



HAL
open science

Etude de la dégradation des ARN messagers aberrants par la voie de surveillance du No-Go Decay chez *Saccharomyces cerevisiae*

Sébastien Chamois

► **To cite this version:**

Sébastien Chamois. Etude de la dégradation des ARN messagers aberrants par la voie de surveillance du No-Go Decay chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT: 2020SORUS023 . tel-03354717

HAL Id: tel-03354717

<https://theses.hal.science/tel-03354717>

Submitted on 26 Sep 2021

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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité Du Vivant

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes (UMR8226)

Equipe Régulation fonctionnelle et surveillance de l'ARN

Etude de la dégradation des ARN messagers aberrants par la voie de surveillance du No-Go Decay chez *Saccharomyces cerevisiae*

Par Sébastien Chamois

Thèse de doctorat de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Dirigée par Lionel Bénard et Claire Torchet

Présentée et soutenue publiquement le 24 septembre 2020

Devant un jury composé de :

Mme. Martine COLLART

M. Olivier NAMY

Mme. Emmanuèle MOUCHEL-VIELH

M. Benoit PALANCADE

Mme. Claire TORCHET

M. Lionel BENARD

Rapporteuse

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Co-directrice de thèse

Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaiterais en premier lieu remercier Martine Collart, Olivier Namy et Emmanuèle Mouchel-Vielh d'avoir accepté de participer à mon jury de soutenance de thèse. Aussi, je remercie Benoit Palancade d'avoir accepté de prendre part à ma soutenance en plus d'avoir contribué au bon déroulement de mon doctorat par sa participation aux différents comités de thèse qui ont jalonné mon parcours. Je remercie également Damien Bregeon et Ciaran Condon pour leur participation et pour les échanges particulièrement enrichissants que nous avons pu avoir au cours des comités de thèse.

De même, je souhaite saluer le travail de l'ensemble des membres de l'école doctorale Complexité Du Vivant pour leur disponibilité et leur efficacité.

Merci Lionel, mon directeur de thèse, pour ton implication tout au long de mon doctorat. J'ai énormément appris à tes côtés et tu as su me transmettre ton enthousiasme et ta passion pour la recherche. Toutes les discussions scientifiques comme humaines, ton positivisme vis-à-vis des expériences qui n'étaient pourtant pas gagnées d'avance ainsi que ta bonne humeur naturelle ont grandement contribué au plaisir que j'avais de rejoindre le laboratoire chaque matin.

Je remercie Claire d'avoir co-dirigé ma thèse. Tes conseils, ta patience ainsi que ta rigueur scientifique sont pour moi des valeurs précieuses que je tâcherai de conserver à chaque étape de ma vie scientifique.

Pour passer un agréable doctorat, il faut nécessairement une bonne équipe. Je remercie donc Rénette, ma voisine de bureau, ainsi que Cristina, ma presque voisine de bureau, pour toute la bonne humeur et le soutien moral que vous avez pu m'apporter.

De la même manière, merci à tous les membres de l'UMR8226 pour les conditions optimales, aussi bien humaines que de travail, dont j'ai pu bénéficier au cours de ces trois années. J'ai d'ailleurs une pensée particulière pour le « groupe cantine » ainsi que pour Isabelle Krempholtz qui a toujours été là pour m'accompagner, on ne peut plus efficacement, dans les démarches administratives.

Merci à l'ensemble des membres de l'équipe *Maturation et Dégradation de l'ARN* du deuxième étage qui m'ont toujours dépanné (et pas qu'une fois) en matériel pour pouvoir mener à bien mes northern blots. Je remercie tout particulièrement, Ciaran de s'être autant impliqué dans mon projet de thèse. Merci également à Aude pour tous les agréables moments que nous avons passés à manger des sandwiches aux abords de la pelouse du jardin du Luxembourg.

Merci à mon « comité de soutien » personnel composé de Pascale, Aurélia et Héloïse. Toujours de bonne humeur, vous avez grandement contribué à mon épanouissement au cours de ma thèse. Malgré une balance calorifique qui penche du mauvais côté, j'ai particulièrement apprécié les sessions de sport/burger ainsi que les pauses goûter que nous avons partagées. Il me reste néanmoins quelques séquelles psychologiques des douches froides post-jogging que nous avons dues braver cet hiver !

Mes années universitaires n'auraient pas été les mêmes sans les fameux « rasta » qui ont toujours été présents pour célébrer, autour d'une table ou d'un jeu de cartes, nos réussites comme nos déconvenues.

J'ai, bien entendu, une pensée pour Anne-Sophie Leprince qui m'a accompagné, avec beaucoup de patience et de bienveillance, lorsque je faisais mes premiers pas dans le monde scientifique.

Merci à ma famille. A mon frère pour les superbes années de colocation que nous avons passées ensemble lors de mon arrivée en France. A mes parents, de m'avoir toujours soutenu sans retenue dans tous les choix que j'ai pu faire et tous les projets que j'ai pu avoir.

Merci Alicia. Tu connais désormais par cœur la dégradation des ARN chez la levure, ce qui, je pense, te sera particulièrement utile dans ta vie de tous les jours. Plus sérieusement, je te remercie pour ta patience, pour ton soutien, moral comme scientifique, et d'avoir depuis toujours cru en moi. Mon parcours n'aurait pas été le même sans toi.

Table des matières

Table des abréviations	6
INTRODUCTION	8
1 Importance des ARNm au cours de l'expression des gènes	9
1.1 Altération du message génétique.....	9
1.2 Traduction canonique chez les eucaryotes	11
1.2.1 Le ribosome	11
1.2.2 Démarrage de la traduction eucaryote	12
1.2.3 Elongation de la traduction	15
1.2.4 Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes.....	16
1.3 Dégradation cytoplasmique des ARN messagers chez la levure	19
1.3.1 Déadénylation des ARN.....	19
1.3.2 Dégradation 3'-5' de l'ARN.....	22
1.3.3 Dégradation 5'-3' de l'ARN.....	24
2 Surveillance et gestion des ARN aberrants	26
2.1 Surveillance et élimination des ARN aberrants chez les bactéries.....	26
2.1.1 Mécanisme de trans-traduction.	27
2.1.2 Mécanismes impliquant ArfA et ArfB.....	28
2.2 Elimination des ARN aberrants chez les eucaryotes.....	29
2.2.1 Surveillance nucléaire des ARN chez les eucaryotes.	30
2.2.1.1 Elimination des coiffes aberrantes.....	30
2.2.1.2 Rôle de l'exosome nucléaire dans la gestion des messagers aberrants.....	31
2.2.2 Voies de surveillance cytoplasmiques des ARN messagers.....	34
2.2.2.1 Le Nonsense Mediated Decay.....	34
2.2.2.2 Le Non-Stop Decay et le No-Go Decay	36
2.2.2.3 Elimination des ARN par le Non-Stop Decay	46
2.2.2.4 Elimination des ARN par le No-Go Decay	47
3 Contexte et objectifs de la thèse.....	51
RESULTATS.....	53
1 Stratégie d'étude du No-Go Decay.....	54
2 Identification et caractérisation des clivages sur un ARN tronqué	56
2.1 <i>Δdom34</i> : un contexte génétique intéressant pour l'étude du NGD.....	56
2.2 Importance de Xrn1 dans la dégradation des ARN par le NGD.....	56
2.3 Association des fragments NGD aux ribosomes.....	58
2.4 Dxo1 : un nouvel acteur de la dégradation des ARN tronqués	61

2.5	Dxo1 dégrade l'ARN de manière séquence spécifique	62
3	Existence d'un clivage endoribonucléolytique.....	64
3.1	Le clivage endonucléolytique intervient au niveau du troisième ribosome bloqué	64
3.2	Avenir de l'ARN tronqué après le clivage endonucléolytique	67
3.3	Hel2 est nécessaire au clivage endoribonucléolytique.....	69
3.4	Le clivage endonucléolytique génère un ARN 5'-OH	71
3.5	Trl1 phosphoryle l'ARN B4	73
3.6	Cue2 est impliquée dans le clivage endonucléolytique	75
4	Etude d'un ARN comportant des codons rares	77
4.1	Xrn1 participe à l'élimination de l'ARN-CGA	77
4.2	Positionnement des ribosomes bloqués sur les codons rares	77
4.3	Caractérisation du clivage endoribonucléolytique sur l'ARN-CGA.....	79
4.4	Dxo1 participe à la dégradation des ARN-CGA.....	83
5	No-Go Decay mRNA cleavage in the ribosome exit tunnel produces 5'-OH ends phosphorylated by Trl1 (<i>Publication</i>).....	86
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		106
1	Analyse des outils utilisés lors de l'étude du No-Go Decay.	107
1.1	Choix de l'ARN tronqué.....	107
1.2	ARN tronqué <i>versus</i> ARN-CGA.....	110
2	Identification de nouveaux acteurs	111
2.1	Recrutement et importance de Trl1 dans le NGD chez <i>S. cerevisiae</i>	111
2.2	Importance de Dxo1 dans la gestion des messagers aberrants	113
3	Clivage endonucléolytique : positionnement et mode d'action	116
3.1	Clivage endoribonucléolytique, disome et nouveaux acteurs	116
3.2	Importance du clivage endonucléolytique dans la dégradation des ARN aberrants	117
3.3	Le clivage endonucléolytique : la règle des 71 nucléotides ?	119
4	Importance du NGD dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et conservation phylogénétique.....	121
5	Etude en cours : les ARN aberrants insensibles au NGD	124
6	Conclusion.....	127
MATERIELS ET METHODES		128
1	Culture des cellules.....	129
2	Extraction des ARN totaux	129
3	Préparation des extraits cellulaires pour l'analyse des polysomes.....	129
4	Traitement des ARN <i>in vitro</i>	129
4.1	Traitement des extraits cellulaires par Xrn1	129

4.2	Discrimination de l'extrémité 5' d'un ARN par traitement T4 polynucléotide kinase.....	130
5	Réalisation des gradients de saccharose	130
6	Ultracentrifugation des extraits cellulaires et purification des polysomes	130
7	Marquage d'une sonde ADN au P ₃₂	130
8	Northern blot sur gel d'acrylamide 8%.....	130
8.1	Variante de migration : séparation d'un ARN selon la nature de son extrémité 5'	131
9	Northern blot sur gel d'agarose	131
10	Transcription inverse	131
11	Identification des fragments 3' NGD par 3'-RACE	132
12	Liste des souches	133
13	Liste des oligonucléotides.....	134
BIBLIOGRAPHIE.....		135
ANNEXES		156

Table des abréviations

8-oxoG : 8-hydroxyguanosine

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

BET : Bromure d'Ethidium

CTD : Carboxy-Terminal Domain

CUT : Cryptic Unstable Transcripts

GGQ : Gly-Gly-Gln (Domaine)

HDH : 5'-Hydroxyle-Dinucléotide-Hydrolase (activité)

NBD : Nucleotide Binding Domain

NGD : No-Go mRNA Decay

NIKS : Asn-Ile-Lys-Ser (Domaine)

NMD : Nonsense - Mediated mRNA Decay

NNS : Nrd1, Nab3 et Sen1 (Complexe)

NSD : Non-Stop mRNA Decay

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PIC : PreInitiation Complex

PNK : PolyNucléotide Kinase

PTC : Premature Termination Codon

RACE : Rapid Amplification of cDNA Ends

ROS : Reactive oxygen species

RQC : Ribosome-bound Quality Control

RQT : Ribosome Quality Trigger

SKI complexe: SuperKiller (Complexe, composé des facteurs Ski2, Ski3 et Ski8)

SMR : Small MutS-Related (Domaine)

SUT : Stable Uncharacterized Transcripts

TRAMP : Trf4/5-Air1/2-Mtr4 Polyadenylation (Complex)

UTR : Untranslated Region

XUT : Xrn1-sensitive Unstable Transcripts

INTRODUCTION

1 Importance des ARNm au cours de l'expression des gènes

1.1 Altération du message génétique

Le terme « unité de base du vivant », souvent utilisé pour définir la cellule, cache une réalité bien complexe. En effet, une cellule est composée d'une multitude d'éléments interconnectés formant, ensemble, une unité structurale et fonctionnelle. Une régulation harmonieuse de l'expression de tous les gènes, impliqués dans la constitution de cet ensemble, semble donc être un paramètre essentiel et n'est autre, en fait, qu'une des grandes composantes du maintien de l'homéostasie cellulaire. Pour sa réalisation, la cellule possède plusieurs leviers. Elle peut réguler la transcription, la stabilité des messagers, la traduction et l'activité des protéines par l'intermédiaire de régulations post-traductionnelles. L'objectif de ces régulations est notamment de permettre à la cellule de s'adapter efficacement et de survivre à des changements rapides de l'environnement.

