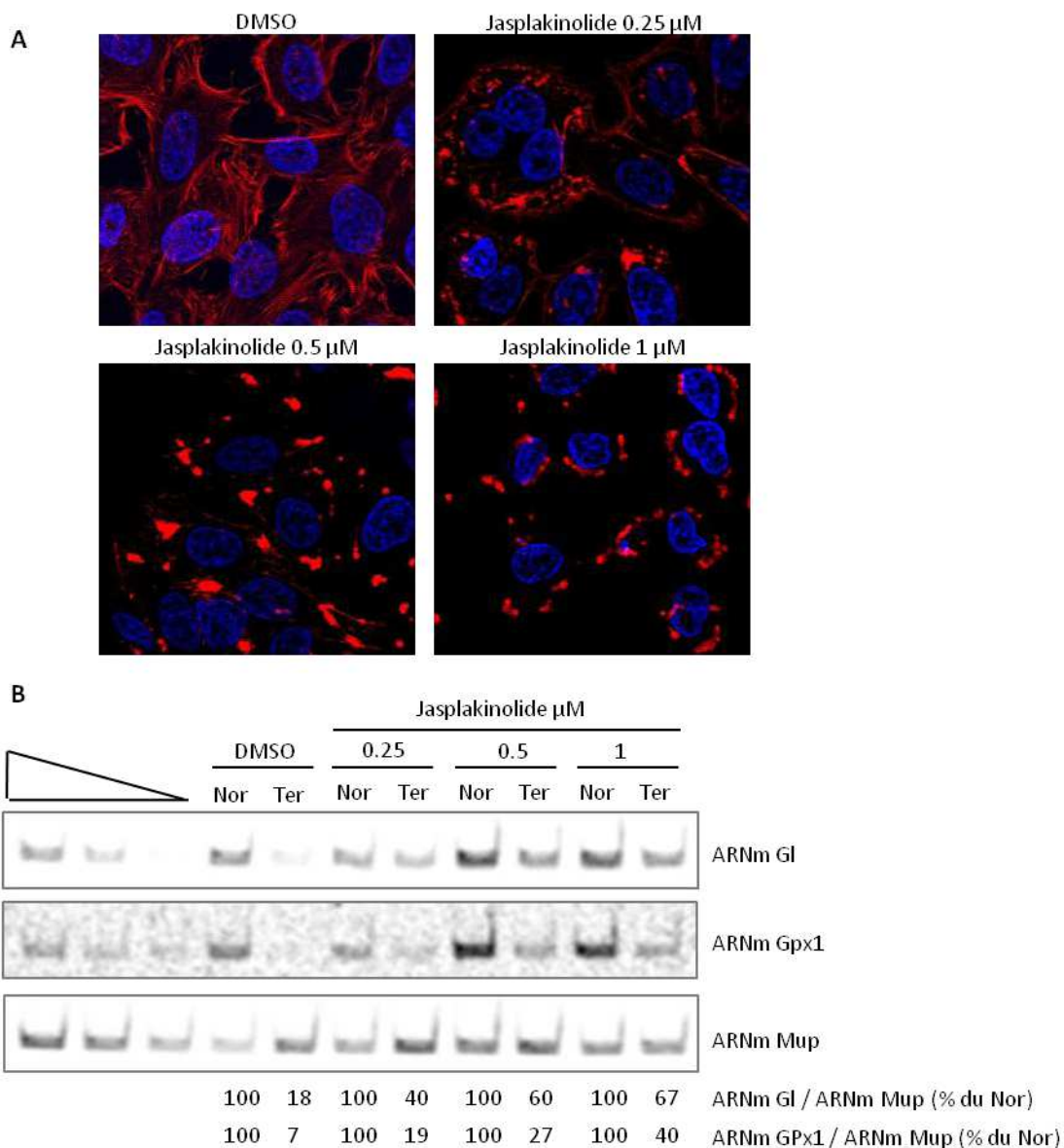
Afin d'établir l'effet de la déstabilisation des filaments d'actine sur des ARNm soumis au NMD, nous avons transfecté de façon transitoire des cellules HeLa avec deux constructions rapporteurs du NMD qui sont les constructions  $\beta$ -globine (G1) et glutathion peroxydase (GPx1) avec ou sans un PTC (Ter et Nor respectivement) et avec la construction Mup qui n'est pas affectée par le NMD afin de normaliser les niveaux d'expression des ARNm. Les ARNm de G1 et GPx1 sont soumis au NMD associé au noyau et au NMD cytoplasmique respectivement. Les cellules ont été traitées avec 0.5 et 1  $\mu$ M de latrunculine A, cytochalasine D ou jasplakinolide pendant 2 heures.

Le traitement avec jasplakinolide induit une stabilisation d'environ 4 fois des ARNm Ter Gl et GPx1 par rapport aux Nor (Figure 30A). La cytochalasine D a un effet plus modeste, en stabilisant moins de 2 fois les deux rapporteurs (Figure 30A). Il ne semble pas y avoir une différence importante entre l'inhibition sur le NMD associé au noyau (Gl) et le NMD cytoplasmique (GPx1). Le traitement avec la latrunculine A induit rapidement le détachement des cellules et la mort cellulaire, raison pour laquelle ces cellules n'ont pas été analysées. Nous avons alors testé des doses de latrunculine A plus faibles (0.04 et 0.2 µM). Seulement à 0.04 µM les cellules ont survécu mais aucun effet sur le NMD n'a été observé (Figure 30B). Puisque le traitement avec le jasplakinolide montre la stabilisation la plus importante des ARNm rapporteurs Gl et GPx1 lorsqu'ils sont soumis au NMD, nous avons choisi de continuer nos expériences avec cette molécule.



**Figure 30. Effet des molécules qui altèrent les filaments d'actine sur l'efficacité du NMD.** Les cellules HeLa ont été incubées pendant 2h avec DMSO ou avec les concentrations indiquées de (A) jasplakinolide et cytochalasine D ou (B) latrunculine A. Les niveaux d'expression des ARNm Gl et GPx1 ont été normalisés par rapport à l'expression de l'ARNm Mup.

Afin de savoir s'il était possible de faire un lien entre l'effet du traitement avec jasplakinolide sur la stabilisation des ARNm soumis au NMD et des changements dans l'organisation des filaments d'actine, nous avons effectué un marquage sur des cellules traitées avec des doses croissantes de jasplakinolide au moyen de la phalloïdine couplée au fluorophore Alexa568 (Figure 31A). La phalloïdine est une toxine isolée du champignon *Amanita phalloides* qui lie les filaments d'actine. Elle est couramment utilisée couplée à des fluorophores pour marquer les filaments d'actine sur des cellules fixées (Allingham et al. 2006).

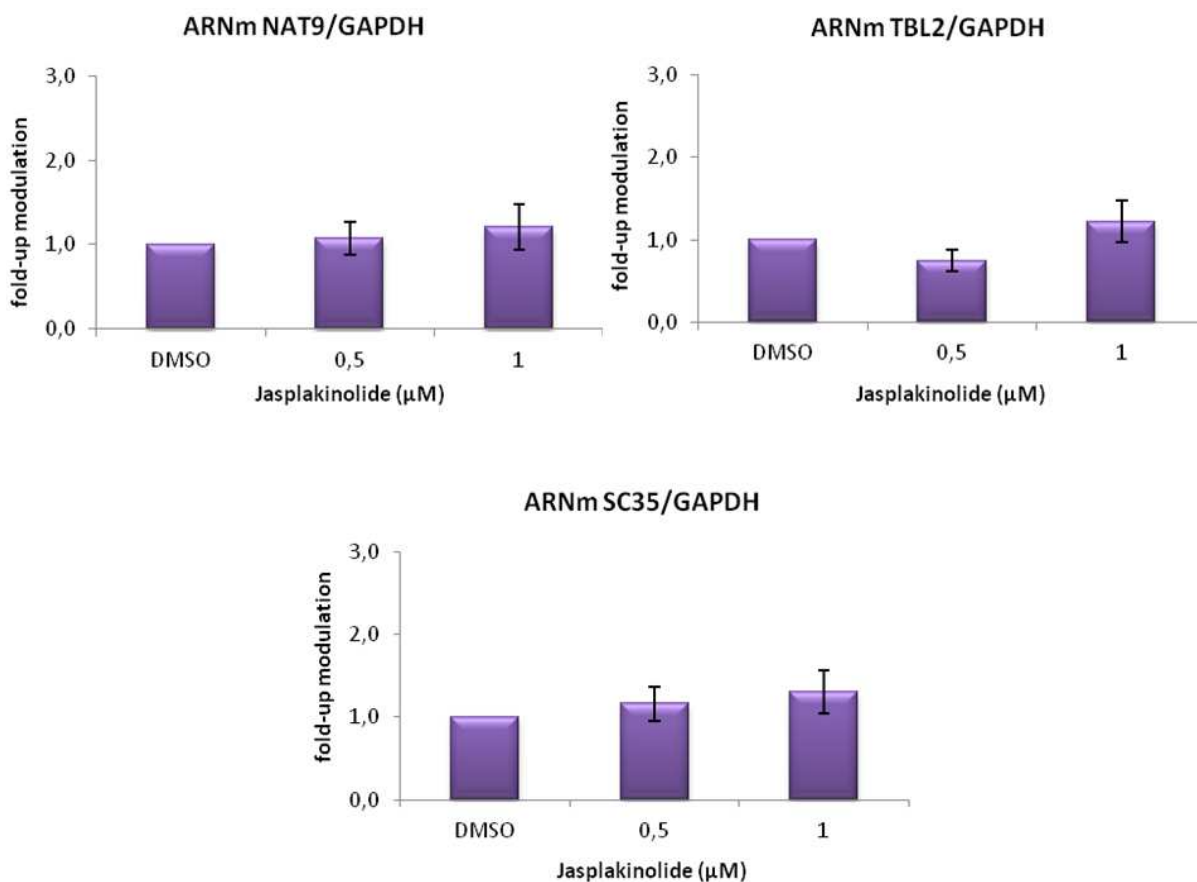


**Figure 31. Effet du jasplakinolide sur les filaments d'actine et l'efficacité du NMD.**

Les cellules HeLa ont été incubées pendant 2h avec DMSO ou des concentrations croissantes de jasplakinolide (A) Marquage des filaments d'actine avec la phalloïdine couplée à l'Alexa568 (B) Amplification par PCR radioactive des ARNm Gl, GPx1 et Mup pour évaluer l'inhibition du NMD.

En accord avec ce qui est rapporté dans la littérature (Lazaro-Diequez et al. 2008), nous avons observé que le traitement avec le jasplakinolide induit progressivement la désorganisation des fibres de stress d'actine et provoque la concentration de l'actine dans des agrégats amorphes (Figure 31A). De façon intéressante, nous avons observé que plus le cytosquelette d'actine est altéré, plus l'inhibition du NMD est importante (Figure 31B). Ceci suggère que la désorganisation des filaments d'actine pourrait affecter le NMD et induire la stabilisation des ARNm Gl et GPx1 porteurs de PTC.

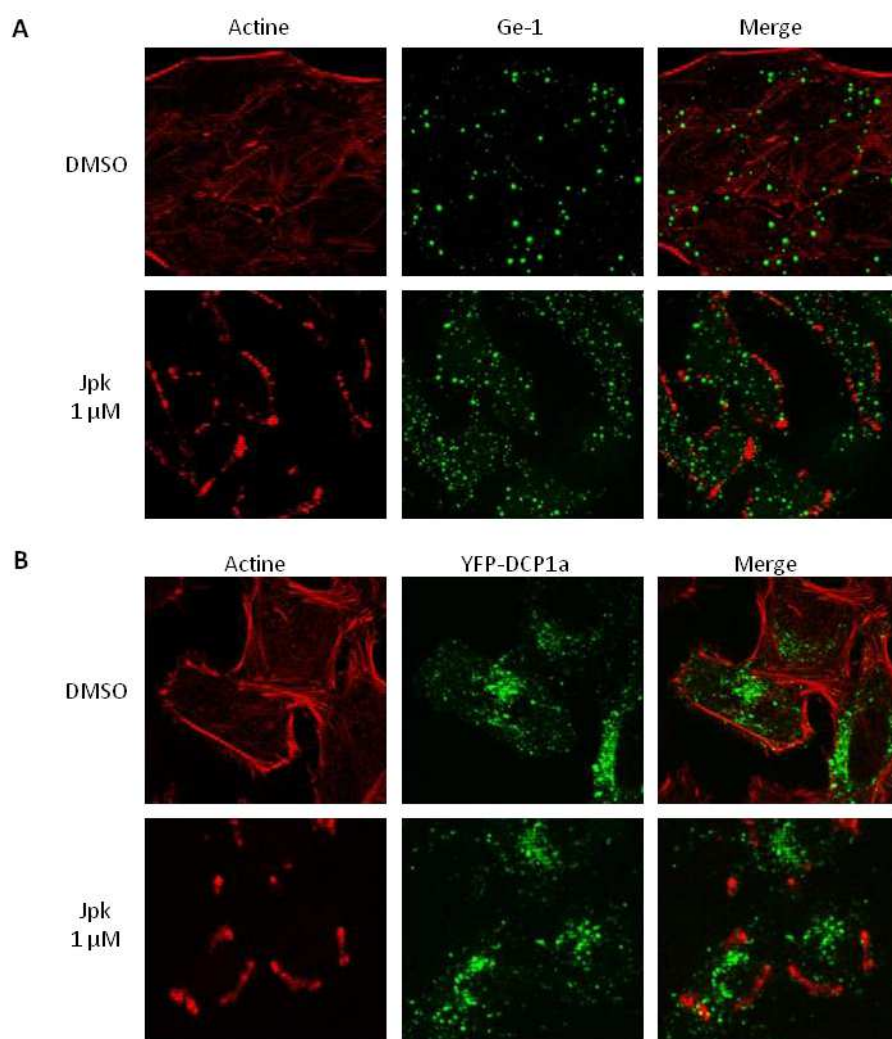
Nous avons ensuite cherché à établir si l'inhibition du NMD que nous avons observée sur les ARNm exogènes Gl Ter et GPx1 Ter pouvait affecter aussi le NMD sur des substrats endogènes. Pour cela nous avons mesuré le niveau d'expression des ARNm TBL2, SC35 et NAT9 qui ont été précédemment montrés comme étant des transcrits cibles du NMD (Sureau et al. 2001; Viegas et al. 2007). L'analyse par PCR radioactive montre que l'expression de ces gènes n'est pas affectée significativement par l'inhibition du NMD induite avec le jasplakinolide, comme nous l'avons observé aussi avec l'amlexanox (Figure 32 et Figure 3C de l'article 1).



**Figure 32. Effet du jasplakinolide sur des substrats endogènes du NMD.**

Les mêmes échantillons d'ADNc analysés dans les figures 30 et 31 ont été amplifiés par PCR radioactive avec des amorces spécifiques de NAT9, TBL2 et SC35.

Il a été montré que des altérations dans le cytosquelette peuvent affecter les P-bodies dans les cellules de levure et de mammifère (Sweet et al. 2007; Aizer et al. 2008; Carbonaro et al. 2011). En particulier, le désassemblage des microtubules avec de composés chimiques comme le taxol ou le nocodazol, a pour effet d'augmenter le nombre de P-bodies (Sweet et al. 2007; Aizer et al. 2008; Carbonaro et al. 2011). Cet effet n'a pas été observé lorsque les filaments d'actine sont déstabilisés par traitement avec la cytochalasine D (Carbonaro et al. 2011). Dans le but de déterminer quel effet pourrait avoir le traitement avec le jasplakinolide sur les P-bodies, nous avons effectué des expériences d'immunofluorescence sur des cellules traitées ou non avec la molécule (Figure 33).

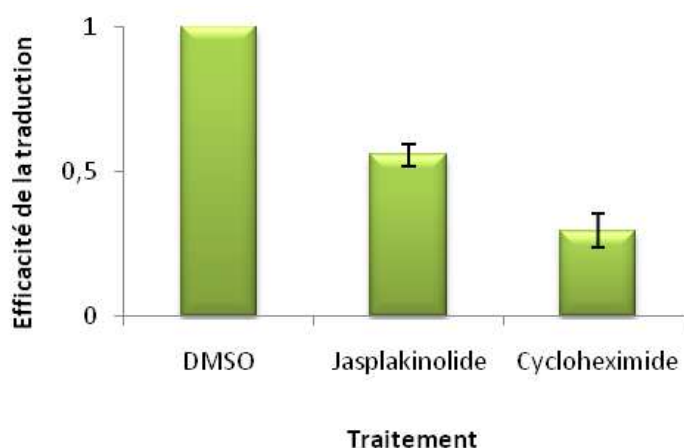


**Figure 33. Effet du traitement avec jasplakinolide sur les P-bodies.**

Les cellules HeLa ont été incubées pendant 2h avec du DMSO ou 1 μM jasplakinolide (Jpk). L'actine est marquée avec la phalloïdine-Alexa568 (rouge) et les P-bodies (vert) sont marqués avec un anticorps anti Ge-1 (A) ou observés directement après transfection de la construction YFP-DCP1a (B).

Nous avons observé que les P-bodies contenant Ge-1 diminuent en taille mais augmentent en nombre suite au traitement avec jasplakinolide. En revanche, le traitement ne semble pas affecter les P-bodies qui contiennent DCP1a (Figure 33). Il a été montré précédemment que les P-bodies pouvaient avoir une composition hétérogène (Durand et al. 2007). Nos résultats préliminaires suggèrent que la molécule peut affecter de façon différente les P-bodies contenant Ge-1 ou DCP1a.