La transcription est la première étape de l'expression des gènes. Elle permet de transférer l'information contenue sous forme ADN vers une molécule d'ARN diffusant ainsi l'information génétique entre les différents compartiments cellulaires (Cramer, 2019). Bien que les ARN puissent appartenir à différentes classes non-codantes, essentielles pour certaines dans l'expression génique et sa régulation, nous avons volontairement choisi de centrer notre étude sur la classe codante, les ARN messagers. La transcription de tels ARN est ainsi assurée par l'ARN polymérase II et son domaine CTD qui est chargé du recrutement des facteurs responsables de la maturation du messager : ajout d'une coiffe m⁷-Gppp en 5', épissage des introns et polyadénylation de l'extrémité 3' de l'ARN. Tous ces éléments jouent un rôle déterminant sur la stabilité de l'ARN et sa capacité à être traduit dans le cytoplasme.

La synthèse d'un ARN est, à chaque étape, un mécanisme extrêmement complexe pouvant conduire à une altération du messager. Des erreurs de lecture peuvent ainsi intervenir lors de la transcription de l'ADN en ARN par l'ARN polymérase II. Chez les eucaryotes, le processus d'épissage peut aussi générer des ARN incorrectement maturés, porteurs d'exons délétères, ou bien encore des ARN tronqués suite à une ligation défectueuse entre les exons. De même, au cours de la transcription, un signal de terminaison peut être activé de manière précoce et conduire au clivage de la séquence codante et à sa polyadénylation, produisant ainsi des ARN polyadénylés et dépourvus de codon STOP. Enfin, le décodage du message génétique, ou bien le processus d'élongation de la traduction, peuvent aussi être compromis par la présence d'éléments propres à la séquence codante de certains ARN tels que des codons rares ou des structures secondaires stables (ces dernières étant plutôt rencontrées dans des messagers

artificiels). L'ensemble des messagers contenant les caractéristiques citées précédemment, à l'exception des séries naturelles de codon rares, sont alors qualifiés d'ARNm aberrants puisqu'ils portent des éléments ou lésions à même de perturber leur décodage lors de la traduction (Wilson *et al.*, 2008 ; Song *et al.*, 2016).

D'autres ARN aberrants peuvent aussi être produits indépendamment des erreurs générées par les machineries chargées de leur synthèse et de leur maturation. En effet, l'ARN est une molécule chargée, hautement sensible aux attaques extérieures telles que l'oxydation ou les ultraviolets (Li *et al.*, 2006 ; Wurtmann and Wolin, 2009). Le principal dommage encouru par ces acides ribonucléiques est l'oxydation de la guanine en 8-hydroxyguanosine (**8-oxoG**) par les radicaux libres de l'oxygène (autrement appelés ROS pour Reactive Oxygen Species) (Ames *et al.*, 1991). Cet état oxydé est donc facilement atteint soit par la modification directe des guanines déjà présentes dans la molécule d'ARN, soit par l'incorporation de ces nucléotides oxydés lors de la transcription (Li *et al.*, 2006). Il faut d'ailleurs remarquer que les ROS sont présents de manière physiologique dans les cellules même s'ils tendent à s'accumuler dans des conditions de stress. On observe ainsi chez les mammifères une forte augmentation des dommages aux ARN causés par l'oxydation dans un contexte de cellules tumorales ou de maladies neurodégénératives (Shan and Lin, 2006). Minimiser l'état d'oxydation des ARN est donc un enjeu constant pour la cellule (Hofer *et al.*, 2005 ; Shen *et al.*, 2000). Contrairement à ce qui est observé pour l'ADN, il n'existe pas de mécanisme de correction des lésions touchant l'ARN. En conséquence de cela, ces ARN sont pris en charge par la machinerie de la traduction avec le risque pour les ribosomes d'être dans l'incapacité de décoder efficacement, ou fidèlement, tout codon porteur de bases oxydées (Bellacosa and Moss, 2003 ; Shan *et al.*, 2003 ; Shan *et al.*, 2007 ; Tanaka *et al.*, 2007). Le message génétique est donc altéré, ce qui peut engendrer un dérèglement de l'homéostasie cellulaire (Hofer *et al.*, 2005 ; Shen *et al.*, 2000 ; Simms *et al.*, 2014).

A cet égard, un des risques principaux encourus par la cellule passe sans doute par la production de protéines mal repliées ou tronquées, s'amoncelant en agrégats protéiques toxiques, ou par la production de protéines aberrantes avec un effet dominant négatif sur les fonctions assurées par les protéines sauvages (Richter *et al.*, 2010 ; Holmes *et al.*, 2014). Face à cette problématique vitale, différentes voies de surveillance semblent avoir été mises en place, permettant chez les eucaryotes de contrôler l'intégrité du message génétique porté par les ARNm tout au long de leur cheminement du noyau vers le cytoplasme (Welch and Jacobson,

1999 ; Frischmeyer *et al.*, 2002 ; van Hoof *et al.*, 2002 ; Doma and Parker, 2007 ; Shoemaker and Green, 2012).

1.2 Traduction canonique chez les eucaryotes

La traduction est une étape fondamentale de l'expression des gènes puisqu'elle permet de produire des protéines fonctionnelles à partir de l'information portée par un ARN messenger. La traduction permet aussi d'assurer un contrôle de qualité sur les messagers, plaçant l'étape d'élongation assurée par les ribosomes au cœur de ce processus. Les ribosomes rencontrant des difficultés lors du décodage servent en réalité de plateforme pour le recrutement de multiples facteurs appartenant à des voies de surveillance des ARN et des protéines naissantes. Ainsi, pour comprendre le fonctionnement de celles-ci au cours de la traduction, il est important de décrire en premier lieu les principales étapes et les régulations qui interviennent durant la mise en place de la synthèse protéique.

1.2.1 Le ribosome

La traduction est assurée dans la cellule par le ribosome qui est un complexe ribonucléoprotéique composé de deux sous-unités asymétriques que l'on retrouve chez tous les êtres vivants. Ce dernier comprend chez la levure, 79 protéines et 4 ARN ribosomiques (ARNr) (Wilson and Doudna, 2012). Il existe une forte conservation des éléments liés à la traduction entre les eucaryotes et les procaryotes. Parmi les éléments cités précédemment, de nombreuses séquences d'ARN ribosomiques sont fidèlement conservées et 35 protéines possèdent aussi des homologues chez les bactéries et les archées (Spahn *et al.*, 2001 ; Smith *et al.*, 2008).

Il a été montré que les centres fonctionnels des ribosomes sont assurés par des ribozymes formés à partir des séquences conservées portées par les ARNr. Ainsi, des mutations de ces dernières peuvent affecter la capacité des ribosomes à décoder l'ARN et à former les liaisons peptidiques entre les acides aminés et la protéine en cours de synthèse. Ces deux activités sont par ailleurs portées par des sous-unités distinctes du ribosome. En effet, l'activité peptidyl-transférase catalysant la liaison peptidique est retrouvée dans la grande sous-unité du ribosome (60S) tandis que le centre de décodage des ARN est présent dans la petite sous-unité du ribosome (40S). Par ailleurs, la sous-unité 60S possède aussi trois sites essentiels au déroulement de la traduction. Le site A (Aminoacyl-ARNt) permet l'accès à un nouvel ARN de transfert (ARNt) aminoacylé dans le ribosome à chaque cycle de traduction. Le site P (Peptidyl) contient quant à lui l'ARNt-peptidyl, c'est-à-dire l'ARNt associé au peptide naissant.

Enfin, le site E (Exit) est le site par lequel sont relargués les ARNt déacétylés à l'issue de chaque cycle de traduction. On trouve aussi au sein de la sous-unité 60S le tunnel de sortie du peptide.

La petite sous-unité 40S possède quant à elle un sillon dans lequel s'insère le messager pour y être décodé. Lorsque l'interface entre la sous-unité 60S et 40S se met en place durant la traduction, on dit que le ribosome forme une particule 80S. Néanmoins, tous les ribosomes ne sont pas semblables puisqu'il existe une certaine hétérogénéité entre les particules 80S. En effet, une étude chez la souris a montré que l'identité de certaines protéines cœurs des ribosomes pouvaient varier afin d'orienter la traduction de certains transcrits vers un assemblage ribosomique particulier (Shi *et al.*, 2017). La variation de la composition protéique des ribosomes pourrait ainsi être l'un des éléments de régulation qui déterminerait la capacité d'un ARN à être traduit dans le cytoplasme. Néanmoins, il existe aussi de nombreux facteurs et des éléments extérieurs au ribosome qui participent à la régulation de la traduction. Ainsi, certaines protéines, qui seront décrites au cours de l'introduction, peuvent influencer le démarrage, l'élongation ou la terminaison de la traduction tandis que le messager, sa séquence et sa structure sont autant de paramètres qui définissent la cinétique du système.

1.2.2 Démarrage de la traduction eucaryote

Le démarrage de la traduction est la première étape de la synthèse protéique. Il se définit par l'assemblage des deux sous-unités du ribosome sur un ARN messager pour former un 80S compétent pour l'élongation. Cette première phase est aussi la plus contrôlée et régulée de la traduction puisqu'elle nécessite le positionnement du site P du ribosome sur le codon AUG (Méthionine) initiateur de la traduction (Sonenberg and Hinnebusch, 2009).

Le démarrage commence par la formation d'un complexe ternaire composé de l'ARNt initiateur méthionine (ARNt-Met_i) associé au facteur du démarrage de la traduction eIF2:GTP. Ces derniers s'assemblent ensuite avec la sous-unité 40S du ribosome et aux facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 pour former le complexe de pré-initiation 43S de la traduction (PIC) (Figure 1) (Asano *et al.*, 2000). En parallèle de cette mise en place, l'ARNm destiné à être traduit s'associe au niveau de son extrémité 5' à plusieurs facteurs. On trouve notamment, l'hélicase eIF4A, la protéine de liaison à la m⁷-Gppp, eIF4E, ainsi que eIF4G formant ensemble le complexe protéique eIF4F associé à la coiffe. Ce complexe interagit alors avec les protéines de liaison à la queue poly(A) (PABP ou Pab1 chez la levure) afin de circulariser le messager et ainsi « activer » ce dernier pour lui permettre de s'associer à la machinerie de traduction (Figure 1) (Jackson *et al.*, 2010). Le PIC est alors chargé en 5' du messager pour initier un balayage de

la séquence, base par base, de l'ARN (scanning). Une fois la sous-unité 40S du ribosome positionnée sur le codon AUG, au niveau de la séquence de Kozak, eIF1 est relâché, ce qui provoque un changement de conformation du PIC 43S en 48S avec une hydrolyse du GTP de eIF2 par la protéine eIF5 (Kozak, 1981 ; Maag *et al.*, 2005). Le PIC 48S nouvellement formé va ainsi interagir avec le facteur eIF5B pour recruter la sous-unité 60S du ribosome et positionner le site P au niveau de l'ARNt-Met initiateur (Kolitz *et al.*, 2009 ; Hinnebusch, 2011). Le complexe de démarrage de la traduction 80S est alors en place. Le facteur eIF1A est ensuite relâché, ce qui libère le site A du ribosome pour permettre l'arrivée d'un ARN de transfert et le démarrage de l'élongation de la traduction (Fringer *et al.*, 2007).

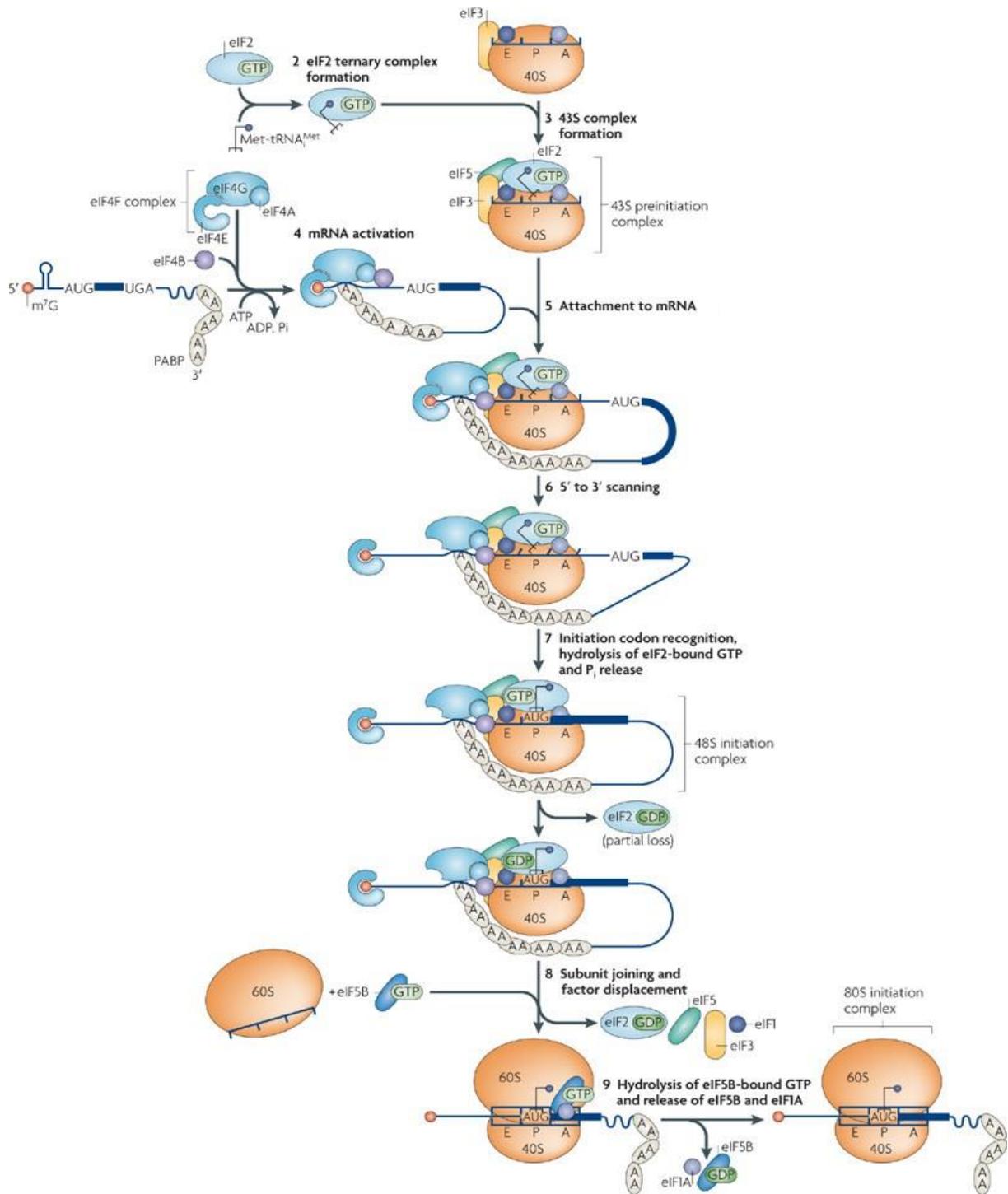


Figure 1 : Etapes du démarrage de la traduction chez les eucaryotes. (D'après Jackson et al., 2010)

1.2.3 *Elongation de la traduction*

Au démarrage de la traduction, le ribosome est en pause avec dans son site P l'anticodon de l'ARNt-Met_i associé au codon de démarrage de la traduction. Il possède donc au niveau de son site A le second codon du messenger en attente du décodage. Pour activer l'élongation, le facteur eEF1A, à l'aide de GTP, interagit alors avec un ARN de transfert afin de diriger ce dernier vers le site A du ribosome. Lorsque la reconnaissance codon/anticodon s'effectue, eEF1A est alors relargué, ce qui permet à l'ARNt de s'accommoder au site A du ribosome (Valle *et al.*, 2003). La réaction peptidyl-transferase, intervient alors immédiatement au niveau du centre peptidyl-transferase du ribosome (PTC) pour transférer la méthionine de l'ARNt-Met_i sur l'ARN de transfert positionné dans le site A (Ben-Shem *et al.*, 2010). A cette étape de l'élongation, le ribosome se trouve dans un état de pré-translocation puisqu'il possède un ARN déacétylé dans son site P et un ARNt-peptidyl dans son site A (Frank *et al.*, 2007).

Le ribosome initie alors son premier déplacement en « ratchet » sur l'ARN messenger. Pour ce faire, il change de conformation pour adopter un état hybride P/E et A/P capable de former des interfaces entre les sites A, P et E du ribosome. Cet état permet de faire basculer les bras accepteurs des ARN de transferts dans les sites E et P pendant que les interactions codons/anticodons sont maintenues dans les sites A et P du ribosome (Figure 2). Pour pouvoir ensuite transloquer, le ribosome a besoin de l'intervention de la GTPase eEF2 (Taylor *et al.*, 2007). Cette dernière insère son domaine IV dans le centre de décodage du ribosome et, en hydrolysant du GTP, provoque un déblocage de l'état hybride du ribosome afin de permettre aux boucles anticodons des ARNt d'intégrer le site P et E du ribosome (Figure 2) (Spahn *et al.*, 2004). Le ribosome qui se trouve alors dans un état de post-translocation possède un ARNt-déacétylé dans son site E, un ARNt-peptidyl dans son site P et un site A libre à même de recevoir le prochain ARNt-aminoacyl recruté par eEF1A (Nierhaus, 1990).

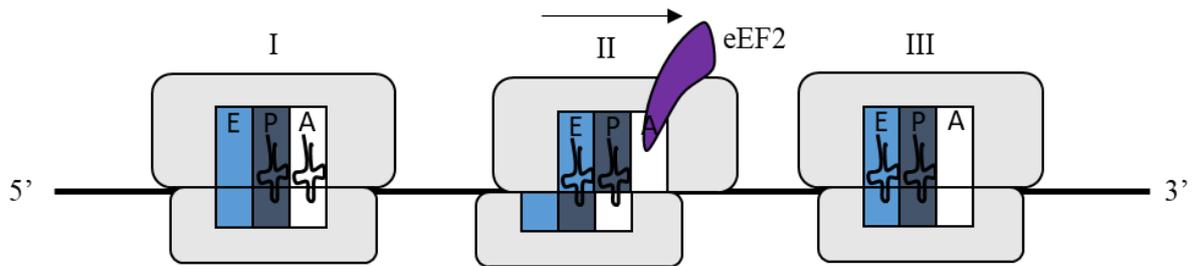


Figure 2 : Etapes de la translocation des ribosomes au cours de l'élargissement de la traduction.

Le ribosome est en état de pré-translocation avec un ARNt-aminoacyl dans le site A et un ARNt-peptidyl dans son site P (I). Le mouvement en ratchet du ribosome est enclenché, ce qui implique un changement de conformation en état A/P P/E et la balance des bras accepteurs des ARNt dans les sites E et P (II). La GTPase eEF2 débloque le ribosome qui se trouve alors en état de post-translocation (II – III).

Chez les champignons, les choanoflagellés et certaines algues, on trouve un facteur supplémentaire nécessaire au bon fonctionnement de l'élargissement. Ce dernier, eEF3, fait partie de la famille des ATPase ABCF (Ross-Smith *et al.*, 1995). Le rôle de cette protéine, située à la lisière du site E du ribosome, est pour le moment mal défini. Cependant, certaines études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que eEF3 pourrait faciliter le relargage de l'ARNt déacétylé présent dans le site E du ribosome. Par la même occasion, cela permettrait de faciliter l'intégration par eEF1A d'un nouvel ARNt dans le site A du ribosome (Uritani and Miyazaki, 1988 ; Kamath and Chakraborty, 1989). Une étude récente a par ailleurs montré que l'absence de eEF3 chez la levure limitait l'arrêt des ribosomes sur des codons correspondant aux prolines, acides aminés réputés pour générer le blocage de ribosomes. Une hypothèse avancée par les auteurs, pour expliquer ce résultat, serait que l'absence de eEF3 au site E favoriserait l'arrivée de eEF5A, un facteur notamment connu pour faciliter la traduction des codons prolines (Kasari *et al.*, 2019 ; Pelechano and Alepuz, 2017).

1.2.4 Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes

La terminaison de la traduction a lieu lorsque le site A du ribosome est occupé par un codon de type UAA, UGA et UAG. Ces codons, dits STOP, font office de terminateurs de la traduction car ils ne possèdent pas d'ARNt correspondants. A cette étape de la traduction, le site A du ribosome n'est donc encombré d'aucun ARNt. Chez les eucaryotes, la terminaison de la traduction est assurée par un complexe protéique constitué des facteurs eRF1 et eRF3.

La protéine eRF1 est un facteur de terminaison de classe I qui possède deux rôles dans la terminaison de la traduction. Il permet, d'une part, d'assurer la reconnaissance du codon STOP au site A, et, d'autre part, d'hydrolyser la liaison ester qui lie la protéine à l'ARNt-peptidyl présent dans le site P du ribosome. eRF1 est un facteur dont la structure se rapproche de la forme d'un ARNt. Il possède trois domaines avec chacun un rôle défini dans la terminaison. Le domaine N-terminal est associé à la reconnaissance de la présence d'un codon STOP dans le site A du ribosome. Cette fonction de eRF1 est assurée grâce à la présence d'un motif NIKS (Asn-Ile-Lys-Ser) à même d'interagir physiquement avec le STOP (Chavatte *et al.*, 2002 ; Chavatte *et al.*, 2003). Le second domaine (M) de eRF1 possède quant à lui un motif GGQ (Gly-Gly-Gln) qui s'insère à proximité du PTC afin d'hydrolyser la liaison ester qui relie la protéine à l'ARN de transfert peptidyl (Frolova *et al.*, 1999 ; Laurberg *et al.*, 2008). Enfin, l'extrémité C-terminale de eRF1 lui permet de s'appareiller à son partenaire eRF3. (Merkulova *et al.*, 1999 ; Kononenko *et al.* 2008 ; Cheng *et al.*, 2009).

eRF3 est un facteur de terminaison de type II, c'est-à-dire qu'il n'interagit pas directement avec le codon STOP, mais permet de stimuler les facteurs de type I par l'intermédiaire d'une activité GTPase. Pour ce faire, eRF3 possède deux domaines : un domaine N-terminal non-essentiel et un domaine C-terminal qui possède à la fois l'activité GTPase et le site de liaison à eRF1 (Ter-Avanesyan *et al.*, 1993 ; Stansfield *et al.*, 1995 ; Zhouravleva *et al.*, 1995).

Après sa formation, le complexe ternaire eRF1:eRF3:GTP s'intègre au site A libre du ribosome. Le domaine NIKS de eRF1 assure alors la reconnaissance du codon STOP, ce qui provoque l'hydrolyse de la molécule de GTP par eRF3. Cette étape permet la bascule du domaine M de eRF1 au niveau du PTC, ce qui induit par la même occasion l'expulsion de eRF3 hors du ribosome (Frolova *et al.*, 1996) (Figure 3). A l'issue de cette étape de la terminaison, le ribosome est alors positionné au niveau du codon STOP avec le facteur eRF1 accommodé dans son site A.

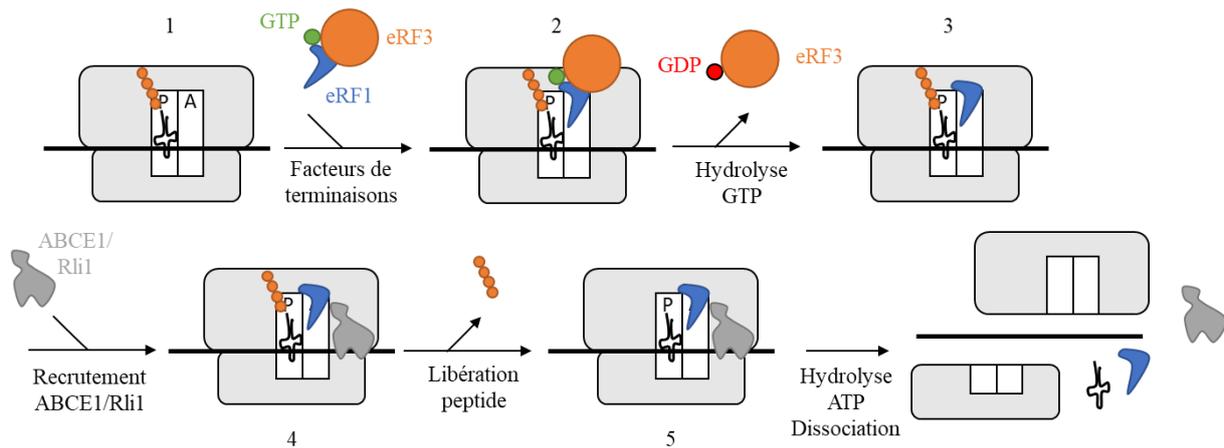


Figure 3 Terminaison canonique de la traduction par eRF1, eRF3 et Rli1. (D'après Dever and Green, 2012).