Certains déstabilisateurs des filaments d'actine, comme la cytochalasine D, lorsqu'ils sont utilisés à des fortes doses peuvent inhiber la traduction (50% d'inhibition à 20 $\mu$ M) (Ornelles et al. 1986). Puisque l'inhibition de la traduction peut inhiber de façon indirecte le NMD, nous avons évalué la possibilité que la stabilisation des ARNm non-sens que nous avons observée en présence de jasplakinolide soit une conséquence d'un effet d'inhibition de la traduction par la molécule. Nous avons donc cherché à établir l'effet du jasplakinolide sur la traduction, qui n'a pas encore été rapporté dans la littérature. Pour cela, nous avons transfecté des cellules HeLa avec une construction codant pour la protéine fluorescente YFP-Globine, puis nous avons traité les cellules avec du DMSO, 1 $\mu$ M de jasplakinolide ou 100 $\mu$ g/ml de cycloheximide qui est un inhibiteur connu de l'élongation de la traduction. La fluorescence de l'YFP, qui reflète l'efficacité de la traduction, a été mesurée au moyen d'un cytomètre (Figure 34).



**Figure 34. Mesure de l'efficacité de la traduction en présence de jasplakinolide.**

Les cellules HeLa ont été transfectées avec la construction YFP Globine et incubées avec DMSO, jasplakinolide ou cycloheximide pendant 4h avant de mesurer la fluorescence de l'YFP.

En prenant comme 100% l'efficacité de la traduction dans les cellules traitées avec du DMSO, le traitement avec cycloheximide conduit à une efficacité de traduction de seulement 30%, en accord avec sa propriété d'inhibiteur de l'élongation. En présence de jasplakinolide, l'efficacité de la traduction est de 60% ce qui suggère que le jasplakinolide inhibe au moins

partiellement, la traduction. Néanmoins il reste à établir si l'inhibition du NMD que nous observons dans les cellules traitées avec le jasplakinolide est uniquement due à la diminution de l'efficacité de la traduction observée en présence de cette molécule ou si d'autres mécanismes sont impliqués dans la stabilisation des transcrits non-sens en présence de la molécule.

### 2.3. Matériels et méthodes supplémentaires

#### *Culture cellulaire et traitement avec les molécules*

Les cellules HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM contenant 10% FBS (v/v) et un mélange de 1 U/ml pénicilline et 1 mg/ml de streptomycine, à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Des solutions stock de latrunculine A, cytochalasine D et jasplakinolide (Enzo Therapeutics) ont été préparés dans du DMSO à 1 mM. Les cellules ont été incubées avec les concentrations indiquées dans chaque expérience pendant 2 heures avant d'être récoltées pour analyse.

#### *Plasmides*

Le plasmide pSPO2-YFP-Gl-Nor code pour l'ARNm  $\beta$ -globine sauvage et le plasmide pSPO2-YFP-Gl-Ter code pour l'ARNm  $\beta$ -globine (Gl) avec un PTC (UAG) au codon 39. L'ARNm de la sélénoprotéine glutathion peroxydase 1 (GPx1) porte naturellement un codon UGA dans la position 46. Ce codon a été converti en UAA dans la construction pSPO2-YFP-GPx1-Ter et en UGC dans la construction pSPO2-YFP-GPx1-Nor. Le plasmide pIE-MUP qui code pour la protéine majeure urinaire de souris ne contient pas de PTC.

#### *Quantification de l'efficacité du NMD*

Les cellules HeLa ont été cultivées dans des boîtes de 6 cm. Elles ont été transfectées avec 0.5  $\mu$ g de pSPO2-Gl Nor ou Ter, 1  $\mu$ g de pSPO2-GPx1 Nor ou Ter et 1  $\mu$ g de pIE-Mup, au moyen du réactif de transfection TransIT-LT1 (Mirus) en suivant le protocole du fabricant. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec des drogues pendant 2 heures. Les cellules ont été récoltées et les ARNm extraits avec le réactif RNAzol (MRC). Deux microgrammes d'ARNm ont été utilisés pour effectuer une reverse-transcription avec la SuperScriptII Transcriptase (Life Technologies). Les ADNc ainsi obtenus ont été amplifiés par PCR radioactive en présence de dCTP(<sup>33</sup>P) (Perkin Elmer) avec les amorces : YFP Sens 5'-GGACGAGCTGTACAAGTATC (utilisée comme amorce sens pour Gl et GPx1), Gl anti-sens 5'-ACCACGAGCAGCCTGCCAGG ; GPx1 anti-sens 5'CTTGCCATTCTCCTGATGTCCG ; Mup Sens 5'-CTGATGGGGCTCTATG ; Mup anti-sens 5'-TCCTGGTGAGAAGTCTCC. Les produits



d'amplification on été quantifiés avec un Personal Molecular Imager et le logiciel de quantification QuantityOne (Bio-Rad).

#### *Immunofluorescence*

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles de verre de 12 mm de diamètre. Vingt-quatre heures après elles ont été traitées avec les différentes molécules. Les cellules ont ensuite été fixées avec une solution de formaline 10% (Sigma-Aldrich) pendant 10 min, puis perméabilisées avec 0.1% Triton-TBS pendant 5 min. Après 30 min de blocage dans 1% BSA-TBS, les cellules ont été incubées avec une dilution 1:40 de phalloïdine couplée au fluorophore Alexa568 (Life Technologies) dans du 1% BSA-TBS pendant 30 min. Enfin elles ont été incubées avec 1 µg/ml de Hoechst et montées sur des lames avec du Vectashield. Pour le marquage des P-bodies contenant Ge-1, les cellules ont été incubées successivement avec un anticorps anti-Ge1 (1 :400) (Cell Signaling) et un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'Alexa488 (1 :500) (Life Technologies) dans du 1% BSA-TBS pendant 30 min à chaque fois. Les P-bodies contenant DCP1a ont été visualisés par la transfection préalable des cellules avec la construction YFP-DCP1a.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans un tiers des cas des maladies génétiques, un codon stop prématuré est trouvé dans le gène responsable de la maladie. Dans la plus grande majorité des cas, la maladie se développe non pas parce qu'une protéine tronquée non fonctionnelle ou instable est synthétisée, mais plutôt parce que le gène muté n'est pas exprimé du fait de l'intervention du NMD sur l'ARNm qui en dérive. Néanmoins, si le NMD protège la cellule de la synthèse de protéines tronquées qui pourraient avoir des effets délétères, ce mécanisme empêche aussi la synthèse de protéines tronquées fonctionnelles. Dans certains cas, si l'on pouvait inhiber le NMD, on permettrait la synthèse d'une protéine tronquée fonctionnelle.

L'objectif initial de mes travaux était d'identifier de nouveaux inhibiteurs du mécanisme de NMD afin d'élaborer de nouvelles voies thérapeutiques pour certains cas de maladies causées par l'apparition de mutations non-sens. Pour cela nous avons développé un système de criblage reliant l'efficacité du NMD dans une cellule avec une activité luciférase mesurable directement sur des cultures cellulaires. Notre système de criblage nous a permis d'identifier initialement la molécule amlexanox comme un nouvel inhibiteur du NMD (Figure 1 de l'article 1). De manière intéressante, nos expériences avec la molécule sur trois modèles cellulaires différents ont montré que l'amlexanox non seulement est capable de stabiliser les ARNm contenant un PTC mais est aussi capable de faire de la translecture.

### **Potentiel thérapeutique de l'amlexanox pour la correction de mutations non-sens**

Comme il a été évoqué dans l'introduction, d'autres molécules ont été montrées comme étant capables de corriger des mutations non-sens, en inhibant le NMD et/ou en induisant la translecture. Cependant l'usage thérapeutique de la plupart d'entre elles est limité, dû à leurs effets secondaires indésirables. Par exemple, l'aminoglycoside G418 a été rapporté comme étant capable de faire de la translecture et de stabiliser des ARNm non-sens sur différents modèles cellulaires (Bedwell et al. 1997; Correa-Cerro et al. 2005; Salvatori et al. 2009; Floquet et al. 2010), mais comme les autres aminoglycosides, il présente des effets néphrotoxiques et ototoxiques (Brummett and Fox 1989; Mingeot-Leclercq and Tulkens 1999). Des molécules comme la caféine et la wortmannine qui inhibent indirectement le NMD en bloquant la phosphorylation de hUPF1 par hSMG1, ont été utilisées pour induire la synthèse d'une forme tronquée de collagène VI $\alpha$ 2 capable de restaurer les défauts dans la matrice extracellulaire des fibroblastes dérivés de patients atteints de la maladie d'Ullrich (Usuki et al. 2004). Cependant ces molécules peuvent avoir des effets indésirables

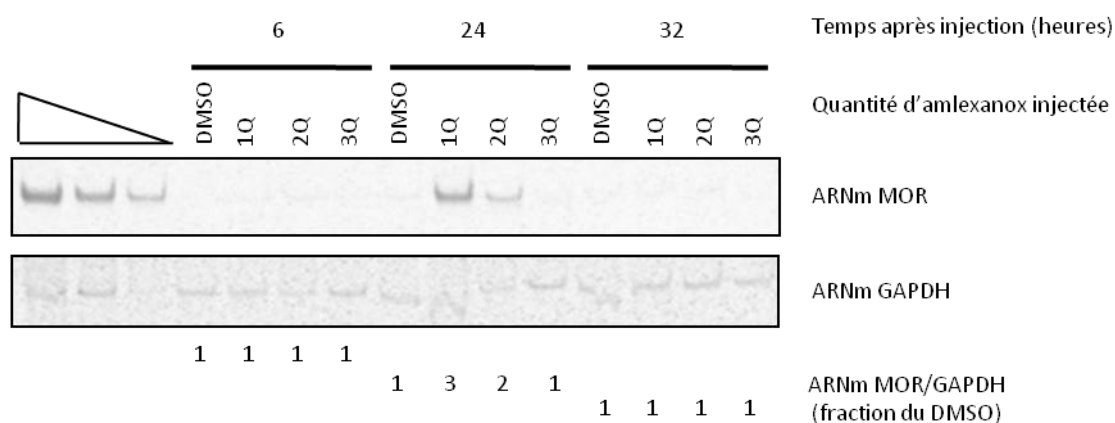
puisqu'elles n'inhibent pas seulement hSMG1 mais aussi les autres PI3KK, qui sont nécessaires pour le bon fonctionnement de voies de signalisation essentielles comme la réponse aux dommages à l'ADN (Abraham 2004). NMDI1, une molécule qui inhibe spécifiquement le NMD en bloquant la déphosphorylation de hUPF1 (Durand et al. 2007) présente les caractéristiques d'un agent intercalant de l'ADN (Hendry et al. 2007). Afin de restreindre notre criblage à des molécules qui puissent être utilisées dans des approches thérapeutiques chez l'homme, nous avons utilisé des molécules provenant d'une banque « drogues sur le marché ». Cette banque regroupe les 1200 molécules qui constituent les principes actifs des différents médicaments qui sont sur le marché. L'avantage d'utiliser une telle banque est que le profil de sécurité de ces molécules pour être utilisées chez l'homme a été déjà étudié et approuvé. Par exemple, l'amlexanox a été utilisé depuis plusieurs années dans le traitement des aphtes et de l'asthme (Saijo et al. 1985b; Meng et al. 2009) grâce à ses propriétés antiallergiques et anti-inflammatoires (Saijo et al. 1985a; Saijo et al. 1985b; Saijo et al. 1986), sans que des effets indésirables majeurs aient été reportés.

Nos résultats sur différents types cellulaires suggèrent que l'amlexanox peut être considéré comme une nouvelle approche pour la correction de mutations non-sens. Bien que les quantités d'ARNm non-sens et de protéines entières obtenues en présence d'amlexanox soient modestes, elles semblent être suffisantes pour supporter leur fonction dans la cellule. Par exemple, la quantité de protéine p53 entière obtenue en présence d'amlexanox dans les cellules Calu-6 est capable d'activer l'expression d'une de ces cibles, le gène qui code pour la protéine p21. Il faut noter qu'il est peu probable que cet effet soit dû à la forme tronquée de la protéine comme nous le verrons un peu plus loin. Dans nos cellules 6CFSMEo- issues de patients atteints de mucoviscidose, la stabilisation et la translecture sur l'ARNm CFTR non-sens induites par le traitement avec l'amlexanox, sont suffisantes pour restaurer le transport ionique à travers la membrane des cellules, comme nous l'avons démontré au moyen du test SPQ (Figure 6 de l'article 1). Ce test permet de mesurer le transport d'ions halogénures à travers la membrane cellulaire lorsqu'un canal CFTR fonctionnel est présent (Mansoura et al. 1999). Puisque dans les cellules 6CFSMEo- la mutation non-sens touche le deuxième codon du gène *CFTR*, cette restauration de l'activité du canal CFTR peut être attribuée à la synthèse d'une forme entière de la protéine.

Chez les patients atteints de mucoviscidose, il a été estimé que l'expression de 5 à 8% du niveau d'ARNm CFTR trouvé chez un individu sain serait suffisante pour produire la quantité de protéine CFTR nécessaire pour améliorer le phénotype clinique (Highsmith et al. 1994; Ramalho et al. 2002). Dans d'autres maladies telles que le syndrome de Hurler et certains cancers provoqués par des mutations dans le gène suppresseur de tumeurs *APC*, il a

été estimé que la restauration de 1% de la protéine sauvage peut résulter dans un phénotype presque normal (Ashton et al. 1992; Zilberberg et al. 2009). Ainsi, même les faibles niveaux de protéines synthétisées en présence d'amlexanox peuvent être significatifs sur le plan clinique. De plus, comparée à d'autres molécules capables d'induire la translecture des codons stop, telles que le G418 ou PTC124, l'amlexanox semble être la molécule la plus efficace dans la synthèse d'une protéine CFTR fonctionnelle dans les cellules 6CFSMEo- (Figure 7 de l'article 1).

Au laboratoire, nous possédons deux lignées de souris qui sont des modèles d'étude *in vivo* pour le NMD : la lignée KIM qui porte une mutation non-sens dans le gène du récepteur  $\mu$  aux opiacés (MOR) (Contet et al. 2007) et la lignée mdx qui porte une mutation non-sens dans le gène de la dystrophine. Nous avons commencé des expériences préliminaires avec ces souris dans le but d'explorer le potentiel thérapeutique *in vivo* de l'amlexanox dans la correction de mutations non-sens. Nous avons injecté les souris KIM en sous-cutané avec trois doses différentes de la molécule, puis nous avons récupéré les cerveaux au bout de 6, 24 ou 32h post-injection. L'analyse par PCR radioactive a montré une stabilisation de l'ARNm MOR dans le cerveau des souris injectées avec les doses 1Q et 2Q d'amlexanox à 24h post-injection (Figure 35), suggérant que l'amlexanox peut inhiber le NMD *in vivo*.



**Figure 35. Effet de l'injection d'amlexanox sur l'expression de l'ARNm MOR.**

Les souris KIM ont été injectées en sous-cutané avec 0.2 mg/kg (1Q), 2 mg/kg (2Q) ou 20 mg/kg (3Q) d'amlexanox. Les cerveaux ont été récupérés après les temps indiqués et les ARNm purifiés et analysés par PCR radioactive.

Ces premiers résultats sont encourageants, d'autant plus qu'ils suggèrent que l'amlexanox peut traverser la barrière hémato-encéphalique. Ceci serait important dans le traitement de certaines maladies dans lesquelles un effet dans le cerveau est nécessaire. Un exemple est le syndrome de Hurler, une maladie causée par des mutations dans le gène *IUAD*

codant l'enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase qui entraînent un défaut dans le métabolisme de glycosaminoglycanes. Le traitement des fibroblastes dérivés de patients avec la gentamicine a montré une restauration de l'expression de l'enzyme  $\alpha$ -L-iduronidase fonctionnelle, suggérant que la translecture est une approche envisageable pour cette maladie (Keeling et al. 2001). Cependant la barrière hémato-encéphalique étant imperméable à la gentamicine (Strausbaugh and Brinker 1983), la correction des anomalies neurologiques provoquées par la maladie se verrait limitée avec cette molécule (Keeling et al. 2001). Quant aux souris mdx, elles seront injectées directement dans le muscle, afin de déterminer si l'amlexanox peut inhiber le NMD *in vivo* de façon locale.

Il est toutefois important de tenir compte du fait que les bons résultats sur les modèles cellulaires et sur des modèles animaux ne sont pas toujours retrouvés dans les essais cliniques sur des patients. Par exemple, si PTC124 s'est montré très efficace dans des modèles cellulaires et murins de mucoviscidose et de DMD (Welch et al. 2007; Du et al. 2008), seuls les essais cliniques sur des patients de mucoviscidose ont donné des résultats encourageants, contrairement aux essais effectués sur des patients atteints de DMD (Kerem et al. 2008; Pichavant et al. 2011; Wilschanski et al. 2011).

### **Facteurs qui peuvent affecter la réponse au traitement**

Plusieurs facteurs peuvent affecter la réponse à un traitement avec des molécules qui corrigent des mutations non-sens. Par exemple, l'efficacité du NMD sur le type cellulaire étudié, l'efficacité de la translecture selon le codon stop et le contexte nucléotidique et la fonctionnalité des protéines tronquées et/ou entières synthétisées sont autant de paramètres à prendre en compte.

Il a été montré que l'efficacité du NMD peut varier entre différentes lignées cellulaires (Linde et al. 2007a; Viegas et al. 2007), entre les tissus (Bateman et al. 2003; Zetoune et al. 2008) et d'un individu à l'autre (Perrin-Vidoz et al. 2002; Linde et al. 2007b). Par exemple, une analyse de l'effet d'une trentaine de mutations non-sens localisées à différents endroits sur le gène *BRCA1* (qui est muté dans la plupart des cas de cancer de sein) semble montrer une variabilité dans l'efficacité du NMD induit par chaque mutation, allant de 1.5 à 5 fois de réduction dans les niveaux d'ARNm non-sens par rapport aux niveaux d'ARNm sauvage chez des individus hétérozygotes (Perrin-Vidoz et al. 2002). De plus, une même mutation non-sens peut donner des efficacités du NMD très variables chez des individus différents. En effet, comme il a été discuté dans l'introduction (paragraphe 5.3.2.2), la variabilité interindividuelle dans l'efficacité du NMD entre les patients semble être l'hypothèse la plus vraisemblable pour

expliquer des différences dans la réponse au traitement avec la gentamicine observées parmi un groupe des patients atteints de mucoviscidose et porteurs de la même mutation non-sens au niveau du gène *CFTR* (Linde et al. 2007b).

PTC124 a montré qu'elle est capable d'induire la translecture efficacement dans des modèles de mucoviscidose, DMD, syndrome d'Usher de type C et dans la myopathie de Miyoshi (Welch et al. 2007; Du et al. 2008; Wang et al. 2010; Goldmann et al. 2011), mais elle s'est avérée inefficace sur des ARNm non-sens impliqués dans la chondrodysplasie rhizomérique punctata type 1 et l'obésité (Brumm et al. 2011; Dranchak et al. 2011). Il faut cependant noter que dans ces deux études où PTC124 n'a pas montré d'effet, le traitement avec G418 s'est avéré efficace dans l'obtention d'une protéine entière. Une explication serait que dans ces types cellulaires, le NMD est très efficace rendant les niveaux d'ARNm non-sens trop faibles pour permettre une translecture mesurable par PTC124. Par conséquent, seule une molécule ayant la double capacité d'inhiber le NMD et de stimuler la translecture comme le G418 (ou comme l'amlexanox) permettrait d'obtenir une quantité suffisante de protéine entière.

Nous avons observé dans notre étude que l'efficacité de l'amlexanox varie selon le type cellulaire. Par exemple, dans les cellules épithéliales de mucoviscidose et de cancer, la concentration la plus efficace a été de 25  $\mu\text{M}$  d'amlexanox, alors que dans les cellules musculaires DMD la dose la plus efficace a été de 5  $\mu\text{M}$ . Cette variabilité pourrait refléter des différences dans l'efficacité du NMD entre les types cellulaires (épithélial versus musculaire). En outre, les cellules musculaires sont particulières parce qu'elles sont incubées avec l'amlexanox dans un milieu d'induction de la différenciation myogénique, puisque celle-ci est nécessaire pour activer l'expression de l'ARNm dystrophine. Il est possible que la dose 25  $\mu\text{M}$  affecte négativement la différenciation musculaire ce qui expliquerait pourquoi l'effet de l'amlexanox à cette concentration est plus faible qu'à 5  $\mu\text{M}$ . Par conséquent, il est important de mener des expériences de dose-réponse sur chaque modèle cellulaire afin d'établir si la molécule peut avoir un effet et quelle est la concentration la plus efficace.

D'autre part, il a été montré pour les aminoglycosides ou le PTC124, que l'efficacité de la translecture dépend de la nature de la mutation non-sens et/ou du contexte nucléotidique (Manuvakhova et al. 2000; Bidou et al. 2004; Welch et al. 2007). De façon intéressante, nous avons montré que l'amlexanox peut être efficace sur la translecture des trois codons stop : UGA dans l'ARNm p53, UAG dans l'ARNm *CFTR* et UAA dans l'ARNm dystrophine. D'autres études seront nécessaires pour savoir si la capacité de l'amlexanox à corriger des mutations

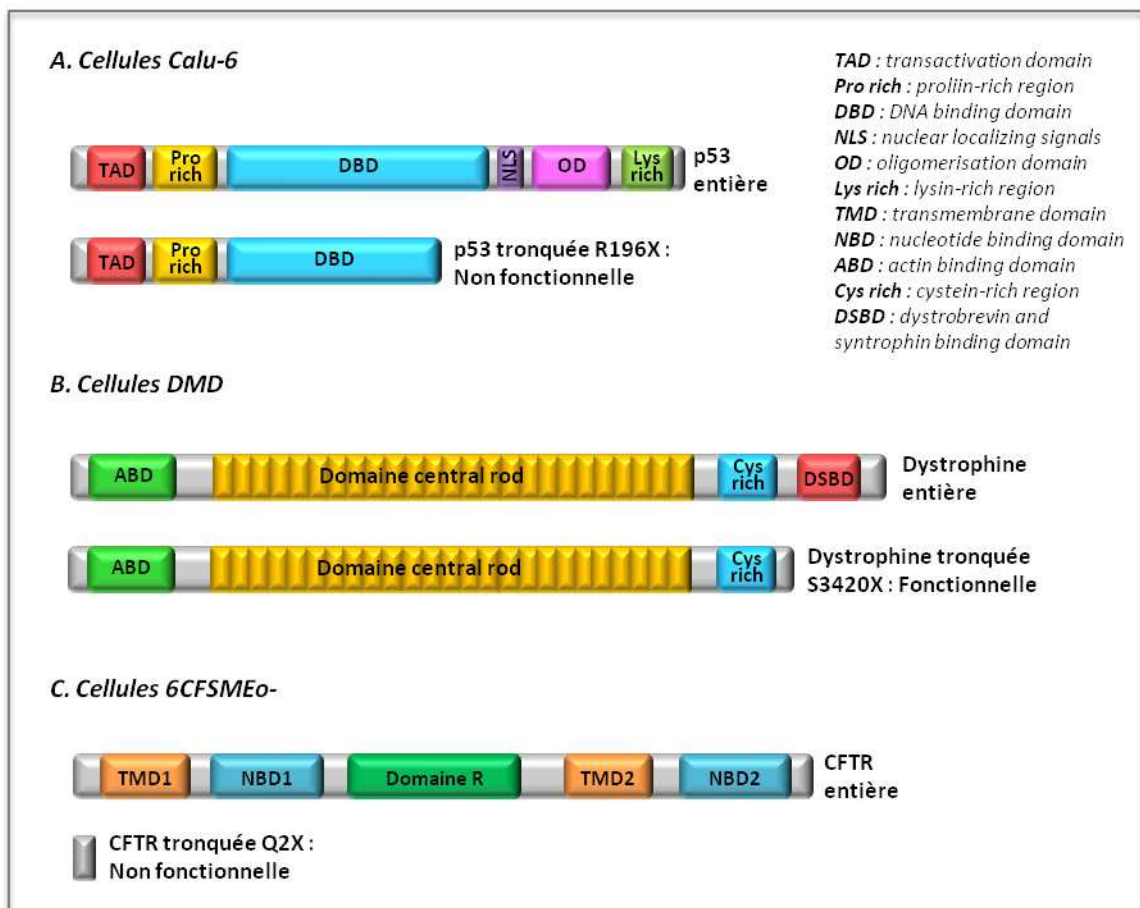
non-sens est une propriété générale ou spécifique aux mutations et aux contextes nucléotidiques des lignées cellulaires que nous avons étudiées.

Un autre aspect qui est important de noter est que le traitement avec une molécule comme l'amlexanox, ayant la capacité d'inhiber le NMD et d'induire la translecture, a comme conséquence la production des deux formes de la protéine à partir de l'ARNm non-sens : la forme tronquée obtenue par l'inhibition du NMD et la forme entière obtenue par la translecture. Les effets du traitement avec une molécule ayant cette double capacité peuvent être assez différents si (i) la protéine tronquée est aussi fonctionnelle que la protéine entière, si (ii) seule la protéine entière est fonctionnelle lorsque la protéine tronquée manque de séquences essentielles à sa fonction, ou si (iii) la protéine tronquée a l'effet d'un dominant négatif sur la protéine entière. Pour cette raison, il est important d'analyser dans chaque cas quel peut être l'impact de la production d'une forme tronquée.

Dans les cellules Calu-6, porteuses de la mutation R196X dans le gène suppresseur de tumeurs *TP53*, nous avons pu détecter une synthèse importante de la forme tronquée de p53 suite au traitement avec l'amlexanox, et dans une moindre mesure, nous avons détecté la forme entière de la protéine (Figure 4A de l'article 1). Nous avons constaté aussi l'activation de l'expression d'un des gènes cibles de p53 qui est le gène qui code pour la protéine p21 (Figure 2A de l'article 1). Il est peu probable que cet effet soit induit par la forme tronquée de p53 dérivée de la mutation R196X. En effet, même si elle possède le domaine de transactivation, le signal de localisation nucléaire est absent ce qui signifie que la protéine ne peut pas être dirigée au noyau où elle est nécessaire pour accomplir son rôle de facteur de la transcription. Par ailleurs, le domaine d'oligomérisation est lui aussi manquant par conséquent la protéine ne peut pas former le tétramère qui est sa forme active (Figure 36A). Certains mutants de p53 peuvent former des hétérotétramères avec la protéine sauvage et agir comme un dominant négatif (Marutani et al. 1999). L'absence du domaine d'oligomérisation dans la protéine R196X empêcherait que la forme tronquée puisse former des tétramères non fonctionnels avec la forme entière. Par conséquent, bien que présente en plus faible quantité par rapport à la protéine tronquée, c'est vraisemblablement la forme entière de p53 synthétisée en présence d'amlexanox qui induit l'activation de la transcription de p21 que nous avons observée.

Dans les cellules DMD, dérivées d'un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne et porteuses de la mutation S3420X dans le gène de la dystrophine, nous avons pu détecter également la forme tronquée et la forme entière de la protéine suite au traitement avec l'amlexanox (Figure 4B de l'article 1). Dans ce modèle, la protéine tronquée peut en

théorie être aussi fonctionnelle que la protéine entière. En effet, la mutation se trouvant sur l'un des derniers exons du gène de la dystrophine (exon 71 sur 79 en total), le domaine de liaison à la dystrobrevine et à la syntrophine dans la partie C-ter est absent, mais la protéine conserve le domaine riche en cystéines qui est nécessaire à l'interaction avec le  $\beta$ -dystroglycane (Figure 36B). Tandis que l'absence d'interaction entre la dystrophine et le  $\beta$ -dystroglycane interfère complètement avec la formation du complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC) et entraîne des dystrophies sévères, l'interaction directe entre la dystrophine et la dystrobrevine et la syntrophine semble être dispensable (Crawford et al. 2000). En effet, la dystrobrevine et la syntrophine peuvent interagir avec les composants membranaires du DGC même en absence du domaine C-ter de la dystrophine (Crawford et al. 2000). Par conséquent, dans nos cellules DMD, la forme tronquée et/ou entière synthétisées en présence d'amlexanox, peuvent indistinctement supporter l'assemblage d'un DGC fonctionnel.



**Figure 36. Structure des protéines entières et tronquées dans les lignées cellulaires étudiées.**

(A) Protéine p53 dans les cellules Calu-6. (B) Protéine dystrophine dans les cellules DMD. (C) Protéine CFTR dans les cellules 6CFSMEo-.



Dans les cellules 6CFSMEo-, dérivées d'un patient atteint de mucoviscidose, une mutation Q2X sur le gène CFTR convertit le deuxième acide aminé en un codon stop ce qui exclut la possibilité d'une synthèse de protéine tronquée fonctionnelle (Figure 36C). Alors la restauration du transport d'iode que nous avons mesurée dans les cellules traitées par l'amlexanox indique que la molécule induit la synthèse de la protéine CFTR entière. Il faut noter cependant que ces cellules sont hétérozygotes : sur un allèle du gène CFTR elles portent le PTC Q2X et sur l'autre allèle, la délétion  $\Delta F508$ . Néanmoins, il a été établi précédemment que les cellules 6CFSMEo- n'expriment pas l'allèle  $\Delta F508$  (da Paula et al. 2005). En accord avec ceci, nous n'avons pas détecté d'amplification de l'ARNm CFTR dans les cellules 6CFSMEo- traitées avec DMSO. Par conséquent l'ARNm que nous détectons suite au traitement avec l'amlexanox correspond vraisemblablement à l'ARNm dérivé de l'allèle Q2X qui est stabilisé du fait de l'inhibition du NMD par la molécule (Figure 2C de l'article 1). Toutefois, nous ne pouvons pas complètement exclure la possibilité que l'amlexanox puisse aussi activer l'expression de l'allèle  $\Delta F508$ . Pour évaluer cette possibilité, nous allons tester la molécule sur une lignée CFTR homozygote pour la mutation  $\Delta F508$ . Puisqu'il a été montré que l'inhibition du NMD par traitement avec la cycloheximide ou avec des ARNi dirigés contre hUPF1 ou hUPF2 n'a aucun effet sur l'expression de l'ARNm CFTR dans des cellules homozygotes pour la mutation  $\Delta F508$  (Linde et al. 2007b), il est peu probable que nous observions un effet en présence d'amlexanox sur ces cellules.

### **Inconvénients potentiels d'une thérapie de suppression des PTC**

L'utilisation des molécules qui inhibent le NMD et/ou activent la translecture pourrait avoir des inconvénients potentiels. Par exemple, l'inhibition du NMD pourrait affecter l'expression de gènes qui utilisent cette voie comme mécanisme de régulation post-transcriptionnelle. Cependant, nous avons vu dans l'introduction (paragraphe 3.2) que ces transcrits représentent un faible pourcentage du transcriptome (environ 0.35% selon l'analyse de Viegas et collaborateurs) (Viegas et al. 2007). Notre analyse sur trois de ces gènes nous a montré que les niveaux d'expression de leurs ARNm ne sont pas affectés par le traitement avec l'amlexanox (Figure 3C de l'article 1). Ceci peut être dû au fait que le NMD est seulement l'un des mécanismes impliqués dans la régulation de leur expression parmi d'autres mécanismes qui pourraient compenser la défaillance du NMD. C'est le cas des protéines SR qui utilisent des voies de régulation au niveau de la transcription, l'épissage, la traduction et des modifications post-traductionnelles. Ces différents mécanismes de régulation interviennent pour maintenir les niveaux fonctionnels de protéines dans la cellule (Bourgeois et al. 2004). De plus, comme cela est très bien décrit dans le cas de SC35, pour que

le NMD intervienne dans la dégradation de cet ARNm un événement particulier en amont doit avoir lieu, par exemple une surexpression de la protéine (Sureau et al. 2001; Lareau et al. 2007). Bien que les mécanismes de régulation des gènes *TBL2* et *NAT9* ne soient pas connus, le fait que leur niveau d'expression reste stable en présence d'amlexanox nous indique que de tels mécanismes additionnels existent pour la régulation de ces gènes.

Autre inconvénient potentiel de l'utilisation des molécules qui inhibent le NMD et/ou activent la translecture, est la possibilité d'induire une production généralisée de protéines tronquées et/ou d'induire la translecture sur les codons stop physiologiques. Toutefois, plusieurs observations suggèrent qu'un tel scénario est peu probable. D'abord, on pourrait s'attendre à ce que ces protéines anormales soient mal ou non repliées et qu'elles s'accumulent dans le réticulum endoplasmique, ce qui induirait une augmentation de l'expression de la chaperonne HSP70 (Agashe and Hartl 2000). Cependant, le traitement avec des fortes doses de gentamicine n'a que très peu d'effet sur les niveaux de HSP70 (Keeling et al. 2001). En outre, si de tels changements avaient lieu, le protéome serait perturbé. Cependant des analyses protéomiques sur des cellules traitées avec du G418 ou avec PTC124 n'ont pas montré des changements majeurs dans le profil d'expression protéique en comparaison au profil des cellules non traitées (Welch et al. 2007; Salvatori et al. 2009). En outre, PTC124 a été montré ne pas induire la translecture des codons stop physiologiques (Welch et al. 2007).

L'effet sélectif sur la translecture des PTC peut être expliqué par le fait que la terminaison de la traduction normale et la terminaison prématurée sont mécaniquement différentes (Amrani et al. 2004). En effet, de par leur localisation près de la partie 3'UTR, les codons stop physiologiques se trouvent à proximité de protéines comme la PABP qui stimulent l'efficacité de la terminaison de la traduction (Ivanov et al. 2008; Singh et al. 2008). De plus, les séquences qui entourent les codons stop physiologiques ne sont pas aléatoires mais ont été sélectionnées pour favoriser une terminaison efficace de la traduction (Bonetti et al. 1995). Enfin, un autre contrôle de sécurité est donné fréquemment par la présence de multiples codons stop dans la même phase de lecture en aval des codons stop physiologiques (Linde and Kerem 2008).

Ces observations indiquent donc qu'il est peu probable que des changements globaux dans le protéome soient produits. Il faut rappeler par ailleurs qu'avec un traitement par l'amlexanox ou par d'autres drogues qui permettent la correction des mutations non-sens, les quantités d'ARNm non-sens stabilisés et de protéines tronquées et/ou entières synthétisées à partir de ces ARNm sont plutôt modestes. Alors l'effet de l'amlexanox peut être assez

important pour permettre un bénéfice clinique mais suffisamment faible pour ne pas altérer de façon significative le métabolisme cellulaire.

Enfin, il a été observé qu'en réponse à des situations de stress comme la privation nutritionnelle ou l'hypoxie, le NMD est inhibé, comme conséquence de l'hyperphosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (Mendell et al. 2004; Gardner 2008). L'observation que l'amlexanox ne provoque pas d'altération dans la phosphorylation d'eIF2 $\alpha$ , nous indique que l'inhibition du NMD induite par l'amlexanox n'est pas due à un stress provoqué à la cellule par le traitement avec la molécule.