La terminaison de la traduction nécessite l'intervention du complexe eRF1:eRF3:GTP dans le site A du ribosome (1). L'accommodation de eRF1 dans le site A est catalysée par l'activité GTPase de eRF3 qui est alors recyclé (2). Rli1 interagit ensuite avec eRF1 pour permettre la libération de la protéine et la dissociation des deux sous-unités du ribosome (3-4-5).

Chez les eucaryotes, la libération du peptide et le recyclage des ribosomes sont des événements qui sont couplés et critiques pour la cellule. En effet, les ribosomes étant en nombre important mais toutefois limité, il est essentiel qu'ils soient en permanence disponibles pour traduire les milliers de messagers présents dans le cytoplasme. Pour ce faire, eRF1 a besoin de l'intervention du facteur essentiel Rli1 (ABCE1 chez l'Homme) (Barthelme *et al.*, 2011 ; Pisarev *et al.*, 2010 ; Shoemaker and Green, 2011). Faisant partie de la famille des ABC transporteurs, Rli1 possède deux domaines de liaison aux acides nucléiques (NBD), une fonction ATPase et, en plus de ces attributs, un centre fer-souffre à son extrémité N-terminale (Wilkins, 2015). Cependant, contrairement à la majorité des protéines ABC, Rli1 est une protéine soluble dans le cytoplasme : elle n'est associée à aucune membrane. Rli1 est donc recrutée par les ribosomes au niveau d'une tige associée au site P, la « P-stalk », qui lui assure un ancrage à proximité de eRF1 pour former, ensemble, le complexe de pré-scission (Imai *et al.*, 2018 ; Shao *et al.*, 2016). Par la suite, Rli1 hydrolyse une molécule d'ATP, ce qui provoque l'activation du domaine GGQ de eRF1 au niveau du PTC. Par cette action, le peptide naissant est alors libéré par eRF1 et le changement de conformation induit chez Rli1 provoque un mouvement de translocation qui permet de déstabiliser la sous-unité 60S et faire passer le ribosome dans un état post-scission (Figure 3). A cette phase du recyclage, Rli1 reste associée à la sous-unité 40S du ribosome pour empêcher la reconstruction de la particule 80S (Pisarev *et al.*, 2010 ; Nurenberg-Goloub *et al.*, 2018). Il semblerait enfin que, pour réinitier de manière

efficace la traduction, les sous-unités du ribosome soient prises en charge par des facteurs d'initiation de la traduction. Selon des études menées sur un système de traduction *in vitro*, deux scénarios menant au décrochage de la sous-unité 40S et à la ré-initiation de la traduction semblent alors envisageables. Le premier ferait intervenir les facteurs canoniques de l'initiation tels que les facteurs eIF1, eIF1A, eIF3. Le second impliquerait quant à lui des facteurs alternatifs de l'initiation, tels que eIFD2 ou le complexe DENR-MCT1, qui possèdent des protéines composées de domaines très proches de ceux de la protéine eIF2D (Pisarev *et al.*, 2007 ; Skabkin *et al.*, 2010).

1.3 Dégradation cytoplasmique des ARN messagers chez la levure

La modulation de la quantité d'un ARN messenger, quantité dont les composantes sont la synthèse et la dégradation, est un levier de régulation de l'expression des gènes important pour la cellule. A cet égard, il existe deux voies principales chargées de la dégradation des ARN dans le cytoplasme. Elles permettent d'assurer la dégradation des messagers en initiant leur élimination depuis leur extrémité 5' vers leur extrémité 3' (dégradation 5'-3') et inversement (dégradation 3'-5') (Parker, 2012). L'élimination des messagers dans le cytoplasme semble intimement liée à la traduction. En effet, il semblerait que la nature des codons au sein de la séquence de l'ARN possède une influence considérable sur sa stabilité. Ainsi, un ARN avec une grande proportion de codons très efficacement traduits, appelés aussi codons optimaux, aura une stabilité plus élevée qu'un ARN avec une capacité plus faible à être traduit (Presnyak *et al.*, 2015). Il faut par ailleurs noter que de nombreux facteurs impliqués dans la dégradation des messagers canoniques interviennent également dans l'élimination d'ARN aberrants dans le cytoplasme. Ce chapitre propose donc d'explicitier le rôle de ces facteurs dans la dégradation classique cytoplasmique afin de mieux comprendre leur implication au sein des voies de surveillance spécifiques des messagers aberrants.

1.3.1 Déadénylation des ARN

La dégradation d'un ARN messenger est fortement dépendante de sa liaison aux PABP et de la longueur de sa séquence poly(A). Cette dernière est d'environ 70 nucléotides chez la levure et son raccourcissement semble être le premier signal déclencheur de la dégradation de l'ARNm (Wolf and Passmore, 2014). Il existe deux voies principales à même de dégrader cette séquence poly(A).

La première voie est initiée par le complexe de déadénylation Pan2/Pan3 recruté par les PABP positionnées le plus en 3' de la queue poly(A) (Siddiqui *et al.*, 2007 ; Schafer *et al.*,

2019). Au sein de ce complexe, Pan3 assure la liaison à la queue poly(A) tandis que Pan2 possède l'activité exoribonucléolytique 3'-5' de type RNase D (Boeck *et al.*, 1996 ; Brown *et al.*, 1996). Suite à l'action de Pan2/Pan3, la taille de la queue poly(A) est d'une vingtaine de résidus. Elle est alors trop courte pour être associée aux PABP, affectant ainsi le recrutement du complexe Pan2/Pan3 (Brown and Sachs, 1998). Le complexe Ccr4-Not est ensuite recruté au niveau de la queue poly(A) afin de poursuivre la déadénylation du messager (Figure 4A) (Olivas and Parker, 2000 ; Tadauchi *et al.*, 2001 ; Hook *et al.*, 2007 ; Ulbricht and Olivas, 2008).

Le cœur de ce complexe est composé de neuf sous-unités, dont trois protéines qui sont hautement impliquées dans l'activité de Ccr4-Not pour déadényler les ARN : Not1, Ccr4 et Caf1 (Bai *et al.*, 1999 ; Collart and Panasenko, 2012). Au sein de ce dernier, Not1 assure la cohésion entre les différents partenaires tandis que Ccr4 et Caf1 possèdent chacune une activité de dégradation de type exoribonucléase 3'-5' (Whale and Winkler, 2013). Néanmoins, il semblerait que l'activité déadénylase dominante du complexe Ccr4-Not soit portée par la protéine Ccr4 (Goldstrohm *et al.*, 2007). En effet, alors que dans un mutant $\Delta caf1$ la séquence d'adénines disparaît en totalité, on constate dans un mutant $\Delta ccr4$ la persistance d'environ 22 nucléotides, une dégradation donc partielle essentiellement assurée par Pan2/Pan3 (Tucker *et al.*, 2002 ; Viswanathan *et al.*, 2004).

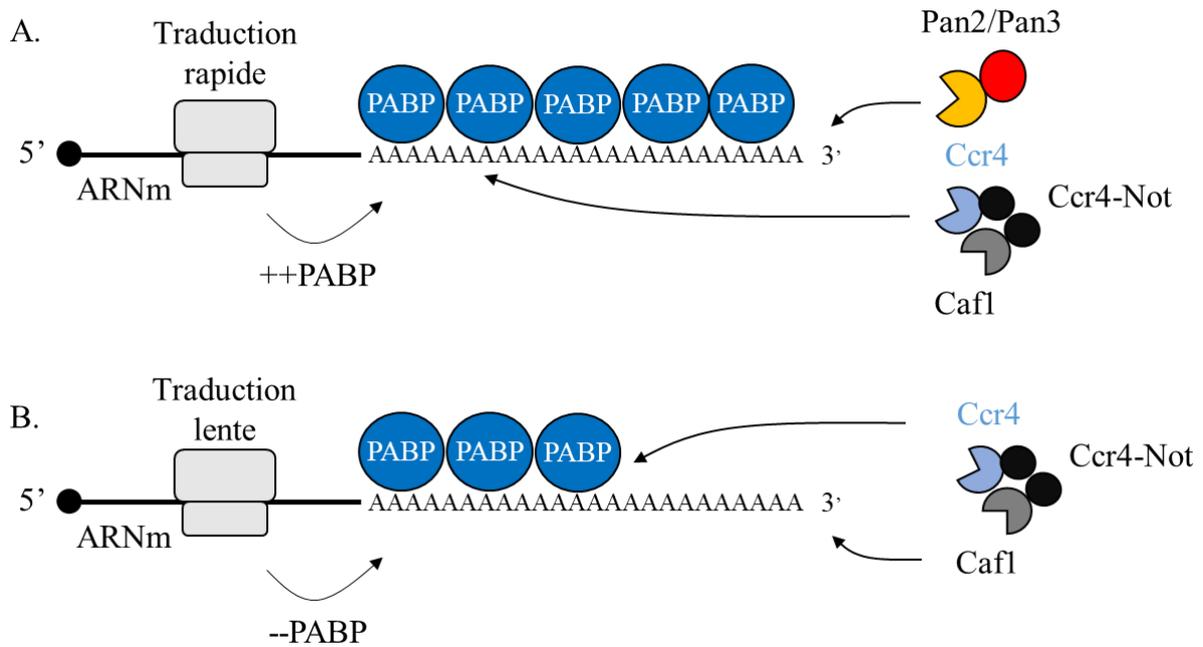


Figure 4 : Mécanismes permettant la déadénylation des ARN messagers. (Adaptée de Webster *et al.*, 2018)

(A) Un ARN doté d'une forte concentration de PABP est préférentiellement géré par les complexes exoribonucléolytiques Pan2/Pan3 puis par Ccr4-Not avec l'activité de Ccr4. (B) Lorsque peu de PABP sont associées à la queue poly(A), Caf1 et Ccr4 permettent la dégradation complète de la séquence poly(A).

Remarquablement, une délétion du gène *PAN2* est totalement compensée par l'activité de Ccr4-Not. Ce dernier est donc capable de déadényler la queue poly(A) des messagers indépendamment du complexe Pan2/Pan3. Afin de comprendre l'intérêt pour la cellule de posséder deux voies redondantes pour gérer la déadénylation, il faut d'abord appréhender les différences qui peuvent exister entre les ARN messagers. Par exemple, des ARN riches en codons optimaux auront une forte capacité à être traduits. Il a par ailleurs été montré que l'efficacité de la traduction avait une influence sur le nombre de PABP liées au 3' du messager. En d'autres termes, plus un ARN est traduit, plus il aura un grand nombre de PABP associées à sa queue poly(A). Or, les ARN pauvres en PABP ne sont pas à même de recruter efficacement le complexe Pan2/Pan3. Pour remédier à cette situation, la protéine Caf1 est recrutée aux extrémités 3' pauvres en PABP pour garantir leur dégradation. Ccr4 assure ensuite la continuité de la déadénylation en décrochant notamment les PABP restantes afin de permettre la dégradation complète de la séquence poly(A) alors dépourvues de protéines associées (Figure 4B) (Webster *et al.*, 2018 ; Bresson and Tollervey, 2018).

1.3.2 Dégradation 3'-5' de l'ARN

A l'issue de la déadénylation, l'ARN est dépourvu de PABP. Il est alors particulièrement sensible aux attaques exoribonucléolytiques pouvant intervenir sur son extrémité 3'. Chez les eucaryotes, la majorité de la dégradation 3'-5' est assurée par un complexe : l'exosome cytoplasmique. Le cœur de ce dernier, aussi appelé Exo10, est composé de neuf sous-unités structurées en tonneaux qui permettent de former un tunnel à même de guider l'ARN jusqu'à la sous-unité catalytique Rrp44 (aussi appelée Dis3 chez la levure). Bien que cette dernière possède une activité endoribonucléase et exoribonucléase processive, seul le domaine exoribonucléolytique semble impliqué pour assurer son rôle dans l'exosome (Lebreton *et al.*, 2008 ; Schaeffer *et al.*, 2009 ; Schneider *et al.*, 2009 ; Bonneau *et al.*, 2009). Pour fonctionner efficacement dans le cytoplasme, Exo10 interagit avec le complexe protéique SKI (SuperKiller) par l'intermédiaire de la protéine Ski7 (Figure 5). Le complexe SKI est un hétérotétramère composé des protéines Ski2, Ski3 et de deux copies de Ski8 (Araki *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 2005).