### **Développement d'un nouveau système de criblage**

D'autres systèmes de criblage ont été développés précédemment par d'autres équipes dans le but de trouver des inhibiteurs du NMD. Dans l'un d'entre eux, l'ORF du gène codant pour la protéine fluorescente EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) a été inséré dans un minigène de TCR- $\beta$  de manière à ce que le codon stop de l'EGFP se trouve à plus de 50 nt en amont d'une jonction exon-exon. Ce codon stop est alors reconnu comme un PTC et l'ARNm est soumis au NMD (Paillusson et al. 2005). Ce système a le désavantage de présenter des niveaux trop élevés de bruit de fond et de nécessiter des quantités relativement importantes de cellules pour permettre une détection fiable, ce qui limite son usage pour un criblage à haut débit. Dans un deuxième système de criblage, la séquence du gène de la  $\beta$ -globine avec ou sans le PTC dans le codon 39 a été fusionnée en aval de l'ORF codant pour la Renilla luciférase (Rluc) (Boelz et al. 2006). Dans ce système, l'activité de la Rluc est proportionnelle à la quantité d'ARNm Rluc/ $\beta$ -glo présente. Cependant, le principal inconvénient de ce gène rapporteur pour le criblage d'inhibiteurs du NMD, est qu'il peut donner de nombreux faux positifs. En effet, des molécules qui inhibent l'épissage par exemple donneront aussi un signal Rluc. D'ailleurs aucun de ces deux systèmes n'a été utilisé à ce jour pour un criblage systématique d'inhibiteurs du NMD.

Dans le système que nous avons développé et utilisé dans cette étude, nous reproduisons de manière artificielle le mécanisme de NMD sur l'ARNm codant pour la Firefly luciférase (Fluc) du fait de la fixation dirigée de l'une des protéines hUPF dans la partie 3'UTR de cet ARNm. Ceci a comme conséquence que le codon normal de terminaison de la traduction est reconnu comme un PTC et l'ARNm est dégradé par NMD (Lykke-Andersen et al. 2000). Ce système a l'avantage de permettre d'identifier des molécules ayant la propriété de bloquer spécifiquement la fonction de chacune des protéines hUPF. Cependant, cette

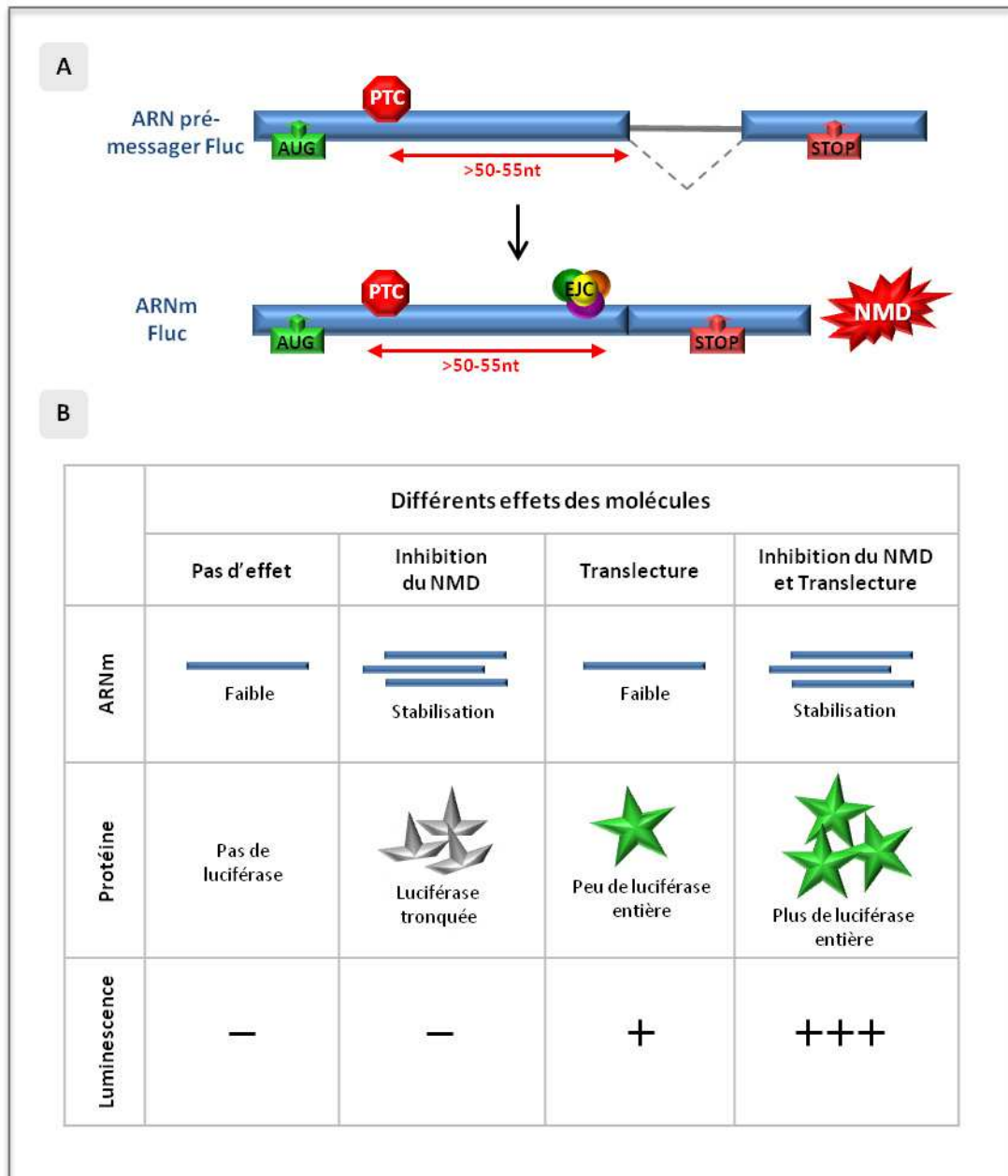
fixation artificielle peut ne pas refléter le mécanisme du NMD tel qu'il a lieu dans les cellules au niveau d'un PTC.

Récemment, nous avons construit un nouveau système de criblage dans lequel le NMD est induit par le même mécanisme qui a lieu le plus souvent dans les cellules de mammifères, c'est-à-dire par la présence d'un PTC en amont d'un complexe EJC. En plus, ce système nous permettra d'identifier soit des molécules qui font de la translecture, soit des molécules qui inhibent le NMD et activent la translecture. Nous avons construit des lignées stables dans lesquelles nous avons inséré un intron dans l'ORF codant pour la Fluc. En amont de cet intron nous avons fait de la mutagenèse dirigée pour changer le codon 109 en un des trois codons stop. Après l'épissage de l'intron, le PTC se trouvera en amont d'un EJC et par conséquent l'ARNm Fluc sera dégradé (Figure 37A). En présence d'un inhibiteur du NMD, l'ARNm est stabilisé mais la protéine tronquée ayant seulement les premiers 109 acides aminés, n'a pas d'activité catalytique. Seulement en présence d'un composé qui est capable de translire le PTC, la luciférase entière pourra être synthétisée et pourra agir sur son substrat en générant de la lumière qui sera détectée au luminomètre. L'intensité du signal luminescent nous permettra de déterminer si la molécule est capable de faire de la translecture uniquement ou si elle inhibe le NMD en parallèle (Figure 37B). Grâce à ce système nous espérons trouver d'autres composés qui permettent de translire efficacement les PTC. Ces molécules pourront être utilisées sur toutes les mutations non-sens sans restriction de position dans le cadre de lecture. De plus, il sera intéressant d'étudier s'il y a des différences entre l'efficacité du NMD et le type de codon stop. En effet, s'il est bien connu que la nature du codon stop détermine l'efficacité de la translecture, il n'a pas été rapporté à ce jour si les trois codons stop sont également efficaces dans le déclenchement du NMD.

### **Médecine personnalisée et correction des mutations non-sens**

Les maladies génétiques peuvent être causées par une variété de mutations différentes. Par exemple, dans la mucoviscidose, le gène *CFTR* peut être affecté par des mutations faux-sens, des mutations non-sens, des mutations d'épissage, des délétions, etc. Les conséquences au niveau de la protéine ne seront pas les mêmes : chez certains patients, il y aura synthèse d'une protéine mutée qui a perdu partiellement ou totalement sa fonction alors que chez d'autres, il n'y aura plus du tout de protéine. Il ne peut pas exister alors un « médicament contre la mucoviscidose » qui soit applicable à tous les patients. Avec les énormes progrès faits pendant la dernière décennie dans le séquençage du génome humain et dans la connaissance de certaines maladies génétiques, un domaine qui émerge fortement

est celui de la médecine personnalisée : utiliser le bon traitement, pour la bonne personne, au bon moment. En effet, lorsque l'on connaît la mutation d'un patient et sa conséquence au niveau de la protéine, on peut choisir la thérapie la plus appropriée. Par exemple, dans la DMD et dans la mucoviscidose certains patients bénéficieront de l'utilisation des oligonucléotides anti-sens pour corriger des épissages aberrants ou pour restaurer le cadre de lecture suite à la délétion d'un exon (paragraphe 5.3.1).



**Figure 37. Principe d'un nouveau système de criblage NMD/Translecture.**

(A) Structure de l'ARNm rapporteur : un intron a été inséré dans l'ORF codant pour la Fluc et le codon 109 a été remplacé par UAA, UAG ou UGA (PTC) (B) Selon l'effet de la molécule, l'intensité de la luminescence détectée sera différente.

Les mutations non-sens représentent environ 11% des mutations impliquées dans des maladies humaines qui sont répertoriées dans la base de données *The Human Gene Mutation Database* (Mort et al. 2008). Ceci implique qu'un nombre important de malades pourraient bénéficier d'une thérapie visant à corriger les mutations non-sens. Comme nous l'avons vu, la réponse à ce type de thérapie peut varier selon différents facteurs qui peuvent être spécifiques à chaque patient, par exemple l'efficacité du NMD, l'efficacité de la translecture selon le type de PTC et son contexte nucléotidique, et la fonctionnalité de la protéine tronquée et/ou entière qui est réexprimée. Le traitement approprié dépendra de la mutation en question : dans les cas où une protéine tronquée est fonctionnelle, l'inhibition du NMD peut être suffisante, dans les cas où une très faible quantité de protéine entière peut restaurer le phénotype, une molécule de translecture seule peut être suffisante. Dans le cas où le seuil nécessaire d'expression est plus important, il sera nécessaire d'utiliser une molécule qui a les deux propriétés ou une combinaison d'une molécule inhibitrice du NMD avec une molécule de translecture. Enfin, selon la nature du codon stop et/ou du contexte nucléotidique, certaines molécules peuvent être plus efficaces que d'autres dans la suppression des PTC. D'où l'importance de continuer les efforts pour l'identification de nouvelles molécules dans le but de constituer un répertoire de composés avec des spécificités différentes qui puissent couvrir de façon la plus large possible le spectre des mutations non-sens impliquées dans les maladies génétiques. Pour ces raisons nous allons continuer la recherche d'autres molécules capables de corriger des mutations non-sens qui puissent être autant, voire plus efficaces que l'amlexanox.

### **Les inhibiteurs comme outil pour étudier le mécanisme du NMD et de la translecture**

Le développement de ces molécules n'a pas seulement un intérêt dans l'élaboration de nouvelles voies thérapeutiques pour les maladies associées aux PTC. Elles sont aussi des outils de premier ordre pour étudier les mécanismes sous-jacents à la voie du NMD. Par exemple, la découverte de NMDI1 a permis pour la première fois de montrer que les facteurs de NMD et les ARNm non-sens transitent par les P-bodies dans les cellules de mammifère, et a mis en évidence l'importance des cycles de phosphorylation et déphosphorylation de hUPF1 dans le NMD (Durand et al. 2007).

L'étude du mode d'action d'amlexanox nous apportera sans doute des éléments dans la compréhension de la relation entre le NMD et la translecture, qui reste à l'heure actuelle très mal connue. Il est possible d'imaginer deux hypothèses qui expliqueraient les effets

observés de l'amlexanox sur la stabilisation et la translecture des ARNm non-sens. Une première hypothèse pourrait être que l'amlexanox soit seulement un inhibiteur du NMD et non un activateur de translecture, et que la synthèse de la protéine entière soit un effet indirect de l'inhibition du NMD : la stabilisation des ARNm induite par la molécule augmenterait les chances qu'il y ait de la translecture naturelle sur le PTC, puisqu'elle a plus de probabilités de survenir sur un PTC que sur un codon stop physiologique. Cette hypothèse semble pourtant peu probable puisque cela nécessiterait que de grandes quantités d'ARNm non-sens soient produites pour avoir des chances de détecter la synthèse de la protéine entière. En effet, même sur des codons stop entourés des séquences qui ont une faible efficacité de terminaison de la traduction et qui par conséquent favorisent la translecture, celle-ci ne dépasse pas 2% dans des cellules de mammifère (Cassan and Rousset 2001). De plus, il a été montré précédemment avec d'autres molécules que la stabilisation des ARNm portant un PTC n'induit pas nécessairement leur traduction en protéines entières. En effet, si des composés comme la wortmannine et la molécule NMDI1 stabilisent efficacement les ARNm non-sens et permettent qu'ils soient traduits dans des protéines tronquées, la synthèse de protéines entières n'est jamais détectée (Yamashita et al. 2001; Durand et al. 2007).

Une autre hypothèse est que la translecture induite par la molécule protégerait les ARNm non-sens de la dégradation par le NMD et ceux-ci seraient stabilisés. Dans ce cas la stabilisation des ARNm non-sens serait une conséquence de la translecture sur le PTC. Cette hypothèse pourrait expliquer les effets d'inhibition du NMD et d'induction de la translecture qui sont observés avec les aminoglycosides (Holbrook et al. 2004; Keeling et al. 2005). Il faut cependant noter que ceci n'est pas nécessairement le cas de toutes les molécules qui induisent la translecture. En effet, dans le cas de PTC124, cette molécule permet la translecture des PTC et la synthèse de protéines entières sans pour autant inhiber le NMD puisque aucun effet de stabilisation des ARNm non-sens n'a été observé (Welch et al. 2007).

Très récemment, il a été montré qu'il peut y avoir de la synthèse protéique lors du premier tour de traduction (Apcher et al. 2011). Si l'amlexanox induit la translecture du PTC pendant ce premier tour, cela voudrait dire que les deux processus induits par la molécule, l'inhibition du NMD et la translecture, sont concomitants. Une autre possibilité est que les deux effets de l'amlexanox sont séparés, et donc que d'une part elle stabilise les ARNm non-sens lors du premier tour et qu'après, elle stimule la translecture de ces ARNm pendant la traduction globale. Nous devons encore déterminer laquelle de ces deux situations a lieu en présence d'amlexanox. Pour cela, il est important d'identifier les cibles de l'amlexanox dans la machinerie du NMD et/ou de la traduction. Cela nous permettra de comprendre aussi

pourquoi les combinaisons de G418 et PTC124 avec l'amlexanox à 25  $\mu$ M diminuent son efficacité. Nous pouvons imaginer que les molécules sont en compétition pour au moins une cible commune, sur laquelle l'amlexanox se fixerait avec une moindre affinité que les autres deux molécules mais aurait un effet plus puissant.

Différentes stratégies peuvent être envisagées afin d'identifier les cibles de l'amlexanox. Par exemple, il est possible de modifier la molécule pour la fixer sur des colonnes à travers lesquelles on peut faire passer des extraits protéiques. La fraction fixée à la molécule peut être ensuite éluee et analysée par spectrométrie de masse ou par Western blot. Il est intéressant de noter que des expériences de ce type effectuées par d'autres équipes utilisant des lysats de cerveau bovin, ont montré que l'amlexanox se fixe avec une haute affinité sur certaines protéines S100, telles que S100A1, S100A12 et S100A13 (Shishibori et al. 1999; Okada et al. 2002). Ces protéines sont impliquées dans une grande variété de processus cellulaires, cependant aucun lien avec le mécanisme du NMD n'a pas été jusqu'à présent décrit. Il serait donc intéressant d'établir si ces protéines peuvent être impliquées dans la stabilisation des ARNm non-sens observée suite au traitement avec l'amlexanox, par exemple en analysant l'effet des ARNi dirigés contre ces protéines sur l'efficacité du NMD.

Une autre approche consistera à effectuer des immunoprécipitations des différents facteurs du NMD et des protéines de l'EJC afin de déterminer si les interactions nécessaires à l'assemblage du complexe de surveillance sont affectées en présence de l'amlexanox. En outre, par une approche de microscopie à fluorescence, nous analyserons la localisation cellulaire des facteurs de NMD et des ARNm soumis au NMD lorsque ce dernier est bloqué par la molécule.

Enfin, il sera intéressant aussi d'utiliser l'amlexanox pour stabiliser les mRNP soumises au NMD et de les purifier ensuite au moyen de colonnes d'affinité. Ceci nous permettra d'étudier les différences dans la composition des complexes ribonucléoprotéiques soumis au NMD et de ceux qui y échappent. L'ensemble de ces données nous permettra d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de ce mécanisme de dégradation des ARNm.

### **Le cytosquelette d'actine et le NMD**

Un dernier aspect que nous avons commencé à explorer récemment, concerne l'effet des altérations du cytosquelette sur le NMD. En effet, plusieurs évidences suggèrent que le cytosquelette joue un rôle important dans l'organisation et la régulation de la traduction (Kim and Coulombe 2010). Plus particulièrement, les filaments d'actine apparaissent comme le



principal composant du cytosquelette impliqué, puisque l'existence d'un lien physique entre des éléments de la machinerie traductionnelle et les filaments d'actine a pu être mise en évidence. Des expériences de fractionnement pour séparer la fraction soluble cytosolique de la fraction cytosquelettique montrent que 25 à 40% des polyribosomes sont retrouvés attachés aux filaments d'actine dans les fractions cytosquelettiques (Ramaekers et al. 1983; Hesketh and Pryme 1988). De plus, les aminoacyl-ARNt synthétases, les enzymes qui catalysent l'estérification des acides aminés sur l'extrémité 3' des ARNt, sont associées aux filaments d'actine (Kaminska et al. 2009), ainsi que plusieurs facteurs d'initiation et d'élongation de la traduction (Howe and Hershey 1984). De façon intéressante, le traitement avec des concentrations élevées de cytochalasine D induit le détachement des polyribosomes des filaments d'actine, en libérant les ARNm qui sont en train d'être traduits et en inhibant de cette manière la traduction globale (Ornelles et al. 1986). Cependant, il n'est pas connu si le premier tour de traduction peut être affecté de la même manière ce qui indiquerait un lien entre le NMD et le rôle du cytosquelette.

Nos résultats préliminaires montrent que des altérations dans l'organisation des filaments d'actine provoquées au moyen de toxines qui affectent leur polymérisation ou leur dépolymérisation, peut entraîner la stabilisation des ARNm rapporteurs du NMD. Notamment le jasplakinolide, un composé isolé d'une éponge marine (Bubb et al. 1994; Bubb et al. 2000) est capable d'induire environ 4 fois la stabilisation des ARNm de  $\beta$ -globine et GPx1 porteurs d'une mutation non-sens. Des observations parallèles en microscopie de fluorescence et en PCR radioactive suggèrent que l'effet sur l'inhibition du NMD est proportionnel à la magnitude de l'altération du cytosquelette d'actine. L'analyse de l'effet du jasplakinolide sur la traduction suggère que la stabilisation des ARN non-sens n'est peut être pas due à une inhibition spécifique du NMD mais elle aurait lieu, au moins en partie, comme conséquence d'une inhibition partielle de la molécule sur la traduction.

Une autre possibilité serait que les filaments d'actine sont nécessaires pour transporter les ARNm non-sens vers leur lieu de dégradation, et que lorsque les filaments sont détruits par le traitement avec le jasplakinolide, les ARNm non-sens s'accumulent et ne sont plus dégradés. Un aspect qui sera important d'examiner est la localisation des ARNm non-sens qui sont stabilisés, pour savoir s'ils restent diffus dans le cytoplasme, ou si par contre ils sont stockés dans un endroit particulier comme par exemple dans les P-bodies. De façon intéressante, nous avons observé des différences dans l'effet du jasplakinolide sur des P-bodies contenant DCP1a ou Ge-1. En effet, alors que les P-bodies contenant DCP1a ne semblent pas être altérés, ceux contenant Ge-1 semblent diminuer en taille et augmenter en nombre en présence de jasplakinolide. Ces observations suggèrent que la perturbation du

---

cytosquelette d'actine peut affecter de façon différente les P-bodies contenant DCP1a ou Ge-1. Un effet différentiel sur les deux types de P-bodies a été observé précédemment dans des cellules dans lesquelles le NMD a été inhibé par traitement avec la molécule NMDI1 (Durand et al. 2007). Il sera intéressant de déterminer si les ARNm non-sens stabilisés par le jasplakinolide co-localisent ou non avec l'un ou les deux types de P-bodies. Cette étude pourra nous permettre de comprendre le rôle potentiel du cytosquelette dans les mécanismes de reconnaissance, transport et dégradation des ARNm soumis au NMD.

---

## BIBLIOGRAPHIE

- Aartsma-Rus, A. 2010. Antisense-mediated modulation of splicing: therapeutic implications for Duchenne muscular dystrophy. *RNA Biol* **7**(4): 453-461.
- Aartsma-Rus, A., Fokkema, I., Verschuuren, J., Ginjaar, I., van Deutekom, J., van Ommen, G.J., and den Dunnen, J.T. 2009. Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum Mutat* **30**(3): 293-299.
- Abraham, R.T. 2004. PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 883-887.
- Agashe, V.R. and Hartl, F.U. 2000. Roles of molecular chaperones in cytoplasmic protein folding. *Semin Cell Dev Biol* **11**(1): 15-25.
- Aizer, A., Brody, Y., Ler, L.W., Sonenberg, N., Singer, R.H., and Shav-Tal, Y. 2008. The dynamics of mammalian P body transport, assembly, and disassembly in vivo. *Molecular biology of the cell* **19**(10): 4154-4166.
- Ajamian, L., Abrahamyan, L., Milev, M., Ivanov, P.V., Kulozik, A.E., Gehring, N.H., and Mouland, A.J. 2008. Unexpected roles for UPF1 in HIV-1 RNA metabolism and translation. *RNA* **14**(5): 914-927.
- Allingham, J.S., Klenchin, V.A., and Rayment, I. 2006. Actin-targeting natural products: structures, properties and mechanisms of action. *Cell Mol Life Sci* **63**(18): 2119-2134.
- Amrani, N., Dong, S., He, F., Ganesan, R., Ghosh, S., Kervestin, S., Li, C., Mangus, D.A., Spatrick, P., and Jacobson, A. 2006a. Aberrant termination triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Biochemical Society transactions* **34**(Pt 1): 39-42.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., and Jacobson, A. 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **432**(7013): 112-118.
- Amrani, N., Sachs, M.S., and Jacobson, A. 2006b. Early nonsense: mRNA decay solves a translational problem. *Nature reviews Molecular cell biology* **7**(6): 415-425.
- Andersen, C.B., Ballut, L., Johansen, J.S., Chamieh, H., Nielsen, K.H., Oliveira, C.L., Pedersen, J.S., Seraphin, B., Le Hir, H., and Andersen, G.R. 2006. Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. *Science* **313**(5795): 1968-1972.
- Anderson, J.L., Head, S.I., Rae, C., and Morley, J.W. 2002. Brain function in Duchenne muscular dystrophy. *Brain* **125**(Pt 1): 4-13.
- Apcher, S., Daskalogianni, C., Lejeune, F., Manoury, B., Imhoos, G., Heslop, L., and Fahraeus, R. 2011. Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(28): 11572-11577.
- Applequist, S.E., Selg, M., Raman, C., and Jack, H.M. 1997. Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense mRNA-reducing UPF1 protein. *Nucleic acids research* **25**(4): 814-821.
- Ashton, L.J., Brooks, D.A., McCourt, P.A., Muller, V.J., Clements, P.R., and Hopwood, J.J. 1992. Immunoquantification and enzyme kinetics of alpha-L-iduronidase in cultured fibroblasts from normal controls and mucopolysaccharidosis type I patients. *American journal of human genetics* **50**(4): 787-794.

- Azzalin, C.M. and Lingner, J. 2006a. The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways. *Cell Cycle* **5**(14): 1496-1498.
- . 2006b. The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Current biology : CB* **16**(4): 433-439.
- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriantuli, L., Giulotto, E., and Lingner, J. 2007. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* **318**(5851): 798-801.
- Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Seraphin, B., and Le Hir, H. 2005. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nature structural & molecular biology* **12**(10): 861-869.
- Bashkirov, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.M., and Heyer, W.D. 1997. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol* **136**(4): 761-773.
- Bateman, J.F., Freddi, S., Natrass, G., and Savarirayan, R. 2003. Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage. *Hum Mol Genet* **12**(3): 217-225.
- Bedwell, D.M., Kaenjak, A., Benos, D.J., Bebok, Z., Buben, J.K., Hong, J., Tousson, A., Clancy, J.P., and Sorscher, E.J. 1997. Suppression of a CFTR premature stop mutation in a bronchial epithelial cell line. *Nat Med* **3**(11): 1280-1284.
- Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Rehwinkel, J., Hilgers, V., and Izaurralde, E. 2007a. A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal* **26**(6): 1591-1601.
- Behm-Ansmant, I., Kashima, I., Rehwinkel, J., Sauliere, J., Wittkopp, N., and Izaurralde, E. 2007b. mRNA quality control: an ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Lett* **581**(15): 2845-2853.
- Bessonov, S., Anokhina, M., Will, C.L., Urlaub, H., and Luhrmann, R. 2008. Isolation of an active step I spliceosome and composition of its RNP core. *Nature* **452**(7189): 846-850.
- Bhattacharya, A., Czapinski, K., Trifillis, P., He, F., Jacobson, A., and Peltz, S.W. 2000. Characterization of the biochemical properties of the human Upf1 gene product that is involved in nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* **6**(9): 1226-1235.
- Bidou, L., Hatin, I., Perez, N., Allamand, V., Panthier, J.J., and Rousset, J.P. 2004. Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. *Gene Ther* **11**(7): 619-627.
- Black, D.L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* **72**: 291-336.
- Bobadilla, J.L., Macek, M., Jr., Fine, J.P., and Farrell, P.M. 2002. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations--correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* **19**(6): 575-606.
- Boelz, S., Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2006. A chemiluminescence-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay. *Biochem Biophys Res Commun* **349**(1): 186-191.
- Bonetti, B., Fu, L., Moon, J., and Bedwell, D.M. 1995. The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of molecular biology* **251**(3): 334-345.

- Bourgeois, C.F., Lejeune, F., and Stevenin, J. 2004. Broad specificity of SR (serine/arginine) proteins in the regulation of alternative splicing of pre-messenger RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **78**: 37-88.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. 2000. Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* **102**(6): 765-775.
- Brendel, C., Belakhov, V., Werner, H., Wegener, E., Gartner, J., Nudelman, I., Baasov, T., and Huppke, P. 2011. Readthrough of nonsense mutations in Rett syndrome: evaluation of novel aminoglycosides and generation of a new mouse model. *J Mol Med (Berl)* **89**(4): 389-398.
- Bregues, M., Teixeira, D., and Parker, R. 2005. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**(5747): 486-489.
- Brocke, K.S., Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2002. The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Hum Mol Genet* **11**(3): 331-335.
- Brown, J.T., Bai, X., and Johnson, A.W. 2000. The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA* **6**(3): 449-457.
- Brumbaugh, K.M., Otterness, D.M., Geisen, C., Oliveira, V., Brognard, J., Li, X., Lejeune, F., Tibbetts, R.S., Maquat, L.E., and Abraham, R.T. 2004. The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Molecular cell* **14**(5): 585-598.
- Brumm, H., Muhlhaus, J., Bolze, F., Scherag, S., Hinney, A., Hebebrand, J., Wiegand, S., Klingenspor, M., Gruters, A., Krude, H., and Biebermann, H. 2011. Rescue of Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Nonsense Mutations by Aminoglycoside-Mediated Read-Through. *Obesity (Silver Spring)*.
- Brummett, R.E. and Fox, K.E. 1989. Aminoglycoside-induced hearing loss in humans. *Antimicrob Agents Chemother* **33**(6): 797-800.
- Bubb, M.R., Senderowicz, A.M., Sausville, E.A., Duncan, K.L., and Korn, E.D. 1994. Jasplakinolide, a cytotoxic natural product, induces actin polymerization and competitively inhibits the binding of phalloidin to F-actin. *The Journal of biological chemistry* **269**(21): 14869-14871.
- Bubb, M.R., Spector, I., Beyer, B.B., and Fosen, K.M. 2000. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *The Journal of biological chemistry* **275**(7): 5163-5170.
- Buchan, J.R. and Stansfield, I. 2007. Halting a cellular production line: responses to ribosomal pausing during translation. *Biol Cell* **99**(9): 475-487.
- Buchwald, G., Ebert, J., Basquin, C., Sauliere, J., Jayachandran, U., Bono, F., Le Hir, H., and Conti, E. 2010. Insights into the recruitment of the NMD machinery from the crystal structure of a core EJC-UPF3b complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(22): 10050-10055.
- Buhler, M., Steiner, S., Mohn, F., Paillusson, A., and Muhlemann, O. 2006. EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin-mu mRNA depends on 3' UTR length. *Nat Struct Mol Biol* **13**(5): 462-464.
- Buhler, M., Wilkinson, M.F., and Muhlemann, O. 2002. Intranuclear degradation of nonsense codon-containing mRNA. *EMBO Rep* **3**(7): 646-651.

- Buvoli, M., Buvoli, A., and Leinwand, L.A. 2000. Suppression of nonsense mutations in cell culture and mice by multimerized suppressor tRNA genes. *Molecular and cellular biology* **20**(9): 3116-3124.
- Cali, B.M., Kuchma, S.L., Latham, J., and Anderson, P. 1999. smg-7 is required for mRNA surveillance in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **151**(2): 605-616.
- Caputi, M., Kendzior, R.J., Jr., and Beemon, K.L. 2002. A nonsense mutation in the fibrillin-1 gene of a Marfan syndrome patient induces NMD and disrupts an exonic splicing enhancer. *Genes & development* **16**(14): 1754-1759.
- Carbonaro, M., O'Brate, A., and Giannakakou, P. 2011. Microtubule disruption targets HIF-1 $\alpha$  mRNA to cytoplasmic P-bodies for translational repression. *J Cell Biol* **192**(1): 83-99.
- Cardinali, M., Kratochvil, F.J., Ensley, J.F., Robbins, K.C., and Yeudall, W.A. 1997. Functional characterization in vivo of mutant p53 molecules derived from squamous cell carcinomas of the head and neck. *Mol Carcinog* **18**(2): 78-88.
- Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature reviews Genetics* **3**(4): 285-298.
- Carter, M.S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R.P., Sandstedt, S., and Wilkinson, M.F. 1995. A regulatory mechanism that detects premature nonsense codons in T-cell receptor transcripts in vivo is reversed by protein synthesis inhibitors in vitro. *The Journal of biological chemistry* **270**(48): 28995-29003.
- Carter, M.S., Li, S., and Wilkinson, M.F. 1996. A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *The EMBO journal* **15**(21): 5965-5975.
- Cassan, M. and Rousset, J.P. 2001. UAG readthrough in mammalian cells: effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC Mol Biol* **2**: 3.
- Chan, C.C., Dostie, J., Diem, M.D., Feng, W., Mann, M., Rappsilber, J., and Dreyfuss, G. 2004. eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* **10**(2): 200-209.
- Chang, Y.F., Chan, W.K., Imam, J.S., and Wilkinson, M.F. 2007. Alternatively spliced T-cell receptor transcripts are up-regulated in response to disruption of either splicing elements or reading frame. *The Journal of biological chemistry* **282**(41): 29738-29747.
- Chatel-Chaix, L., Clement, J.F., Martel, C., Beriault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., and Mouland, A.J. 2004. Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Molecular and cellular biology* **24**(7): 2637-2648.
- Chemin, G., Tinguely, A., Sirac, C., Lechouane, F., Duchez, S., Cogne, M., and Delpy, L. 2010. Multiple RNA surveillance mechanisms cooperate to reduce the amount of nonfunctional Ig kappa transcripts. *J Immunol* **184**(9): 5009-5017.
- Chen, C.Y. and Shyu, A.B. 2003. Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. *Molecular and cellular biology* **23**(14): 4805-4813.
- Cheng, J., Belgrader, P., Zhou, X., and Maquat, L.E. 1994. Introns are cis effectors of the nonsense-codon-mediated reduction in nuclear mRNA abundance. *Molecular and cellular biology* **14**(9): 6317-6325.
- Cheng, J., Fogel-Petrovic, M., and Maquat, L.E. 1990. Translation to near the distal end of the penultimate exon is required for normal levels of spliced triosephosphate isomerase mRNA. *Molecular and cellular biology* **10**(10): 5215-5225.

- Chiu, S.Y., Lejeune, F., Ranganathan, A.C., and Maquat, L.E. 2004. The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes & development* **18**(7): 745-754.
- Chiu, S.Y., Serin, G., Ohara, O., and Maquat, L.E. 2003. Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA* **9**(1): 77-87.
- Clancy, J.P., Bebok, Z., Ruiz, F., King, C., Jones, J., Walker, L., Greer, H., Hong, J., Wing, L., Macaluso, M., Lyrene, R., Sorscher, E.J., and Bedwell, D.M. 2001. Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **163**(7): 1683-1692.
- Clancy, J.P., Rowe, S.M., Bebok, Z., Aitken, M.L., Gibson, R., Zeitlin, P., Berclaz, P., Moss, R., Knowles, M.R., Oster, R.A., Mayer-Hamblett, N., and Ramsey, B. 2007. No detectable improvements in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator by nasal aminoglycosides in patients with cystic fibrosis with stop mutations. *Am J Respir Cell Mol Biol* **37**(1): 57-66.
- Coller, J. and Parker, R. 2004. Eukaryotic mRNA decapping. *Annu Rev Biochem* **73**: 861-890.
- Contet, C., Dierich, A., and Kieffer, B.L. 2007. Knock-in mice reveal nonsense-mediated mRNA decay in the brain. *Genesis* **45**(1): 38-43.
- Conti, E. and Izaurralde, E. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Current opinion in cell biology* **17**(3): 316-325.
- Cooper, J.A. 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* **105**(4): 1473-1478.
- Correa-Cerro, L.S., Wassif, C.A., Waye, J.S., Krakowiak, P.A., Cozma, D., Dobson, N.R., Levin, S.W., Anadiotis, G., Steiner, R.D., Krajewska-Walasek, M., Nowaczyk, M.J., and Porter, F.D. 2005. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *J Med Genet* **42**(4): 350-357.
- Cougot, N., Babajko, S., and Seraphin, B. 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* **165**(1): 31-40.
- Couttet, P. and Grange, T. 2004. Premature termination codons enhance mRNA decapping in human cells. *Nucleic Acids Res* **32**(2): 488-494.
- Crawford, G.E., Faulkner, J.A., Crosbie, R.H., Campbell, K.P., Froehner, S.C., and Chamberlain, J.S. 2000. Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J Cell Biol* **150**(6): 1399-1410.
- Culbertson, M.R. and Leeds, P.F. 2003. Looking at mRNA decay pathways through the window of molecular evolution. *Current opinion in genetics & development* **13**(2): 207-214.
- Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Paushkin, S.V., Han, X., Weng, Y., Perlick, H.A., Dietz, H.C., Ter-Avanesyan, M.D., and Peltz, S.W. 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes & development* **12**(11): 1665-1677.
- da Paula, A.C., Ramalho, A.S., Farinha, C.M., Cheung, J., Maurisse, R., Gruenert, D.C., Ousingsawat, J., Kunzelmann, K., and Amaral, M.D. 2005. Characterization of novel airway submucosal gland cell models for cystic fibrosis studies. *Cell Physiol Biochem* **15**(6): 251-262.
- Daar, I.O. and Maquat, L.E. 1988. Premature translation termination mediates triosephosphate isomerase mRNA degradation. *Molecular and cellular biology* **8**(2): 802-813.