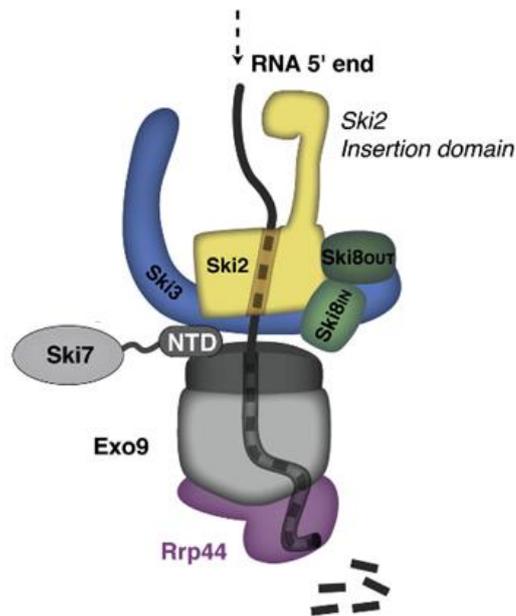


Figure 5 : Représentation schématique de l'association entre l'exosome cytoplasmique et le complexe SKI chez la levure. (D'après Halbach *et al.*, 2013)

Ce dernier permet la formation d'un tunnel dans lequel chemine l'ARN simple-brin vers l'exosome. Le rôle principal du complexe SKI est de dérouler l'ARN *via* l'activité hélicase portée par la sous-unité Ski2 tandis que les facteurs Ski3 et Ski8 assurent la régulation de Ski2

(Halbach *et al.*, 2013). Le couplage hélicase/exoribonucléase permet ainsi d'assurer la dégradation du messager jusqu'au nucléotide précédant la coiffe. Dcs1, une enzyme de décoiffage de la superfamille des pyrophosphatases hydrolyse alors la liaison entre le nucléotide et la coiffe pour terminer la dégradation de l'ARN (Figure 6-I) (Milac *et al.*, 2014).

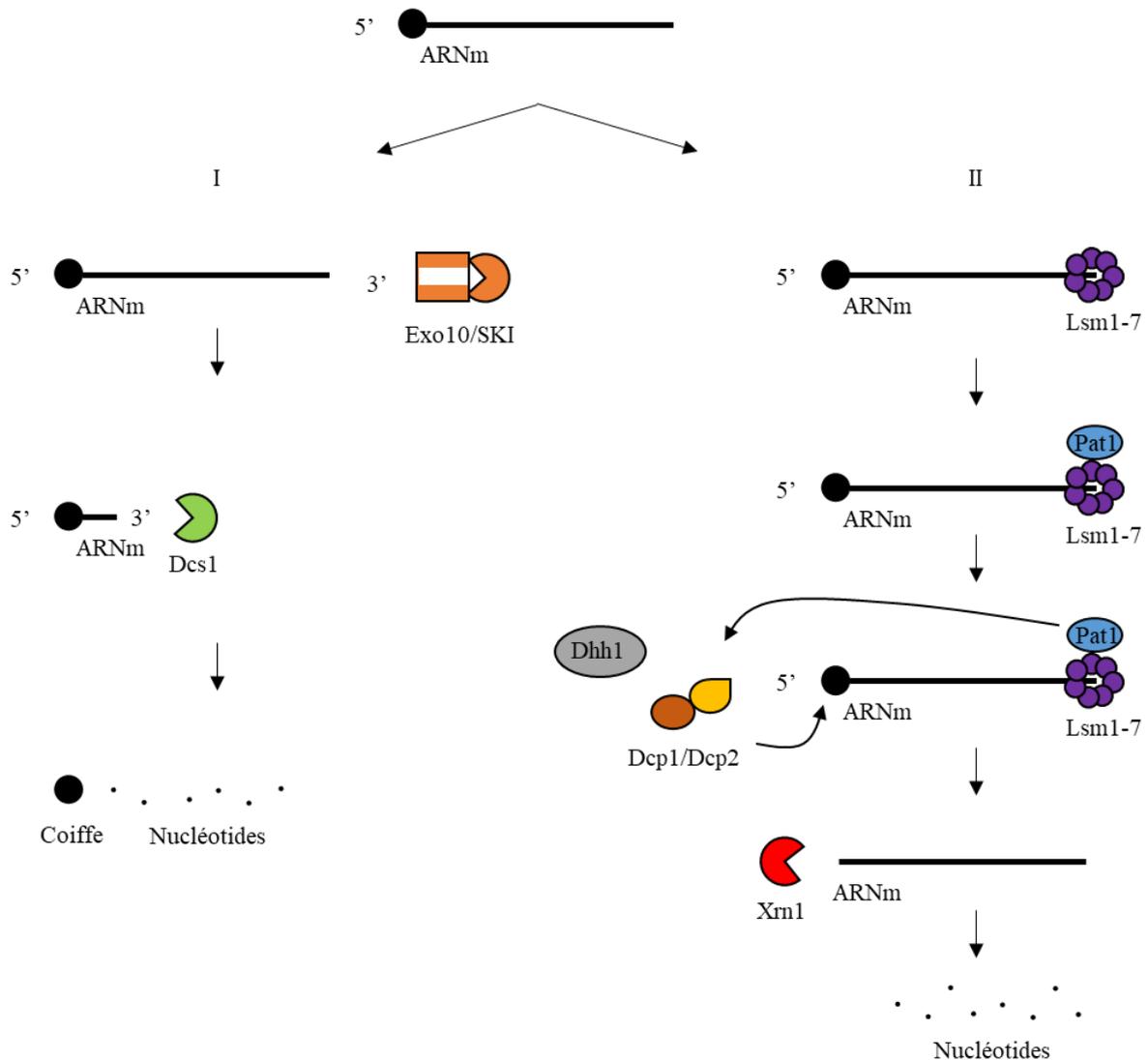


Figure 6 : Voies de dégradation 3'-5' et 5'-3' dans le cytoplasme.

(I) Après sa déadénylation, l'ARN messager peut être la cible d'attaques exoribonucléolytiques 3'-5' assurées d'abord par l'exosome, Exo10, associé au complexe SKI puis plus tardivement, par Dcs1. (II) A l'inverse, le décoiffage de l'ARN, favorisé par l'action de Dhh1, peut intervenir après le recrutement de Dcp1/Dcp2 par le complexe Lsm1-7 lié à l'extrémité 3' de l'ARN et l'action associée de Pat1. Xrn1 assure ensuite la dégradation 5'-3' de l'ARN.

1.3.3 Dégradation 5'-3' de l'ARN

Lorsque l'ARN est déadénylé, il peut être pris en charge par la voie de dégradation dite 5'-3' ou bien celle dite 3'-5'. Un avantage concevable pour la cellule d'initier la dégradation d'un messager depuis son extrémité 5' (voie 5'-3') résiderait dans le fait que les ribosomes actifs sur ce même ARN pourraient accomplir intégralement son décodage avant sa destruction. Il semblerait d'ailleurs que, chez la levure, cette voie de dégradation 5'-3' soit favorisée pour éliminer les messagers dans le cytoplasme (Jacobson and Peltz, 1996 ; Tucker and Parker, 2000). Par cette voie, aucun peptide tronqué ne serait en fait produit car jusqu'alors, aucun système de type « torpedo » décrit lors de la transcription (Proudfoot, 1989 ; Kim *et al.*, 2004) n'a été caractérisé lors de la traduction. Plus précisément, et par analogie au système torpedo, il n'a jamais été observé que la progression rapide des exoribonucléases puissent dissocier prématurément les ribosomes.

Avant de pouvoir être dégradé par des exoribonucléases 5'-3', l'ARN doit d'abord être décoiffé. Pour ce faire, un activateur du décoiffage, le complexe hétérohéptamérique Lsm1-7 est recruté à l'extrémité 3' des messagers déadénylés (Figure 6-II) (Bouveret *et al.*, 2000, Tharun *et al.*, 2000 ; Chowdhury *et al.*, 2007). Chez la levure, le recrutement de Lsm1-7 semble être favorisé par la présence de séquences polyuridine que l'on trouve aux abords de la queue poly(A) de certains messagers endogènes (Chowdhury *et al.*, 2007 ; Mitchell *et al.*, 2013). Une fois en place, Lsm1-7 interagit avec le domaine C-terminal de Pat1, une protéine capable de se lier notamment avec des facteurs impliqués dans le décoiffage des ARN. Ainsi, en plus de recruter le complexe d'hydrolyse de la coiffe Dcp1/Dcp2, Lsm1-7 favorise aussi le recrutement d'activateurs de ce complexe (Figure 6-II) (Braun *et al.*, 2010 ; Haas *et al.*, 2010 ; Nissan *et al.*, 2010 ; Ozgur *et al.*, 2010 ; Sharif *et al.*, 2013). Il permet notamment le recrutement de Dhh1 dont la fonction est de décrocher les facteurs de traduction liés à la coiffe afin de permettre à Dcp1/Dcp2 d'accéder au m⁷-Gppp en 5' de l'ARN (Coller *et al.*, 2001). L'élimination de la coiffe par ce complexe est assurée par l'activité pyrophosphatase de Dcp2, Dcp1 étant quant à lui un co-activateur de ce dernier (Dunckley and Parker, 1999). L'hydrolyse de la coiffe par Dcp2 produit un ARN avec une extrémité 5'-monophosphorylée qui devient ainsi la cible de l'exoribonucléase cytoplasmique majeure, Xrn1 (Figure 6-II) (Stevens, 1978 ; Larimer and Stevens, 1990 ; Stevens 2001). Il faut cependant noter que d'autres protéines peuvent participer à la régulation du décoiffage des ARN. C'est le cas des protéines Edc1/3 (Enhancer of mRNA DeCapping) qui sont des co-activateurs conservés chez les métazoaires du complexe Dcp1/Dcp2 (Mugdrige *et al.*, 2018). Leur action assure la levée de l'auto-inhibition de Dcp2

et permet de stabiliser l'interaction entre Dcp2/Dcp1 et l'ARN en cours de dégradation (Valkov *et al.*, 2017 ; Mugdrige *et al.*, 2016 ; Mugridge *et al.*, 2018).

Dès lors que l'ARN est décoiffé dans le cytoplasme, celui-ci est donc pris en charge par l'exoribonucléase 5'-3' Xrn1. Le cœur enzymatique de Xrn1 est constitué de deux domaines qui permettent à la nucléase de dégrader l'ARN sans nécessiter d'activité hélicase annexe (Jinek *et al.*, 2011). Une étude globale de la dégradation des ARN chez *S. cerevisiae* a montré que Xrn1 était capable de talonner le dernier ribosome en cours de traduction. Cet élément confirme donc que la voie de dégradation 5'-3' est extrêmement rapide et efficace pour éliminer un ARN décoiffé (Pelechano *et al.*, 2015).

2 Surveillance et gestion des ARN aberrants

Le maintien de l'intégrité du message génétique est un enjeu cellulaire majeur pour tous les êtres vivants. La production d'ARNm aberrants est un phénomène observable chez les eucaryotes comme chez les archées et les procaryotes. Etant donné l'importance de ce contrôle de qualité, il n'est pas surprenant que de multiples voies de surveillance aient été mises en place dans ces trois domaines du vivant (Atkinson *et al.*, 2008 ; Phung *et al.*, 2020).

Naturellement, la dégradation des ARN transcrits n'est gérée que dans un même compartiment chez les procaryotes tandis que, chez les eucaryotes, cette fonction peut être répartie entre les différents compartiments cellulaires. Néanmoins, sur l'ensemble des êtres vivants étudiés, on observe que le ribosome occupe un rôle central dans la détection et l'élimination des ARN messagers aberrants. L'objectif de ce chapitre est de décrire les principaux systèmes de surveillance qui existent chez les procaryotes et chez les eucaryotes afin de montrer l'importance pour la cellule de dégrader efficacement les messagers aberrants ainsi que les protéines en cours de traduction.

2.1 Surveillance et élimination des ARN aberrants chez les bactéries

Chez les bactéries, transcription, traduction et dégradation sont des événements étroitement associés dans le temps et dans l'espace. Il se trouve que la majeure partie des messagers aberrants bactériens sont des ARN tronqués qui ont été privés de codon STOP par des dégradations endoribonucléolytiques ou exoribonucléolytiques 3'-5' (Keiler, 2015 ; Himeno *et al.*, 2015). Quelle que soit l'origine de l'anomalie, l'absence de codon STOP génère une accumulation de complexes dits « non-STOP » qui sont composés d'un ribosome bloqué encore associé à un ARNt-peptidyl dans son site P (Schmeing *et al.*, 2009 ; Ivanova *et al.*, 2004). La détection et le recyclage de ces derniers sont déterminants pour les bactéries puisqu'une diminution globale de l'activité de la traduction est observée dès lors que la gestion de ces complexes non-STOP est impossible (Moore and Sauer, 2007 ; Ramadoss *et al.*, 2013 ; Chadani *et al.*, 2010). Ainsi, plusieurs systèmes de surveillance et d'élimination des ARN non-STOP ont été mis en place chez les bactéries pour assurer le maintien de l'intégrité du message génétique (Chadani *et al.*, 2011).

2.1.1 Mécanisme de trans-traduction.

L'élimination des ARN non-STOP et de leurs peptides associés fait intervenir dans la majorité des cas la trans-traduction. C'est un système très conservé chez les bactéries qui débute lors du blocage des ribosomes au cours de la traduction. Malgré quelques différences notables entre les ribosomes bactériens et leurs équivalents eucaryotes précédemment décrits (par exemple la différence du nombre de protéines et d'ARN ribosomiques qui les composent), les ribosomes bactériens sont constitués, compte tenu du très haut niveau de conservation de la machinerie traductionnelle dans le vivant, de sous-unités asymétriques (50S et 30S) et en particulier de sites A, P et E assurant des fonctions hautement similaires (Czernilofsky *et al.*, 1974 ; Collartz *et al.*, 1978).

Deux molécules sont principalement impliquées dans le mécanisme de trans-traduction et forment un complexe : un ARN, le tmRNA, et la protéine SmpB (Keiler *et al.*, 1996 ; Karzai *et al.*, 1999). Le tmRNA possède une structure très proche de celle d'un ARNt alanine. Il peut ainsi être reconnu par l'alanyl-ARNt synthétase qui ajoute un acide aminé alanine à l'extrémité 3' du tmRNA (Bessho *et al.*, 2007). Le complexe tmRNA_{ala}:SmpB est alors pris en charge par le facteur d'élongation de la traduction bactérien EF-Tu (équivalent de eEF1A chez les eucaryotes) afin de lui permettre d'intégrer le site A libre du ribosome bloqué de manière indépendante du codon présent sur l'ARNm (Figure 7-I). La translocation est ensuite engagée par la reconnaissance du tmRNA par le facteur d'élongation procaryote EF-G (équivalent de eEF2 chez les eucaryotes) (Barends *et al.*, 2000 ; Rudinger-thirion *et al.*, 1999). Cette réaction va provoquer d'une part l'ajout d'une alanine sur le peptide naissant et d'autre part le déplacement de l'ARNm permettant à une portion de la séquence du tmRNA de prendre place comme nouvelle matrice ARN à décoder (Felden *et al.*, 1996 ; Tu *et al.*, 1995). La traduction redémarre alors et elle se poursuit jusqu'à ce que le ribosome atteigne un codon STOP présent sur le tmRNA. La séquence peptidique, ajoutée par ce mécanisme à l'extrémité C-terminale du peptide naissant, permet alors d'adresser celui-ci à des protéases afin d'empêcher son accumulation dans le cytoplasme. A l'issue de la trans-traduction, le complexe tmRNA:SmpB recrute la RNase R qui, par son activité exoribonucléolytique 3'-5', élimine le messenger aberrant (Richards *et al.*, 2006 ; Venkataraman *et al.*, 2014).

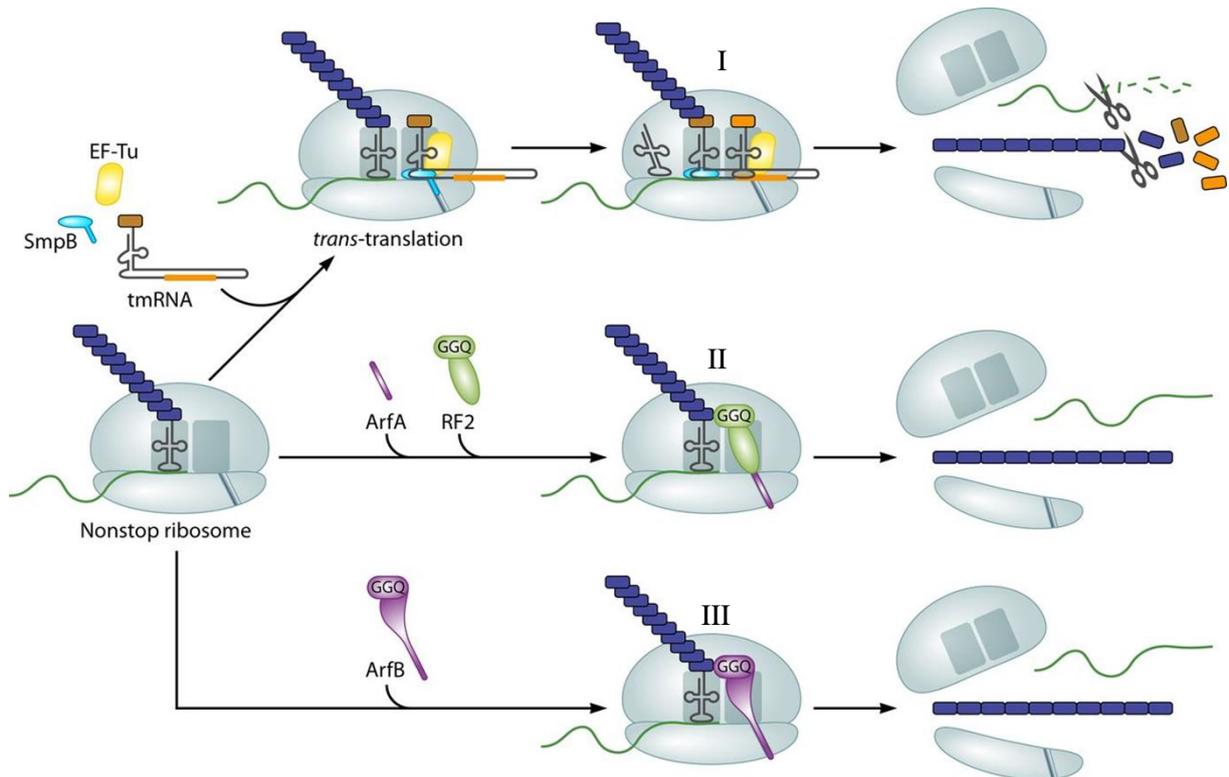


Figure 7 : Systèmes de surveillance chargés de l'élimination des complexes Non-STOP chez les bactéries. (D'après Keller and Faega, 2014)

(I) Mécanisme impliquant le tmRNA. Les ciseaux représentent l'intervention de la RNase chargée d'éliminer l'ARN. L'intervention de (II) ArfA et Rf2 ou, alternativement (III) ArfB, au niveau du site A du ribosome bloqué permettent la dissociation du complexe non-STOP.

2.1.2 Mécanismes impliquant ArfA et ArfB

L'élimination des ARN aberrants, des peptides naissants ainsi que le recyclage des ribosomes bloqués sont des enjeux vitaux pour la cellule. Ainsi, il existe des systèmes alternatifs au tmRNA qui permettent d'assurer la survie cellulaire par le recyclage des sous-unités ribosomales.

Une des voies alternatives de dégradation est assurée par la protéine ArfA. Ce mécanisme commence par l'intégration de ArfA dans le site A libre d'un ribosome bloqué sur un messager aberrant. Le facteur de terminaison de la traduction RF2 (équivalent de eRF1 chez les eucaryotes) est alors recruté par ArfA au niveau du ribosome afin de déclencher l'hydrolyse de l'ARNt-peptidyl et la dissociation du ribosome (Figure 7-II). Remarquablement, ce mécanisme ne nécessite pas la présence d'un codon STOP dans le centre de décodage du ribosome (Shimizu, 2012 ; Chadani *et al.*, 2012). A la suite de la dissociation du ribosome,

l'ARNm et le peptide naissant sont relâchés dans le cytoplasme. Contrairement au système impliquant le tmRNA, aucun mécanisme spécifique permettant la dégradation de ces deux molécules aberrantes n'a été décrit dans la littérature.

La beauté de cette voie alternative réside aussi dans le fait qu'elle n'est pas constitutive puisqu'elle s'active lorsque le système tmRNA est défectueux. L'ARNm de ArfA possède une structure secondaire en tige-boucle qui est clivée en 5' du codon STOP par l'endoribonucléase RNase III. Ce clivage transforme le messenger de ArfA en un ARN non-STOP dont l'expression est réprimée par le tmRNA (Chadani *et al.*, 2011 ; Garza-Sanchez *et al.*, 2011). Cependant, dans un contexte où le tmRNA n'est plus fonctionnel, le peptide tronqué de ArfA est relargué dans le cytoplasme et peut alors jouer son rôle dans la gestion des ARN aberrants. Ce système de régulation de l'ARNm ArfA est conservé chez les bactéries gram-positives et gram-négatives (Schaub *et al.*, 2012).

Enfin, il existe un troisième système de recyclage des ribosomes bloqués faisant intervenir la protéine ArfB. Cette dernière assure une redondance fonctionnelle avec les systèmes présentés précédemment puisqu'il existe une létalité synthétique chez les bactéries dépourvues du tmRNA, de ArfA et de ArfB (Chadani *et al.*, 2011). ArfB possède plusieurs domaines capables d'interagir avec des ribosomes bloqués. Elle possède un domaine C-terminal responsable de la reconnaissance du messenger dans le site A libre et un motif GGQ au niveau de son extrémité N-terminale (Figure 7-III) (Chadani *et al.*, 2011 ; Handa *et al.*, 2011). Ainsi, lorsque ArfB se lie au site A du ribosome, elle hydrolyse l'ARNt-peptidyl et permet le recyclage du ribosome par l'interaction de son domaine GGQ avec le PTC de la sous-unité 50S (Kogure *et al.*, 2014). Tout comme le mécanisme impliquant ArfA, aucun système spécifique responsable de l'élimination du peptide naissant ou de l'ARNm n'a à ce jour été décrit dans la littérature (Keiler, 2015).

2.2 Élimination des ARN aberrants chez les eucaryotes

Chez les eucaryotes, la régulation de l'expression des gènes diffère de celle des procaryotes par le fait qu'elle est assujettie à l'existence d'une compartimentation cellulaire entre le noyau et le cytoplasme. Il existe ainsi dans chacun des compartiments cellulaires des mécanismes chargés de contrôler la qualité des messagers et d'éliminer ceux pouvant présenter une menace pour l'intégrité cellulaire. Ce chapitre décrira tout d'abord les mécanismes de contrôle qualité des ARN qui existent dans le noyau puis dans une seconde partie présentera les voies de surveillance complémentaires qui prennent place dans le cytoplasme.

2.2.1 Surveillance nucléaire des ARN chez les eucaryotes.

Le noyau et la transcription peuvent être vus comme le lieu et l'étape au cœur de l'expression du message génétique. Dès les premières étapes de sa vie, l'ARN messenger subit des modifications de sa structure pour assurer sa stabilité et sa traductibilité dans le cytoplasme. Cependant, tout comme l'ARN polymérase II, les enzymes impliquées dans les mécanismes de coiffage, de polyadénylation ou d'épissage des ARN peuvent produire des erreurs responsables de la distorsion de l'information génétique initialement portée par l'ADN. Les mécanismes mis en place dans le noyau pour pallier ces aberrations seront ainsi décrits dans cette section.

2.2.1.1 Elimination des coiffes aberrantes.

La nature de l'extrémité 5' de l'ARNm joue un rôle déterminant dans la stabilité, l'export et la capacité de cet ARN à être traduit dans le cytoplasme. De manière générale, l'ajout d'une coiffe 7-méthylguanonsine intervient très rapidement en 5' de l'ARN après le démarrage de la transcription. Cette modification joue notamment un rôle déterminant dans la protection du messenger face aux attaques exoribonucléolytiques 5'-3' (Ramanathan *et al.*, 2016). Cependant, des erreurs dans le coiffage des ARN peuvent intervenir durant la maturation de l'extrémité 5' du messenger. Plusieurs systèmes sont présents dans le noyau afin de prévenir l'accumulation de messagers possédant des coiffes aberrantes qui seraient à même d'interagir de manière aspécifique avec divers composants cellulaires.