- Dahlberg, J.E., Lund, E., and Goodwin, E.B. 2003. Nuclear translation: what is the evidence? *RNA* **9**(1): 1-8.
- Dahlseid, J.N., Lew-Smith, J., Lelivelt, M.J., Enomoto, S., Ford, A., Desruisseaux, M., McClellan, M., Lue, N., Culbertson, M.R., and Berman, J. 2003. mRNAs encoding telomerase components and regulators are controlled by UPF genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **2**(1): 134-142.
- Dang, Y., Low, W.K., Xu, J., Gehring, N.H., Dietz, H.C., Romo, D., and Liu, J.O. 2009. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay by the natural product pateamine A through eukaryotic initiation factor 4AIII. *The Journal of biological chemistry* **284**(35): 23613-23621.
- Dimaano, C. and Ullman, K.S. 2004. Nucleocytoplasmic transport: integrating mRNA production and turnover with export through the nuclear pore. *Mol Cell Biol* **24**(8): 3069-3076.
- Disset, A., Bourgeois, C.F., Benmalek, N., Claustres, M., Stevenin, J., and Tuffery-Giraud, S. 2006. An exon skipping-associated nonsense mutation in the dystrophin gene uncovers a complex interplay between multiple antagonistic splicing elements. *Hum Mol Genet* **15**(6): 999-1013.
- Doma, M.K. and Parker, R. 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**(7083): 561-564.
- Dominski, Z. and Kole, R. 1993. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**(18): 8673-8677.
- dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I.V., Tsubakihara, M., Berry, D.A., and Nosworthy, N.J. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**(2): 433-473.
- Dostie, J. and Dreyfuss, G. 2002. Translation is required to remove Y14 from mRNAs in the cytoplasm. *Curr Biol* **12**(13): 1060-1067.
- Dranchak, P.K., Di Pietro, E., Snowden, A., Oesch, N., Braverman, N.E., Steinberg, S.J., and Hacia, J.G. 2011. Nonsense suppressor therapies rescue peroxisome lipid metabolism and assembly in cells from patients with specific PEX gene mutations. *J Cell Biochem* **112**(5): 1250-1258.
- Du, L., Damoiseaux, R., Nahas, S., Gao, K., Hu, H., Pollard, J.M., Goldstine, J., Jung, M.E., Henning, S.M., Bertonni, C., and Gatti, R.A. 2009. Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations. *J Exp Med* **206**(10): 2285-2297.
- Du, M., Liu, X., Welch, E.M., Hirawat, S., Peltz, S.W., and Bedwell, D.M. 2008. PTC124 is an orally bioavailable compound that promotes suppression of the human CFTR-G542X nonsense allele in a CF mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(6): 2064-2069.
- Durand, S., Cougot, N., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C.H., Grierson, D.S., Bertrand, E., Tazi, J., and Lejeune, F. 2007. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J Cell Biol* **178**(7): 1145-1160.
- Eagle, M., Baudouin, S.V., Chandler, C., Giddings, D.R., Bullock, R., and Bushby, K. 2002. Survival in Duchenne muscular dystrophy: improvements in life expectancy since 1967 and the impact of home nocturnal ventilation. *Neuromuscul Disord* **12**(10): 926-929.



- Eberle, A.B., Lykke-Andersen, S., Muhlemann, O., and Jensen, T.H. 2009. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nature structural & molecular biology* **16**(1): 49-55.
- Eberle, A.B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R.Z., and Muhlemann, O. 2008. Posttranscriptional gene regulation by spatial rearrangement of the 3' untranslated region. *PLoS biology* **6**(4): e92.
- Echeverri, C.J., Beachy, P.A., Baum, B., Boutros, M., Buchholz, F., Chanda, S.K., Downward, J., Ellenberg, J., Fraser, A.G., Hacohen, N., Hahn, W.C., Jackson, A.L., Kiger, A., Linsley, P.S., Lum, L., Ma, Y., Mathy-Prevot, B., Root, D.E., Sabatini, D.M., Taipale, J., Perrimon, N., and Bernards, R. 2006. Minimizing the risk of reporting false positives in large-scale RNAi screens. *Nat Methods* **3**(10): 777-779.
- Ellsworth, R.E., Jamison, D.C., Touchman, J.W., Chisoe, S.L., Braden Maduro, V.V., Bouffard, G.G., Dietrich, N.L., Beckstrom-Sternberg, S.M., Iyer, L.M., Weintraub, L.A., Cotton, M., Courtney, L., Edwards, J., Maupin, R., Ozersky, P., Rohlfing, T., Wohldmann, P., Miner, T., Kemp, K., Kramer, J., Korf, I., Pepin, K., Antonacci-Fulton, L., Fulton, R.S., Minx, P., Hillier, L.W., Wilson, R.K., Waterston, R.H., Miller, W., and Green, E.D. 2000. Comparative genomic sequence analysis of the human and mouse cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(3): 1172-1177.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. 2007a. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(1): 9-22.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. 2007b. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Molecular and cellular biology* **27**(11): 3970-3981.
- Fearon, K., McClendon, V., Bonetti, B., and Bedwell, D.M. 1994. Premature translation termination mutations are efficiently suppressed in a highly conserved region of yeast Ste6p, a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *The Journal of biological chemistry* **269**(27): 17802-17808.
- Fenger-Gron, M., Fillman, C., Norrild, B., and Lykke-Andersen, J. 2005. Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Molecular cell* **20**(6): 905-915.
- Ferraiuolo, M.A., Lee, C.S., Ler, L.W., Hsu, J.L., Costa-Mattioli, M., Luo, M.J., Reed, R., and Sonenberg, N. 2004. A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(12): 4118-4123.
- Floquet, C., Deforges, J., Rousset, J.P., and Bidou, L. 2010. Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. *Nucleic acids research* **39**(8): 3350-3362.
- Franks, T.M. and Lykke-Andersen, J. 2008. The control of mRNA decapping and P-body formation. *Molecular cell* **32**(5): 605-615.
- Franks, T.M., Singh, G., and Lykke-Andersen, J. 2010. Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **143**(6): 938-950.
- Fribourg, S., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Conti, E. 2003. A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex. *Nat Struct Biol* **10**(6): 433-439.
- Friedman, K.J., Kole, J., Cohn, J.A., Knowles, M.R., Silverman, L.M., and Kole, R. 1999. Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)

- gene by antisense oligonucleotides. *The Journal of biological chemistry* **274**(51): 36193-36199.
- Frischmeyer, P.A. and Dietz, H.C. 1999. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Hum Mol Genet* **8**(10): 1893-1900.
- Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerio, A.L., Parker, R., and Dietz, H.C. 2002. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**(5563): 2258-2261.
- Fukuhara, N., Ebert, J., Unterholzner, L., Lindner, D., Izaurralde, E., and Conti, E. 2005. SMG7 is a 14-3-3-like adaptor in the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Molecular cell* **17**(4): 537-547.
- Gallie, D.R. 1998. A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation. *Gene* **216**(1): 1-11.
- Galy, V., Gadal, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A., and Nehrbass, U. 2004. Nuclear retention of unspliced mRNAs in yeast is mediated by perinuclear Mlp1. *Cell* **116**(1): 63-73.
- Gandhi, R., Manzoor, M., and Hudak, K.A. 2008. Depurination of Brome mosaic virus RNA3 in vivo results in translation-dependent accelerated degradation of the viral RNA. *The Journal of biological chemistry* **283**(47): 32218-32228.
- Gardner, L.B. 2008. Hypoxic inhibition of nonsense-mediated RNA decay regulates gene expression and the integrated stress response. *Molecular and cellular biology* **28**(11): 3729-3741.
- Gatfield, D. and Izaurralde, E. 2004. Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in Drosophila. *Nature* **429**(6991): 575-578.
- Gehring, N.H., Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Breit, S., Viegas, M.H., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2005. Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Molecular cell* **20**(1): 65-75.
- Gehring, N.H., Lamprinaki, S., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2009. The hierarchy of exon-junction complex assembly by the spliceosome explains key features of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS biology* **7**(5): e1000120.
- Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2003. Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Molecular cell* **11**(4): 939-949.
- Ginjaar, I.B., Kneppers, A.L., v d Meulen, J.D., Anderson, L.V., Bremmer-Bout, M., van Deutekom, J.C., Weegenaar, J., den Dunnen, J.T., and Bakker, E. 2000. Dystrophin nonsense mutation induces different levels of exon 29 skipping and leads to variable phenotypes within one BMD family. *Eur J Hum Genet* **8**(10): 793-796.
- Glavan, F., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., and Conti, E. 2006. Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *The EMBO journal* **25**(21): 5117-5125.
- Goldmann, T., Overlack, N., Wolfrum, U., and Nagel-Wolfrum, K. 2011. PTC124-mediated translational readthrough of a nonsense mutation causing Usher syndrome type 1C. *Hum Gene Ther* **22**(5): 537-547.
- Goldstrohm, A.C. and Wickens, M. 2008. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4): 337-344.

- Gong, C., Kim, Y.K., Woeller, C.F., Tang, Y., and Maquat, L.E. 2008. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & development* **23**(1): 54-66.
- Gonzalez, C.I., Ruiz-Echevarria, M.J., Vasudevan, S., Henry, M.F., and Peltz, S.W. 2000. The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. *Molecular cell* **5**(3): 489-499.
- Hall, G.W. and Thein, S. 1994. Nonsense codon mutations in the terminal exon of the beta-globin gene are not associated with a reduction in beta-mRNA accumulation: a mechanism for the phenotype of dominant beta-thalassemia. *Blood* **83**(8): 2031-2037.
- He, F., Li, X., Spatrick, P., Casillo, R., Dong, S., and Jacobson, A. 2003. Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Molecular cell* **12**(6): 1439-1452.
- Hendry, L.B., Mahesh, V.B., Bransome, E.D., Jr., and Ewing, D.E. 2007. Small molecule intercalation with double stranded DNA: implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutat Res* **623**(1-2): 53-71.
- Hentze, M.W. and Kulozik, A.E. 1999. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* **96**(3): 307-310.
- Hesketh, J.E. and Pryme, I.F. 1988. Evidence that insulin increases the proportion of polysomes that are bound to the cytoskeleton in 3T3 fibroblasts. *FEBS Lett* **231**(1): 62-66.
- Highsmith, W.E., Burch, L.H., Zhou, Z., Olsen, J.C., Boat, T.E., Spock, A., Gorvoy, J.D., Quittel, L., Friedman, K.J., Silverman, L.M., and et al. 1994. A novel mutation in the cystic fibrosis gene in patients with pulmonary disease but normal sweat chloride concentrations. *N Engl J Med* **331**(15): 974-980.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T.H. 2001. Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* **413**(6855): 538-542.
- Hocine, S., Singer, R.H., and Grunwald, D. 2010. RNA processing and export. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(12): a000752.
- Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2004. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature genetics* **36**(8): 801-808.
- Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., and Katada, T. 1999. The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **274**(24): 16677-16680.
- Hosoda, N., Kim, Y.K., Lejeune, F., and Maquat, L.E. 2005. CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology* **12**(10): 893-901.
- Howe, J.G. and Hershey, J.W. 1984. Translational initiation factor and ribosome association with the cytoskeletal framework fraction from HeLa cells. *Cell* **37**(1): 85-93.
- Hu, W., Sweet, T.J., Chamnongpol, S., Baker, K.E., and Collier, J. 2009. Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **461**(7261): 225-229.
- Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Sauliere, J., and Izaurralde, E. 2008. SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* **14**(12): 2609-2617.

- Hwang, J., Sato, H., Tang, Y., Matsuda, D., and Maquat, L.E. 2010. UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Molecular cell* **39**(3): 396-409.
- Inada, T. and Aiba, H. 2005. Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *The EMBO journal* **24**(8): 1584-1595.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Luhrmann, R., and Achsel, T. 2002. The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA* **8**(12): 1489-1501.
- Inoue, K., Khajavi, M., Ohyama, T., Hirabayashi, S., Wilson, J., Reggin, J.D., Mancias, P., Butler, I.J., Wilkinson, M.F., Wegner, M., and Lupski, J.R. 2004. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nature genetics* **36**(4): 361-369.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., and Maquat, L.E. 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* **106**(5): 607-617.
- Isken, O., Kim, Y.K., Hosoda, N., Mayeur, G.L., Hershey, J.W., and Maquat, L.E. 2008. Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **133**(2): 314-327.
- Isken, O. and Maquat, L.E. 2007. Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes & development* **21**(15): 1833-1856.
- . 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nature reviews Genetics* **9**(9): 699-712.
- Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2008. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *The EMBO journal* **27**(5): 736-747.
- Joerger, A.C. and Fersht, A.R. 2007. Structural biology of the tumor suppressor p53 and cancer-associated mutants. *Adv Cancer Res* **97**: 1-23.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* **24**: 541-570.
- Jurica, M.S., Licklider, L.J., Gygi, S.R., Grigorieff, N., and Moore, M.J. 2002. Purification and characterization of native spliceosomes suitable for three-dimensional structural analysis. *RNA* **8**(4): 426-439.
- Kadlec, J., Guilligay, D., Ravelli, R.B., and Cusack, S. 2006. Crystal structure of the UPF2-interacting domain of nonsense-mediated mRNA decay factor UPF1. *RNA* **12**(10): 1817-1824.
- Kadlec, J., Izaurralde, E., and Cusack, S. 2004. The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nature structural & molecular biology* **11**(4): 330-337.
- Kaminska, M., Havrylenko, S., Decottignies, P., Le Marechal, P., Negrutskii, B., and Mirande, M. 2009. Dynamic Organization of Aminoacyl-tRNA Synthetase Complexes in the Cytoplasm of Human Cells. *The Journal of biological chemistry* **284**(20): 13746-13754.
- Karam, R., Carvalho, J., Bruno, I., Graziadio, C., Senz, J., Huntsman, D., Carneiro, F., Seruca, R., Wilkinson, M.F., and Oliveira, C. 2008. The NMD mRNA surveillance pathway

- downregulates aberrant E-cadherin transcripts in gastric cancer cells and in CDH1 mutation carriers. *Oncogene* **27**(30): 4255-4260.
- Kashima, I., Jonas, S., Jayachandran, U., Buchwald, G., Conti, E., Lupas, A.N., and Izaurralde, E. 2010. SMG6 interacts with the exon junction complex via two conserved EJC-binding motifs (EBMs) required for nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & development* **24**(21): 2440-2450.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & development* **20**(3): 355-367.
- Kataoka, N., Diem, M.D., Kim, V.N., Yong, J., and Dreyfuss, G. 2001. Magoh, a human homolog of *Drosophila mago nashi* protein, is a component of the splicing-dependent exon-exon junction complex. *The EMBO journal* **20**(22): 6424-6433.
- Kataoka, N., Yong, J., Kim, V.N., Velazquez, F., Perkinson, R.A., Wang, F., and Dreyfuss, G. 2000. Pre-mRNA splicing imprints mRNA in the nucleus with a novel RNA-binding protein that persists in the cytoplasm. *Molecular cell* **6**(3): 673-682.
- Kawasaki, T., Tomita, Y., Watanabe, R., Tanikawa, T., Kumanishi, T., and Sato, S. 1994. mRNA and protein expression of p53 mutations in human bladder cancer cell lines. *Cancer Lett* **82**(1): 113-121.
- Keeling, K.M. and Bedwell, D.M. 2002. Clinically relevant aminoglycosides can suppress disease-associated premature stop mutations in the IDUA and P53 cDNAs in a mammalian translation system. *J Mol Med (Berl)* **80**(6): 367-376.
- Keeling, K.M., Brooks, D.A., Hopwood, J.J., Li, P., Thompson, J.N., and Bedwell, D.M. 2001. Gentamicin-mediated suppression of Hurler syndrome stop mutations restores a low level of alpha-L-iduronidase activity and reduces lysosomal glycosaminoglycan accumulation. *Hum Mol Genet* **10**(3): 291-299.
- Keeling, K.M., Du, M., and Bedwell, D.M. 2005. Therapies of Nonsense-Associated Diseases. *Eurekah Bioscience* **1**(6): 494-502.
- Kerem, E., Hirawat, S., Armoni, S., Yaakov, Y., Shoseyov, D., Cohen, M., Nissim-Rafinia, M., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., Elfring, G.L., Northcutt, V.J., Miller, L.L., Kerem, B., and Wilschanski, M. 2008. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* **372**(9640): 719-727.
- Khanna, R. and Kiledjian, M. 2004. Poly(A)-binding-protein-mediated regulation of hDcp2 decapping in vitro. *EMBO J* **23**(9): 1968-1976.
- Kim, E., Magen, A., and Ast, G. 2007a. Different levels of alternative splicing among eukaryotes. *Nucleic Acids Res* **35**(1): 125-131.
- Kim, S. and Coulombe, P.A. 2010. Emerging role for the cytoskeleton as an organizer and regulator of translation. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**(1): 75-81.
- Kim, V.N., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. 2001. Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science* **293**(5536): 1832-1836.
- Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., and Maquat, L.E. 2005. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**(2): 195-208.
- Kim, Y.K., Furic, L., Parisien, M., Major, F., DesGroseillers, L., and Maquat, L.E. 2007b. Staufen1 regulates diverse classes of mammalian transcripts. *The EMBO journal* **26**(11): 2670-2681.