Le premier système fait intervenir Rat1 qui est la principale exoribonucléase nucléaire 5'-3'. Celle-ci s'associe en complexe avec la pyrophosphatase Rai1 dans le but de cibler spécifiquement les messagers possédant des coiffes non-méthylées. Ces derniers sont alors ciblés par Rai1 qui provoque l'hydrolyse de leur coiffe et la déphosphorylation de leur extrémité 5'. L'ARN est ensuite pris en charge par Rat1 qui procède alors à leur élimination dans le noyau. De la même manière, lorsqu'un ARN n'est pas coiffé co-transcriptionnellement, l'extrémité 5' nue du messenger est reconnue par Rat1 qui élimine cet ARN aberrant (Xiang *et al.*, 2009).

Un second système est, quant à lui, chargé d'éliminer les transcrits associés à une molécule de nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) jouant le rôle de coiffe au niveau de leur extrémité 5' (Walters *et al.*, 2017 ; Jiao *et al.*, 2017). Il est proposé que la présence d'ARN associés à des coiffes NAD⁺ soit le résultat d'une activation alternative de la transcription. En effet, il est possible pour la polymérase de substituer une molécule d'ATP par une molécule de NAD⁺ pour initier la transcription d'un ARN commençant par une adénine (Bird *et al.*, 2016 ; Hung, 2011). Les ARN ainsi produits avec une coiffe NAD⁺ ne semblent, ni reconnus par les

ribosomes, ni traduits, bien qu'ils tendent à s'accumuler dans certaines conditions de stress (Kiledjian, 2018). L'utilité de ce coiffage atypique des ARN n'a pour le moment pas été démontrée et il semblerait que, dans des conditions optimales de croissance, ces derniers soient rapidement décoiffés puis dégradés dans la cellule. Cette fonction est assurée par Dxo1 (DXO chez les mammifères) qui est une enzyme à la fois nucléaire et cytoplasmique (Walters *et al.*, 2017 ; Zheng *et al.*, 2011). Cette dernière possède d'une part, une activité pyrophosphohydrolase capable d'exciser le NAD⁺ et d'autre part, une activité distributive exoribonucléase 5'-3' (Chang *et al.*, 2012). Il semblerait cependant que, pour éliminer intégralement l'ARN messager après son décoiffage, Dxo1 nécessite l'intervention des voies de dégradation 5'-3' des ARN. Il est proposé que Dxo1 puisse agir à la fois dans le noyau de concert avec Rat1: Rai1 et dans le cytoplasme afin d'empêcher l'accumulation des ARN-NAD⁺ qui auraient fui dans ce compartiment (Chang *et al.*, 2012 ; Jiao *et al.*, 2017).

2.2.1.2 Rôle de l'exosome nucléaire dans la gestion des messagers aberrants

L'accumulation d'ARN mal maturés dans le noyau peut affecter l'expression des gènes selon plusieurs mécanismes en réduisant, par exemple, d'une part, la disponibilité des protéines nucléaires de liaisons aux ARN, et en provoquant, d'autre part, des cassures de l'ADN (Frenk *et al.*, 2014 ; Bresson and Tollervey, 2018). Ce problème se pose notamment lorsque l'on observe dans la cellule une diminution de l'activité des voies de dégradation des ARN (Frenk *et al.*, 2014). Tout comme dans le cytoplasme, deux voies exoribonucléolytique 5'-3' ou 3'-5' coexistent pour assurer la dégradation de la majorité des ARN dans le noyau. Chez la levure, le principal acteur de la dégradation 3'-5' est l'exosome nucléaire. Celui-ci est composé des mêmes sous-unités que son homologue cytoplasmique (Exo10) à l'exception de l'exoribonucléase 3'-5' Rrp6 seulement présente dans la version nucléaire (Briggs *et al.*, 1998 ; Allmang *et al.*, 1999 ; Callahan *et al.*, 2008). L'importance de Rrp6 dans l'exosome nucléaire est double. Elle permet d'une part, d'assister Rrp44 dans la dégradation des ARN et d'autre part, elle participe à la rétention des transcrits aberrants au niveau de leur lieu de transcription. Le phénomène de rétention des ARN a effectivement été constaté pour des transcrits ayant par exemple des défauts d'épissage ou de terminaison de la transcription (Rougemaille *et al.*, 2007 ; de Almeida *et al.*, 2010 ; Eberle *et al.*, 2010 ; Hilleren *et al.*, 2001). Il est proposé que la rétention des ARN, dépendante de Rrp6, a pour but de permettre à l'ARN de terminer sa maturation ou, le cas échéant, de provoquer sa dégradation pour empêcher son exportation dans le cytoplasme (Kilchert *et al.*, 2016). Il a d'ailleurs été montré que l'exosome nucléaire était notamment responsable de la dégradation de pré-ARNm aberrants mal épissés ou possédant des

séquences 3'-UTR anormalement longues lors d'une déficience de la terminaison de la transcription (Bousquet-Antonelli *et al.*, 2000 ; Torchet *et al.*, 2002).

Il faut par ailleurs noter que l'exosome nucléaire possède de nombreux co-facteurs qui lui permettent de cibler et d'éliminer certains transcrits. Le plus étudié d'entre eux est le complexe TRAMP (**T**rf4/5-**A**ir1/2-**M**tr4 **P**olyadenylation) qui est composé des poly(A) polymérases Trf4/5, des facteurs de liaison aux ARN Air1/2 et de l'hélicase Mtr4 (LaCava *et al.*, 2005). La dégradation d'un ARN par le complexe TRAMP se déroule en deux étapes principales. Lorsque le complexe reconnaît un ARN cible, Trf4/5 ajoute d'abord une courte séquence poly(A) reconnue par la suite par Mtr4 qui alors procède au déroulement de l'ARN. Parallèlement à cette étape, l'exosome est recruté à l'extrémité 3' de l'ARN afin de procéder à sa dégradation (Figure 8) (LaCava *et al.*, 2005 ; Wlotzka *et al.*, 2011 ; Jia *et al.*, 2011). Le complexe TRAMP possède de nombreux substrats, dont des ARNr, des ARNt, des transcrits de l'ARN polymérase II ou encore des snoARN (Schmidt and Butler, 2013).

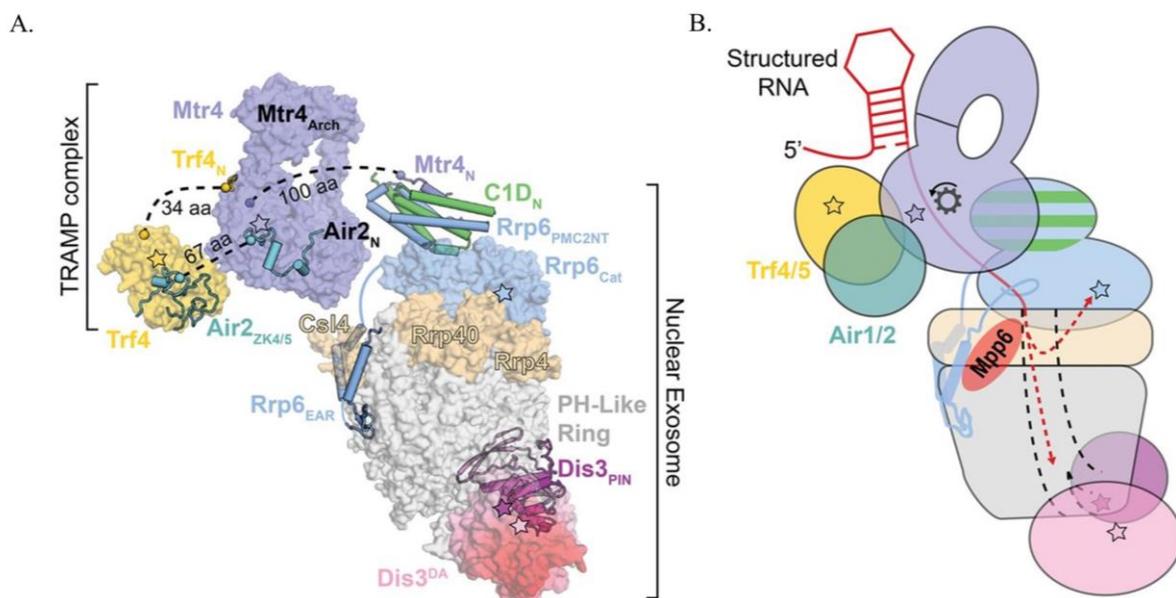


Figure 8 : Association de l'exosome nucléaire et du complexe TRAMP. (D'après Zinder *et al.*, 2017)

(A) Structure de l'association de l'exosome nucléaire et du complexe TRAMP et (B) sa représentation schématisée

Chez *S. cerevisiae*, il existe des facteurs supplémentaires, à l'image du complexe NNS, qui permettent d'adresser le complexe TRAMP et l'exosome au niveau de certains ARN. Le complexe NNS est couplé à la terminaison de la transcription et se compose des facteurs Nrd1, Nab3 et Sen1 (Arigo *et al.*, 2006 ; Thiebaut *et al.*, 2006 ; Schultz *et al.*, 2013). Lors de la transcription, les protéines Nrd1 et Nab3 se lient à l'aide de la queue CTD de l'ARN polymérase II à des séquences consensus présentes sur certains ARN (Wlotza *et al.*, 2011 ; Creamer *et al.*, 2011). Une fois en place, Sen1 est recrutée par Nrd1 et Nab3 pour former le complexe NNS fonctionnel. Sen1 possède une activité d'hélicase ADN qui permet de décrocher l'ARN polymérase II afin d'arrêter la transcription de l'ARN (Figure 9). Il en résulte ainsi un ARN aberrant dépourvu de queue poly(A) qui doit être éliminé par la cellule. Pour ce faire, le complexe NNS recrute le complexe TRAMP associé à l'exosome à l'extrémité 3' de l'ARN. De par son mode de recrutement, le complexe NNS permet d'adresser spécifiquement la machinerie de dégradation 3'-5' au niveau de certains transcrits de l'ARN polymérase II. Ainsi, le complexe NNS assure à la fois l'élimination de courts messagers aberrants et des transcrits tels que les CUTs (Cryptic Unstable Transcripts) qui peuvent être issus de la transcription pervasive de l'ARN pol II (Neil *et al.*, 2009 ; Steinmetz *et al.*, 2001 ; Schluz *et al.*, 2013 ; Thiebaut *et al.*, 2006).

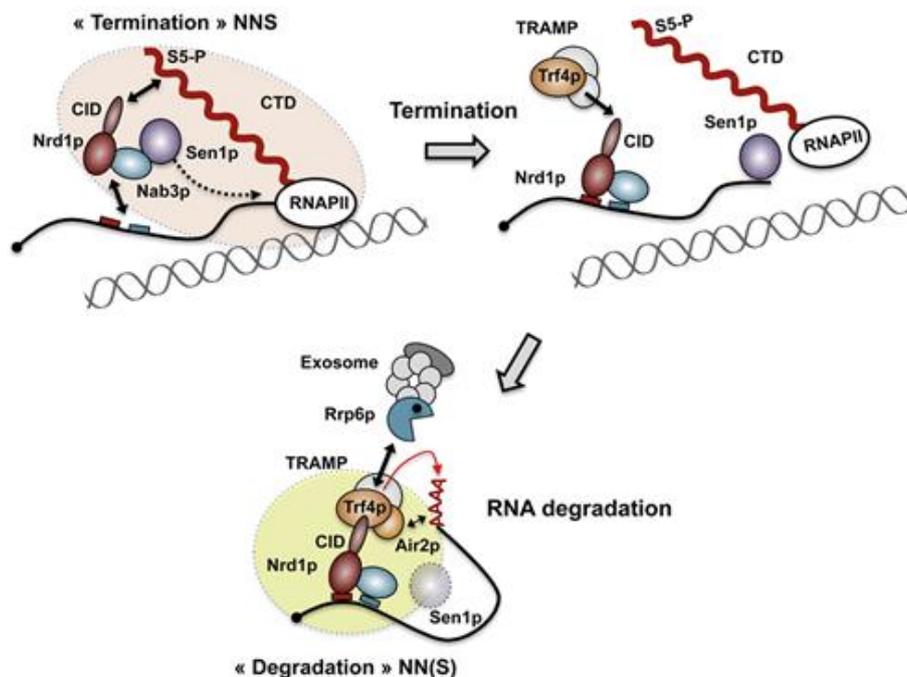


Figure 9 : Recrutement du complexe TRAMP par le complexe NNS. (D'après Tudek *et al.*, 2014)

2.2.2 Voies de surveillance cytoplasmiques des ARN messagers

Du fait de la compartimentation, la cellule eucaryote a cette possibilité de contrôler et d'éliminer les messagers aberrants avant que ceux-ci n'atteignent le cytoplasme et ne soient traduits en protéines toxiques. Cependant, la surveillance nucléaire n'est pas complète et il existe des messagers aberrants qui parviennent tout de même à être exportés dans le cytoplasme. Ainsi, des messagers possédant des défauts réellement informationnels, des changements de cadre de lecture ou des mutations ponctuelles, seront exportés dans le cytoplasme pour y être traduits en protéines. Enfin, la production d'ARN aberrants peut aussi résulter d'altérations très tardives dans le noyau et bien sûr après leur export dans le cytoplasme. On peut citer à titre d'exemple l'oxydation des ARN ou les attaques des ribonucléases cytoplasmiques qui sont responsables de dommages irréversibles des messagers. Trois voies principales de surveillance cytoplasmique des ARN sont ainsi présentes chez les eucaryotes pour détecter et éliminer les messagers aberrants afin de prévenir leur accumulation dans le cytoplasme. On trouve ainsi les voies du Nonsense Mediated Decay (NMD), du Non-Stop Decay (NSD) et du No-Go Decay (NGD) qui vont chacune gérer des substrats qui leurs sont spécifiques (He *et al.*, 2003 ; van Hoof *et al.*, 2002 ; Doma and Parker, 2006).