- Kiselev, A.V., Ostapenko, O.V., Rogozhkina, E.V., Kholod, N.S., Seit Nebi, A.S., Baranov, A.N., Lesina, E.A., Ivashchenko, T.E., Sabetskii, V.A., Shavlovskii, M.M., Rechinskii, V.O., Kiselev, L.L., and Baranov, V.C. 2002. [Suppression of nonsense mutations in the Dystrophin gene by a suppressor tRNA gene]. *Mol Biol (Mosk)* **36**(1): 43-47.
- Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**(2): 219-228.
- Kraemer, A.M., Saraiva, L.R., and Korsching, S.I. 2008. Structural and functional diversification in the teleost S100 family of calcium-binding proteins. *BMC Evol Biol* **8**: 48.
- Kulkarni, M., Ozgur, S., and Stoecklin, G. 2010. On track with P-bodies. *Biochem Soc Trans* **38**(Pt 1): 242-251.
- Kumar, S. and Lopez, A.J. 2005. Negative feedback regulation among SR splicing factors encoded by Rbp1 and Rbp1-like in *Drosophila*. *The EMBO journal* **24**(14): 2646-2655.
- Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., and Gehring, N.H. 2006. Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. *RNA* **12**(6): 1015-1022.
- Kuzmiak, H.A. and Maquat, L.E. 2006. Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: progress and challenges. *Trends in molecular medicine* **12**(7): 306-316.
- Landriscina, M., Prudovsky, I., Mouta Carreira, C., Soldi, R., Tarantini, F., and Maciag, T. 2000. Amlexanox reversibly inhibits cell migration and proliferation and induces the Src-dependent disassembly of actin stress fibers in vitro. *The Journal of biological chemistry* **275**(42): 32753-32762.
- Lapidos, K.A., Kakkar, R., and McNally, E.M. 2004. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* **94**(8): 1023-1031.
- Lareau, L.F., Inada, M., Green, R.E., Wengrod, J.C., and Brenner, S.E. 2007. Unproductive splicing of SR genes associated with highly conserved and ultraconserved DNA elements. *Nature* **446**(7138): 926-929.
- Lazaro-Dieguez, F., Aguado, C., Mato, E., Sanchez-Ruiz, Y., Esteban, I., Alberch, J., Knecht, E., and Egea, G. 2008. Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. *Journal of cell science* **121**(Pt 9): 1415-1425.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Braun, I.C., Forler, D., and Izaurralde, E. 2001a. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. *EMBO reports* **2**(12): 1119-1124.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M.J. 2001b. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO journal* **20**(17): 4987-4997.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., and Moore, M.J. 2000a. The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *The EMBO journal* **19**(24): 6860-6869.
- Le Hir, H., Moore, M.J., and Maquat, L.E. 2000b. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes & development* **14**(9): 1098-1108.
- Leeds, P., Wood, J.M., Lee, B.S., and Culbertson, M.R. 1992. Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **12**(5): 2165-2177.
- Lehman, T.A., Bennett, W.P., Metcalf, R.A., Welsh, J.A., Ecker, J., Modali, R.V., Ullrich, S., Romano, J.W., Appella, E., Testa, J.R., and et al. 1991. p53 mutations, ras mutations, and

- p53-heat shock 70 protein complexes in human lung carcinoma cell lines. *Cancer Res* **51**(15): 4090-4096.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., and Maquat, L.E. 2002. The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *The EMBO journal* **21**(13): 3536-3545.
- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L.E. 2003. Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Molecular cell* **12**(3): 675-687.
- Lejeune, F. and Maquat, L.E. 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Current opinion in cell biology* **17**(3): 309-315.
- Lejeune, F., Ranganathan, A.C., and Maquat, L.E. 2004. eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells. *Nature structural & molecular biology* **11**(10): 992-1000.
- Lewis, B.P., Green, R.E., and Brenner, S.E. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(1): 189-192.
- Li, B., Wachtel, C., Miriami, E., Yahalom, G., Friedlander, G., Sharon, G., Sperling, R., and Sperling, J. 2002. Stop codons affect 5' splice site selection by surveillance of splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(8): 5277-5282.
- Li, S. and Wilkinson, M.F. 1998. Nonsense surveillance in lymphocytes? *Immunity* **8**(2): 135-141.
- Linde, L., Boelz, S., Neu-Yilik, G., Kulozik, A.E., and Kerem, B. 2007a. The efficiency of nonsense-mediated mRNA decay is an inherent character and varies among different cells. *Eur J Hum Genet* **15**(11): 1156-1162.
- Linde, L., Boelz, S., Nissim-Rafinia, M., Oren, Y.S., Wilschanski, M., Yaacov, Y., Virgilis, D., Neu-Yilik, G., Kulozik, A.E., Kerem, E., and Kerem, B. 2007b. Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *J Clin Invest* **117**(3): 683-692.
- Linde, L. and Kerem, B. Nonsense-mediated mRNA decay and cystic fibrosis. *Methods Mol Biol* **741**: 137-154.
- . 2008. Introducing sense into nonsense in treatments of human genetic diseases. *Trends Genet* **24**(11): 552-563.
- Liu, Y. and Bodmer, W.F. 2006. Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(4): 976-981.
- Longman, D., Plasterk, R.H., Johnstone, I.L., and Caceres, J.F. 2007. Mechanistic insights and identification of two novel factors in the *C. elegans* NMD pathway. *Genes & development* **21**(9): 1075-1085.
- Lu, Q.L., Mann, C.J., Lou, F., Bou-Gharios, G., Morris, G.E., Xue, S.A., Fletcher, S., Partridge, T.A., and Wilton, S.D. 2003. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* **9**(8): 1009-1014.
- Lykke-Andersen, J. 2002. Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol* **22**(23): 8114-8121.

- Lykke-Andersen, J., Shu, M.D., and Steitz, J.A. 2000. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell* **103**(7): 1121-1131.
- . 2001. Communication of the position of exon-exon junctions to the mRNA surveillance machinery by the protein RNPS1. *Science* **293**(5536): 1836-1839.
- Makarov, E.M., Makarova, O.V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C.L., Wilm, M., and Luhrmann, R. 2002. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298**(5601): 2205-2208.
- Mann, C.J., Honeyman, K., Cheng, A.J., Ly, T., Lloyd, F., Fletcher, S., Morgan, J.E., Partridge, T.A., and Wilton, S.D. 2001. Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(1): 42-47.
- Mansoura, M.K., Biwersi, J., Ashlock, M.A., and Verkman, A.S. 1999. Fluorescent chloride indicators to assess the efficacy of CFTR cDNA delivery. *Hum Gene Ther* **10**(6): 861-875.
- Manuvakhova, M., Keeling, K., and Bedwell, D.M. 2000. Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* **6**(7): 1044-1055.
- Maquat, L.E. 1995. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* **1**(5): 453-465.
- Maquat, L.E. and Li, X. 2001. Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA* **7**(3): 445-456.
- Marutani, M., Tonoki, H., Tada, M., Takahashi, M., Kashiwazaki, H., Hida, Y., Hamada, J., Asaka, M., and Moriuchi, T. 1999. Dominant-negative mutations of the tumor suppressor p53 relating to early onset of glioblastoma multiforme. *Cancer Res* **59**(19): 4765-4769.
- Matsuda, D., Hosoda, N., Kim, Y.K., and Maquat, L.E. 2007. Failsafe nonsense-mediated mRNA decay does not detectably target eIF4E-bound mRNA. *Nature structural & molecular biology* **14**(10): 974-979.
- McCaughan, K.K., Brown, C.M., Dalphin, M.E., Berry, M.J., and Tate, W.P. 1995. Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(12): 5431-5435.
- McIlwain, D.R., Pan, Q., Reilly, P.T., Elia, A.J., McCracken, S., Wakeham, A.C., Itie-Youten, A., Blencowe, B.J., and Mak, T.W. 2010. Smg1 is required for embryogenesis and regulates diverse genes via alternative splicing coupled to nonsense-mediated mRNA decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(27): 12186-12191.
- Medghalchi, S.M., Frischmeyer, P.A., Mendell, J.T., Kelly, A.G., Lawler, A.M., and Dietz, H.C. 2001. Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum Mol Genet* **10**(2): 99-105.
- Mendell, J.T., ap Rhys, C.M., and Dietz, H.C. 2002. Separable roles for rent1/hUpf1 in altered splicing and decay of nonsense transcripts. *Science* **298**(5592): 419-422.
- Mendell, J.T., Medghalchi, S.M., Lake, R.G., Noensie, E.N., and Dietz, H.C. 2000. Novel Upf2p orthologues suggest a functional link between translation initiation and nonsense surveillance complexes. *Molecular and cellular biology* **20**(23): 8944-8957.



- Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F., and Dietz, H.C. 2004. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutates genomic noise. *Nature genetics* **36**(10): 1073-1078.
- Meng, W., Dong, Y., Liu, J., Wang, Z., Zhong, X., Chen, R., Zhou, H., Lin, M., Jiang, L., Gao, F., Xu, T., Chen, Q., and Zeng, X. 2009. A clinical evaluation of amlexanox oral adhesive pellicles in the treatment of recurrent aphthous stomatitis and comparison with amlexanox oral tablets: a randomized, placebo controlled, blinded, multicenter clinical trial. *Trials* **10**: 30.
- Mingeot-Leclercq, M.P. and Tulkens, P.M. 1999. Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1003-1012.
- Mitchell, P. and Tollervey, D. 2000. mRNA stability in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* **10**(2): 193-198.
- Mitrovich, Q.M. and Anderson, P. 2005. mRNA surveillance of expressed pseudogenes in *C. elegans*. *Current biology : CB* **15**(10): 963-967.
- Mohr, S.E., Dillon, S.T., and Boswell, R.E. 2001. The RNA-binding protein Tsunagi interacts with Mago Nashi to establish polarity and localize oskar mRNA during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev* **15**(21): 2886-2899.
- Monaghan, P. 2010. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Ann N Y Acad Sci* **1206**: 130-142.
- Moriarty, P.M., Reddy, C.C., and Maquat, L.E. 1998. Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Molecular and cellular biology* **18**(5): 2932-2939.
- Morrison, M., Harris, K.S., and Roth, M.B. 1997. smg mutants affect the expression of alternatively spliced SR protein mRNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(18): 9782-9785.
- Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D.N., and Chuzhanova, N.A. 2008. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum Mutat* **29**(8): 1037-1047.
- Mouta Carreira, C., LaVallee, T.M., Tarantini, F., Jackson, A., Lathrop, J.T., Hampton, B., Burgess, W.H., and Maciag, T. 1998. S100A13 is involved in the regulation of fibroblast growth factor-1 and p40 synaptotagmin-1 release in vitro. *The Journal of biological chemistry* **273**(35): 22224-22231.
- Muhlemann, O., Eberle, A.B., Stalder, L., and Zamudio Orozco, R. 2008. Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochim Biophys Acta* **1779**(9): 538-549.
- Muhrad, D. and Parker, R. 1994. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* **370**(6490): 578-581.
- Muller, B., Blackburn, J., Feijoo, C., Zhao, X., and Smythe, C. 2007. DNA-activated protein kinase functions in a newly observed S phase checkpoint that links histone mRNA abundance with DNA replication. *J Cell Biol* **179**(7): 1385-1398.
- Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A. 2003. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* **2**(12): 731-740.
- Nagy, E. and Maquat, L.E. 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in biochemical sciences* **23**(6): 198-199.

- Namy, O., Duchateau-Nguyen, G., and Rousset, J.P. 2002. Translational readthrough of the PDE2 stop codon modulates cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology* **43**(3): 641-652.
- Namy, O., Hatin, I., and Rousset, J.P. 2001. Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO reports* **2**(9): 787-793.
- Nathanson, L., Xia, T., and Deutscher, M.P. 2003. Nuclear protein synthesis: a re-evaluation. *RNA* **9**(1): 9-13.
- Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: from vacuum cleaner to Swiss army knife. *Genome Biol* **5**(4): 218.
- Nudelman, I., Glikin, D., Smolkin, B., Hainrichson, M., Belakhov, V., and Baasov, T. 2010. Repairing faulty genes by aminoglycosides: development of new derivatives of geneticin (G418) with enhanced suppression of diseases-causing nonsense mutations. *Bioorg Med Chem* **18**(11): 3735-3746.
- Nudelman, I., Rebibo-Sabbah, A., Cherniavsky, M., Belakhov, V., Hainrichson, M., Chen, F., Schacht, J., Pilch, D.S., Ben-Yosef, T., and Baasov, T. 2009. Development of novel aminoglycoside (NB54) with reduced toxicity and enhanced suppression of disease-causing premature stop mutations. *J Med Chem* **52**(9): 2836-2845.
- Nudelman, I., Rebibo-Sabbah, A., Shallom-Shezifi, D., Hainrichson, M., Stahl, I., Ben-Yosef, T., and Baasov, T. 2006. Redesign of aminoglycosides for treatment of human genetic diseases caused by premature stop mutations. *Bioorg Med Chem Lett* **16**(24): 6310-6315.
- Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., Anderson, P., and Ohno, S. 2003. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Molecular cell* **12**(5): 1187-1200.
- Okada, M., Tokumitsu, H., Kubota, Y., and Kobayashi, R. 2002. Interaction of S100 proteins with the antiallergic drugs, olopatadine, amlexanox, and cromolyn: identification of putative drug binding sites on S100A1 protein. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(4): 1023-1030.
- Orlova, M., Yueh, A., Leung, J., and Goff, S.P. 2003. Reverse transcriptase of Moloney murine leukemia virus binds to eukaryotic release factor 1 to modulate suppression of translational termination. *Cell* **115**(3): 319-331.
- Ornelles, D.A., Fey, E.G., and Penman, S. 1986. Cytochalasin releases mRNA from the cytoskeletal framework and inhibits protein synthesis. *Molecular and cellular biology* **6**(5): 1650-1662.
- Paillusson, A., Hirschi, N., Vallan, C., Azzalin, C.M., and Muhlemann, O. 2005. A GFP-based reporter system to monitor nonsense-mediated mRNA decay. *Nucleic acids research* **33**(6): e54.
- Pain, V.M. 1994. Translational control during amino acid starvation. *Biochimie* **76**(8): 718-728.
- Palacios, I.M., Gatfield, D., St Johnston, D., and Izaurralde, E. 2004. An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **427**(6976): 753-757.
- Pan, Q., Saltzman, A.L., Kim, Y.K., Misquitta, C., Shai, O., Maquat, L.E., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. 2006. Quantitative microarray profiling provides evidence against widespread

- coupling of alternative splicing with nonsense-mediated mRNA decay to control gene expression. *Genes & development* **20**(2): 153-158.
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nature genetics* **40**(12): 1413-1415.
- Parker, R. and Sheth, U. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* **25**(5): 635-646.
- Parker, R. and Song, H. 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nature structural & molecular biology* **11**(2): 121-127.
- Peltz, S.W., Brown, A.H., and Jacobson, A. 1993. mRNA destabilization triggered by premature translational termination depends on at least three cis-acting sequence elements and one trans-acting factor. *Genes & development* **7**(9): 1737-1754.
- Perlick, H.A., Medghalchi, S.M., Spencer, F.A., Kendzior, R.J., Jr., and Dietz, H.C. 1996. Mammalian orthologues of a yeast regulator of nonsense transcript stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(20): 10928-10932.
- Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M., and Mazoyer, S. 2002. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* **11**(23): 2805-2814.
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., and Olivier, M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* **28**(6): 622-629.
- Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, K.E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J.A., Wooddell, C.I., Xiao, X., and Tremblay, J.P. 2011. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. *Mol Ther* **19**(5): 830-840.
- Politano, L., Nigro, G., Nigro, V., Piluso, G., Papparella, S., Paciello, O., and Comi, L.I. 2003. Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results. *Acta Myol* **22**(1): 15-21.
- Pulak, R. and Anderson, P. 1993. mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes & development* **7**(10): 1885-1897.
- Rafael, J.A., Sunada, Y., Cole, N.M., Campbell, K.P., Faulkner, J.A., and Chamberlain, J.S. 1994. Prevention of dystrophic pathology in mdx mice by a truncated dystrophin isoform. *Hum Mol Genet* **3**(10): 1725-1733.
- Rajavel, K.S. and Neufeld, E.F. 2001. Nonsense-mediated decay of human HEXA mRNA. *Mol Cell Biol* **21**(16): 5512-5519.
- Ramaekers, F.C., Benedetti, E.L., Dunia, I., Vorstenbosch, P., and Bloemendal, H. 1983. Polyribosomes associated with microfilaments in cultured lens cells. *Biochim Biophys Acta* **740**(4): 441-448.
- Ramalho, A.S., Beck, S., Meyer, M., Penque, D., Cutting, G.R., and Amaral, M.D. 2002. Five percent of normal cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA ameliorates the severity of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **27**(5): 619-627.

- Ramani, A.K., Calarco, J.A., Pan, Q., Mavandadi, S., Wang, Y., Nelson, A.C., Lee, L.J., Morris, Q., Blencowe, B.J., Zhen, M., and Fraser, A.G. 2011. Genome-wide analysis of alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Res* **21**(2): 342-348.
- Rehwinkel, J., Letunic, I., Raes, J., Bork, P., and Izaurralde, E. 2005. Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *RNA* **11**(10): 1530-1544.
- Rehwinkel, J., Raes, J., and Izaurralde, E. 2006. Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. *Trends in biochemical sciences* **31**(11): 639-646.
- Reichenbach, P., Hoss, M., Azzalin, C.M., Nabholz, M., Bucher, P., and Lingner, J. 2003. A human homolog of yeast Est1 associates with telomerase and uncaps chromosome ends when overexpressed. *Current biology : CB* **13**(7): 568-574.
- Robbie-Ryan, M. and Brown, M. 2002. The role of mast cells in allergy and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **14**(6): 728-733.
- Rospert, S., Rakwalska, M., and Dubaquié, Y. 2005. Polypeptide chain termination and stop codon readthrough on eukaryotic ribosomes. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **155**: 1-30.
- Rowe, S.M., Sloane, P., Tang, L.P., Backer, K., Mazur, M., Buckley-Lanier, J., Nudelman, I., Belakhov, V., Bebok, Z., Schwiebert, E., Baasov, T., and Bedwell, D.M. 2011. Suppression of CFTR premature termination codons and rescue of CFTR protein and function by the synthetic aminoglycoside NB54. *J Mol Med (Berl)*.
- Rowntree, R.K. and Harris, A. 2003. The phenotypic consequences of CFTR mutations. *Ann Hum Genet* **67**(Pt 5): 471-485.
- Saijo, T., Kuriki, H., Ashida, Y., Makino, H., and Maki, Y. 1985a. Inhibition by amoxanox (AA-673) of the immunologically, leukotriene D<sub>4</sub>- or platelet-activating factor-stimulated bronchoconstriction in guinea pigs and rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **77**(3): 315-321.
- . 1985b. Mechanism of the action of amoxanox (AA-673), an orally active antiallergic agent. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **78**(1): 43-50.
- Saijo, T., Makino, H., Tamura, S., Kuriki, H., Ashida, Y., Terao, S., and Maki, Y. 1986. The antiallergic agent amoxanox suppresses SRS-A generation by inhibiting lipoxygenase. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **79**(3): 231-237.
- Salvatori, F., Breveglieri, G., Zuccato, C., Finotti, A., Bianchi, N., Borgatti, M., Feriotto, G., Destro, F., Canella, A., Brognara, E., Lampronti, I., Breda, L., Rivella, S., and Gambari, R. 2009. Production of beta-globin and adult hemoglobin following G418 treatment of erythroid precursor cells from homozygous beta(0)39 thalassemia patients. *Am J Hematol* **84**(11): 720-728.
- Sasaki, C.Y., Lin, H., Morin, P.J., and Longo, D.L. 2000. Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Res* **60**(24): 7057-7065.
- Schell, T., Kocher, T., Wilm, M., Seraphin, B., Kulozik, A.E., and Hentze, M.W. 2003. Complexes between the nonsense-mediated mRNA decay pathway factor human upf1 (up-frameshift protein 1) and essential nonsense-mediated mRNA decay factors in HeLa cells. *Biochem J* **373**(Pt 3): 775-783.
- Schilders, G., van Dijk, E., Raijmakers, R., and Pruijn, G.J. 2006. Cell and molecular biology of the exosome: how to make or break an RNA. *Int Rev Cytol* **251**: 159-208.

- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., and Zipursky, S.L. 2000. Drosophila Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell* **101**(6): 671-684.
- Serin, G., Gersappe, A., Black, J.D., Aronoff, R., and Maquat, L.E. 2001. Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Molecular and cellular biology* **21**(1): 209-223.
- Sermet-Gaudelus, I., Boeck, K.D., Casimir, G.J., Vermeulen, F., Leal, T., Mogenet, A., Roussel, D., Fritsch, J., Hanssens, L., Hirawat, S., Miller, N.L., Constantine, S., Reha, A., Ajayi, T., Elfring, G.L., and Miller, L.L. 2010. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **182**(10): 1262-1272.
- Shatkin, A.J. and Manley, J.L. 2000. The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol* **7**(10): 838-842.
- Sheppard, D.N., Ostedgaard, L.S., Rich, D.P., and Welsh, M.J. 1994. The amino-terminal portion of CFTR forms a regulated Cl<sup>-</sup> channel. *Cell* **76**(6): 1091-1098.
- Sheth, U. and Parker, R. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**(5620): 805-808.
- . 2006. Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* **125**(6): 1095-1109.
- Shibuya, T., Tange, T.O., Sonenberg, N., and Moore, M.J. 2004. eIF4AIII binds spliced mRNA in the exon junction complex and is essential for nonsense-mediated decay. *Nature structural & molecular biology* **11**(4): 346-351.
- Shishibori, T., Oyama, Y., Matsushita, O., Yamashita, K., Furuichi, H., Okabe, A., Maeta, H., Hata, Y., and Kobayashi, R. 1999. Three distinct anti-allergic drugs, amlexanox, cromolyn and tranilast, bind to S100A12 and S100A13 of the S100 protein family. *Biochem J* **338** ( Pt 3): 583-589.
- Silva, A.L., Ribeiro, P., Inacio, A., Liebhaber, S.A., and Romao, L. 2008. Proximity of the poly(A)-binding protein to a premature termination codon inhibits mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* **14**(3): 563-576.
- Singh, G., Jakob, S., Kleedehn, M.G., and Lykke-Andersen, J. 2007. Communication with the exon-junction complex and activation of nonsense-mediated decay by human Upf proteins occur in the cytoplasm. *Molecular cell* **27**(5): 780-792.
- Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. 2008. A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS biology* **6**(4): e111.
- Skuzeski, J.M., Nichols, L.M., Gesteland, R.F., and Atkins, J.F. 1991. The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons. *Journal of molecular biology* **218**(2): 365-373.
- Snow, B.E., Erdmann, N., Cruickshank, J., Goldman, H., Gill, R.M., Robinson, M.O., and Harrington, L. 2003. Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Current biology : CB* **13**(8): 698-704.
- Soller, M. 2006. Pre-messenger RNA processing and its regulation: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci* **63**(7-8): 796-819.

- Spector, I., Shochet, N.R., Blasberger, D., and Kashman, Y. 1989. Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* **13**(3): 127-144.
- Spector, I., Shochet, N.R., Kashman, Y., and Groweiss, A. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. *Science* **219**(4584): 493-495.
- Stalder, L. and Muhlemann, O. 2009. Processing bodies are not required for mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *RNA* **15**(7): 1265-1273.
- Storey, J.D., Madeoy, J., Strout, J.L., Wurfel, M., Ronald, J., and Akey, J.M. 2007. Gene-expression variation within and among human populations. *American journal of human genetics* **80**(3): 502-509.
- Strausbaugh, L.J. and Brinker, G.S. 1983. Effect of osmotic blood-brain barrier disruption on gentamicin penetration into the cerebrospinal fluid and brains of normal rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* **24**(2): 147-150.
- Stutz, F., Bachi, A., Doerks, T., Braun, I.C., Seraphin, B., Wilm, M., Bork, P., and Izaurralde, E. 2000. REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA* **6**(4): 638-650.
- Sun, X., Perlick, H.A., Dietz, H.C., and Maquat, L.E. 1998. A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(17): 10009-10014.
- Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stevenin, J., and Soret, J. 2001. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *The EMBO journal* **20**(7): 1785-1796.
- Sweet, T.J., Boyer, B., Hu, W., Baker, K.E., and Collier, J. 2007. Microtubule disruption stimulates P-body formation. *RNA* **13**(4): 493-502.
- Tan, L., Narayan, S.B., Chen, J., Meyers, G.D., and Bennett, M.J. 2011. PTC124 improves readthrough and increases enzymatic activity of the CPT1A R160X nonsense mutation. *J Inherit Metab Dis* **34**(2): 443-447.
- Tange, T.O., Shibuya, T., Jurica, M.S., and Moore, M.J. 2005. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA* **11**(12): 1869-1883.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R. 2005. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* **11**(4): 371-382.
- Temple, G.F., Dozy, A.M., Roy, K.L., and Kan, Y.W. 1982. Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for beta-thalassaemia. *Nature* **296**(5857): 537-540.
- Thoren, L.A., Norgaard, G.A., Weischenfeldt, J., Waage, J., Jakobsen, J.S., Damgaard, I., Bergstrom, F.C., Blom, A.M., Borup, R., Bisgaard, H.C., and Porse, B.T. 2010. UPF2 is a critical regulator of liver development, function and regeneration. *PLoS One* **5**(7): e11650.
- Tork, S., Hatin, I., Rousset, J.P., and Fabret, C. 2004. The major 5' determinant in stop codon read-through involves two adjacent adenines. *Nucleic acids research* **32**(2): 415-421.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrad, D., and Parker, R. 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **21**(6): 1427-1436.

- Tuffery-Giraud, S., Beroud, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.P., Bernard, R., Cossee, M., Boisseau, P., Blayau, M., Creveaux, I., Guiochon-Mantel, A., de Martinville, B., Philippe, C., Monnier, N., Bieth, E., Khau Van Kien, P., Desmet, F.O., Humbertclaude, V., Kaplan, J.C., Chelly, J., and Claustres, M. 2009. Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum Mutat* **30**(6): 934-945.
- Uchida, N., Hoshino, S., and Katada, T. 2004. Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* **279**(2): 1383-1391.
- Unterholzner, L. and Izaurralde, E. 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Molecular cell* **16**(4): 587-596.
- Usuki, F., Yamashita, A., Higuchi, I., Ohnishi, T., Shiraishi, T., Osame, M., and Ohno, S. 2004. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann Neurol* **55**(5): 740-744.
- Valadkhan, S. and Jaladat, Y. 2010. The spliceosomal proteome: at the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. *Proteomics* **10**(22): 4128-4141.
- van Deutekom, J.C., Janson, A.A., Ginjaar, I.B., Frankhuizen, W.S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J.T., Koop, K., van der Kooij, A.J., Goemans, N.M., de Kimpe, S.J., Ekhardt, P.F., Venneker, E.H., Platenburg, G.J., Verschuuren, J.J., and van Ommen, G.J. 2007. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med* **357**(26): 2677-2686.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Seraphin, B. 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J* **21**(24): 6915-6924.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., and Parker, R. 2002. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**(5563): 2262-2264.
- Viegas, M.H., Gehring, N.H., Breit, S., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. 2007. The abundance of RNPS1, a protein component of the exon junction complex, can determine the variability in efficiency of the Nonsense Mediated Decay pathway. *Nucleic acids research* **35**(13): 4542-4551.
- Vinciguerra, P., Iglesias, N., Camblong, J., Zenklusen, D., and Stutz, F. 2005. Perinuclear Mlp proteins downregulate gene expression in response to a defect in mRNA export. *The EMBO journal* **24**(4): 813-823.
- von Kobbe, C., van Deursen, J.M., Rodrigues, J.P., Sitterlin, D., Bachi, A., Wu, X., Wilm, M., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E. 2000. Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98. *Molecular cell* **6**(5): 1243-1252.
- Wachtel, C., Li, B., Sperling, J., and Sperling, R. 2004. Stop codon-mediated suppression of splicing is a novel nuclear scanning mechanism not affected by elements of protein synthesis and NMD. *RNA* **10**(11): 1740-1750.
- Wagner, K.R., Hamed, S., Hadley, D.W., Gropman, A.L., Burstein, A.H., Escolar, D.M., Hoffman, E.P., and Fischbeck, K.H. 2001. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* **49**(6): 706-711.

- Wang, B., Yang, Z., Brisson, B.K., Feng, H., Zhang, Z., Welch, E.M., Peltz, S.W., Barton, E.R., Brown, R.H., Jr., and Sweeney, H.L. 2010. Membrane blebbing as an assessment of functional rescue of dysferlin-deficient human myotubes via nonsense suppression. *J Appl Physiol* **109**(3): 901-905.
- Wang, J., Chang, Y.F., Hamilton, J.I., and Wilkinson, M.F. 2002a. Nonsense-associated altered splicing: a frame-dependent response distinct from nonsense-mediated decay. *Molecular cell* **10**(4): 951-957.
- Wang, J., Hamilton, J.I., Carter, M.S., Li, S., and Wilkinson, M.F. 2002b. Alternatively spliced TCR mRNA induced by disruption of reading frame. *Science* **297**(5578): 108-110.
- Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A., and Kiledjian, M. 2002c. The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(20): 12663-12668.
- Wang, Z. and Kiledjian, M. 2001. Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* **107**(6): 751-762.
- Weischenfeldt, J., Damgaard, I., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Thoren, L.A., Nielsen, F.C., Jacobsen, S.E., Nerlov, C., and Porse, B.T. 2008. NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes & development* **22**(10): 1381-1396.
- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., Wilde, R.G., Karp, G., Takasugi, J., Chen, G., Jones, S., Ren, H., Moon, Y.C., Corson, D., Turpoff, A.A., Campbell, J.A., Conn, M.M., Khan, A., Almstead, N.G., Hedrick, J., Mollin, A., Risher, N., Weetall, M., Yeh, S., Branstrom, A.A., Colacino, J.M., Babiak, J., Ju, W.D., Hirawat, S., Northcutt, V.J., Miller, L.L., Spatrick, P., He, F., Kawana, M., Feng, H., Jacobson, A., Peltz, S.W., and Sweeney, H.L. 2007. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**(7140): 87-91.
- Wilkinson, M.F. and Shyu, A.B. 2002. RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat Cell Biol* **4**(6): E144-147.
- Wilschanski, M., Famini, C., Blau, H., Rivlin, J., Augarten, A., Avital, A., Kerem, B., and Kerem, E. 2000. A pilot study of the effect of gentamicin on nasal potential difference measurements in cystic fibrosis patients carrying stop mutations. *Am J Respir Crit Care Med* **161**(3 Pt 1): 860-865.
- Wilschanski, M., Miller, L.L., Shoseyov, D., Blau, H., Rivlin, J., Aviram, M., Cohen, M., Armoni, S., Yaakov, Y., Pugatch, T., Cohen-Cymerknoh, M., Miller, N.L., Reha, A., Northcutt, V.J., Hirawat, S., Donnelly, K., Elfring, G.L., Ajayi, T., and Kerem, E. 2011. Chronic ataluren (PTC124) treatment of nonsense mutation cystic fibrosis. *Eur Respir J* **38**(1): 59-69.
- Wilschanski, M., Yahav, Y., Yaacov, Y., Blau, H., Bentur, L., Rivlin, J., Aviram, M., Bdolah-Abram, T., Bebok, Z., Shushi, L., Kerem, B., and Kerem, E. 2003. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* **349**(15): 1433-1441.
- Wilton, S.D., Lloyd, F., Carville, K., Fletcher, S., Honeyman, K., Agrawal, S., and Kole, R. 1999. Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul Disord* **9**(5): 330-338.
- Wittmann, J., Hol, E.M., and Jack, H.M. 2006. hUPF2 silencing identifies physiologic substrates of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell Biol* **26**(4): 1272-1287.
- Wollerton, M.C., Gooding, C., Wagner, E.J., Garcia-Blanco, M.A., and Smith, C.W. 2004. Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. *Molecular cell* **13**(1): 91-100.



- Yamashita, A., Chang, T.C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.Y., and Shyu, A.B. 2005a. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **12**(12): 1054-1063.
- Yamashita, A., Izumi, N., Kashima, I., Ohnishi, T., Saari, B., Katsuhata, Y., Muramatsu, R., Morita, T., Iwamatsu, A., Hachiya, T., Kurata, R., Hirano, H., Anderson, P., and Ohno, S. 2009. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & development* **23**(9): 1091-1105.
- Yamashita, A., Kashima, I., and Ohno, S. 2005b. The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay. *Biochim Biophys Acta* **1754**(1-2): 305-315.
- Yamashita, A., Ohnishi, T., Kashima, I., Taya, Y., and Ohno, S. 2001. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & development* **15**(17): 2215-2228.
- Yeudall, W.A., Jakus, J., Ensley, J.F., and Robbins, K.C. 1997. Functional characterization of p53 molecules expressed in human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Mol Carcinog* **18**(2): 89-96.
- Yoshinaka, Y., Katoh, I., Copeland, T.D., and Oroszlan, S. 1985. Murine leukemia virus protease is encoded by the gag-pol gene and is synthesized through suppression of an amber termination codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(6): 1618-1622.
- Yu, J.H., Yang, W.H., Gulick, T., Bloch, K.D., and Bloch, D.B. 2005. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* **11**(12): 1795-1802.
- Zetoune, A.B., Fontaniere, S., Magnin, D., Anczukow, O., Buisson, M., Zhang, C.X., and Mazoyer, S. 2008. Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues. *BMC Genet* **9**: 83.
- Zhang, J. and Maquat, L.E. 1996. Evidence that the decay of nucleus-associated nonsense mRNA for human triosephosphate isomerase involves nonsense codon recognition after splicing. *RNA* **2**(3): 235-243.
- Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., LaDuca, J.P., and Maquat, L.E. 1998a. At least one intron is required for the nonsense-mediated decay of triosephosphate isomerase mRNA: a possible link between nuclear splicing and cytoplasmic translation. *Molecular and cellular biology* **18**(9): 5272-5283.
- Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., and Maquat, L.E. 1998b. Intron function in the nonsense-mediated decay of beta-globin mRNA: indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA* **4**(7): 801-815.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.Y., Zhu, W., He, X., and Shyu, A.B. 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* **182**(1): 89-101.
- Zhou, Z., Luo, M.J., Straesser, K., Katahira, J., Hurt, E., and Reed, R. 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**(6802): 401-405.
- Zilberberg, A., Lahav, L., and Rosin-Arbesfeld, R. 2009. Restoration of APC gene function in colorectal cancer cells by aminoglycoside- and macrolide-induced read-through of premature termination codons. *Gut* **59**(4): 496-507.