2.2.2.1 Le Nonsense Mediated Decay

La voie du Nonsense Mediated Decay (NMD) est activée lorsque le site A du ribosome est occupé par un codon STOP précoce. Il existe trois grandes catégories d'ARN messenger reconnus par le NMD. La première catégorie regroupe des ARN qui ont été maturés avec succès lors de la transcription mais qui possèdent un codon STOP précoce dans leur séquence. L'apparition de ces derniers est généralement causée par des mutations non-sens ou des mutations responsables d'un changement de cadre de lecture (He *et al.*, 2003 ; Weischenfeldt *et al.*, 2012 ; Ni *et al.*, 2007 ; Lykke-Andersen *et al.*, 2002 ; Jaillon *et al.*, 2008). Un second groupe d'ARN pris en charge par le NMD est composé quant à lui d'ARN non-codants, tels que les SUT (Stable Uncharacterized Transcripts) et les XUT (Xrn1-sensitive Unstable Transcripts), qui sont pris en charge par les ribosomes dans le cytoplasme (Kurihara *et al.*, 2009 ; Tani *et al.*, 2013). Enfin, le NMD participe aussi à l'élimination des messagers issus de défauts de maturation. Parmi ces derniers ont été notamment répertoriés des messagers associés à des séquences 3'UTR anormalement longues, mais aussi des ARN porteurs de petites séquences codantes en amont de la séquence codante correspondant à la protéine fonctionnelle, ou bien encore des pré-ARNm qui possèdent des codons non-sens précoces en phase avec le

cadre de lecture de la traduction (Kebaara *et al.*, 2009 ; Gaba *et al.*, 2005 ; Zaborske *et al.*, 2013 ; He *et al.*, 1993).

Initialement caractérisé chez la levure et *C. elegans* comme un simple mécanisme chargé d'éliminer des ARN aberrants, il semblerait que le NMD puisse aussi jouer un rôle dans le développement cellulaire et la mise en place de l'immunité innée chez certains organismes multicellulaires (Leeds *et al.*, 1991 ; Pulak and Anderson, 1993 ; Medghalchi *et al.*, 2001 ; Wittkopp *et al.*, 2009 ; Sakaki *et al.*, 2012 ; Balistreri *et al.*, 2014).

Chez la levure, la dégradation d'un ARN par le NMD nécessite la mise en place d'un complexe composé de l'hélicase Upf1 et de ses cofacteurs Upf2 et Upf3, tandis que des facteurs additionnels de la famille des SMG sont aussi nécessaires chez les organismes multicellulaires (Figure 10) (Kervestin and Jacobson 2012 ; He and Jacobson 2015). Néanmoins, une étude récente propose que les protéines Nmd4 et Ebs1 seraient des homologues fonctionnels des protéines Smg5-6-7 chez la levure (Dehecq *et al.*, 2018).

Le complexe Upf1-3 est capable d'interagir avec le ribosome, avec des facteurs d'élongation de la traduction et de même avec des protéines impliquées dans la dégradation cytoplasmique des ARN. Les modèles actuels suggèrent que Upf1-3 jouerait un rôle actif dans la dissociation des ribosomes dans le but de faciliter la dégradation des messagers pris en charge par le NMD (Franks *et al.*, 2010 ; Ghosh *et al.*, 2010 ; Okada-Katsuhata *et al.*, 2012 ; Nicholson *et al.*, 2014 ; He and Jacobson, 2015). Chez la levure, la dégradation de l'ARN par le NMD fait majoritairement intervenir les facteurs de décoiffage et l'exoribonucléase Xrn1, tandis que, chez les mammifères, un clivage endoribonucléolytique semble être à l'origine de l'élimination des messagers (Muhlrad and Parker, 1994 ; He and Jacobson, 2001 ; Huntzinger *et al.*, 2008 ; Boehm *et al.*, 2014).

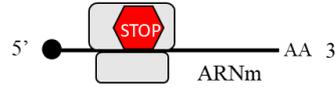
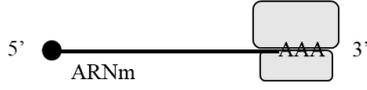
	Substrats	Initiation	Dégradation	
			ARNm	Peptide
<p>NMD</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Stop précoce • Défauts maturation <ul style="list-style-type: none"> • uORF • ARN non codants 	<p>Upf1 Upf2/3</p>	<p>SMG6 ou Xrn1/exosome</p>	<p>Aidée par Upf1</p>
<p>NSD</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Absence STOP • Poly(A) cryptique 	<p>Asc1 Hel2</p>	<p>Exosome Cue2?</p>	<p>RQC</p>
<p>NGD</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Codons rares • Structures secondaires <ul style="list-style-type: none"> • troncations 	<p>Asc1 Hel2</p>	<p>Cue2?</p>	<p>RQC</p>

Figure 10 : Principaux acteurs des voies de dégradation des ARN aberrants dans le cytoplasme. (Adaptée de Inada, 2016)

2.2.2.2 Le Non-Stop Decay et le No-Go Decay

Les voies de surveillance du Non-Stop Decay (NSD) et du No-Go Decay (NGD) sont chacune activées lorsque le ribosome se bloque en cours de l'élongation de la traduction. Il possède alors un site A libre (pour des raisons que nous décrirons) qui jouera un rôle important dans le recyclage et l'élimination du messenger aberrant par ces deux systèmes de surveillance. Il existe de nombreuses similitudes entre le NSD et le NGD, néanmoins, ces deux voies se distinguent avant tout par la nature des ARN qu'elles reconnaissent dans le cytoplasme (Figure 10).

2.2.2.2.1 Les ARN cibles du Non-Stop Decay

Le Non-Stop Decay est par définition la voie de surveillance cytoplasmique qui assure l'élimination d'ARNm associés à des ribosomes bloqués par le décodage de séquence poly(A), sachant que ces mêmes ribosomes n'auront pas rencontré ou détecté au préalable un codon STOP de traduction.

Il existe principalement deux catégories d'ARN non-STOP pouvant être ciblés par le NSD dans le cytoplasme. La première regroupe les messagers transcrits à partir de gènes porteurs de mutations de leur codon STOP. Il a été montré que ces ARN aberrants pouvaient

jouer un rôle dans le développement de neuropathies chez l'humain (Torres-Torronteras *et al.*, 2011). Il arrive aussi que des messagers soient pris pour cibles par le NSD sans qu'aucune mutation du codon STOP n'en soit à l'origine. C'est notamment le cas lors du stress oxydant où l'efficacité de la terminaison de la traduction est affectée. L'explication tient par le fait que la protéine eRF3 est très sensible à l'oxydation et tend à s'agréger en présence d'H₂O₂. Dans ce contexte, l'activité de eRF3 décroît au point de ne plus assurer pleinement la terminaison de la traduction sur l'ensemble des ARNm. Une proportion non-négligeable de ribosomes tend alors à passer outre le codon STOP pour finalement décoder le 3'-UTR et la séquence poly(A) des messagers. Ils sont alors détectés par le NSD qui enclenche la dégradation des messagers concernés (Jamar *et al.*, 2017). La seconde catégorie d'ARN cibles du NSD regroupe les ARN dont la queue poly(A) a été intégrée à la séquence codante lors de la transcription. Ces ARN sont générés lorsque la polyadénylation du messenger s'effectue de manière précoce à la suite de l'activation d'une séquence cryptique de polyadénylation contenue dans certains gènes (Frischmeyer *et al.*, 2002 ; Ozsolak *et al.*, 2010 ; Pelechano *et al.*, 2013).

Jusqu'à très récemment, il était proposé que les arrêts des ribosomes sur ces séquences poly(A) pouvaient résulter d'un blocage de l'élongation par la présence des protéines PABP ou bien du fait de l'accumulation de charges positives portées par les lysines dans le tunnel ribosomal de sortie du peptide (Guydosh and Green, 2017 ; Lu and Deutch, 2008). Cependant, ces modèles seuls ne peuvent pas expliquer l'intégralité des données présentes dans la littérature. En effet, alors qu'ils codent chacun pour le même acide aminé, il est montré que des codons lysines (AAG)_n n'affectent pas autant l'élongation de la traduction que des codons lysines (AAA)_n lorsqu'ils sont positionnés au milieu d'un messenger. Ainsi, ces résultats suggèrent que la séquence en nucléotide de l'ARN joue aussi un rôle essentiel dans le blocage des ribosomes sur les séquences poly(A). Une étude récente menée par l'équipe de R.S. Hegde sur le sujet a montré qu'il existe deux raisons pour lesquelles un ribosome se trouve immobilisé sur les séquences (AAA)_n en 3' des messagers (Chandrasekaran *et al.*, 2019). En effet, les premières lysines incorporées au peptide interagissent, de par leur charge négative, avec le tunnel de sortie du peptide, ce qui modifie la structure du centre peptidyl-transferase. Cet événement affecte ainsi la vitesse de traduction du ribosome. En plus de cet effet, la succession d'adénines présentes dans les sites A, P et E du ribosome génère une torsion de l'ARN qui interfère avec la fonction de décodage de la sous-unité 40S. Le ribosome se trouve ainsi bloqué sur l'ARN et son recyclage nécessite alors l'intervention du NSD (Chandrasekaran *et al.*, 2019).

2.2.2.2.2 Les ARN cibles du No-Go Decay

Au travers de la littérature, il apparaît surtout que la voie du NGD souffre de ne pas avoir une définition claire qui permet, pour certains cas dits de NGD, de la démarquer totalement de la voie du NSD. Il est donc bon de définir ce que nous entendons par NGD.

Le No-Go Decay est une voie de surveillance chargée d'assurer l'élimination d'ARNm faisant face à des éléments (structuraux ou liés au code) bloquant l'étape d'élongation assurée par les ribosomes. Ceci ne permet pas de la différencier réellement de la voie du NSD car comme nous l'avons vu le NSD fait aussi intervenir ces différents éléments (Figure 10). Les éléments structuraux sont cependant ceux qui furent les premiers à être considérés et utilisés pour définir le NGD en 2006. Ainsi, un ARN typique cible du NGD est celui portant des structures secondaires suffisamment fortes pour inhiber l'élongation de la traduction, telles que des tiges boucles ou des G-quadruplex (Doma and Parker 2006 ; Song *et al.*, 2016). Un point important de ce type de NGD est donc que la nature des codons sur lesquels les ribosomes bloquent est alors secondaire, la cause primaire du blocage étant extérieure aux ribosomes et placée en aval de la zone de décodage, ce qui est différent du NSD.

Cependant, dans la catégorie des ARN dits cibles du NGD, il a été montré que la présence de séries de codons rares, ou de codons dictant l'incorporation d'acides aminés électro-négatifs sont aussi activateurs de cette voie (Doma and Parker, 2006 ; Tsuboi *et al.*, 2012). Il semblerait toutefois que le déclenchement du NGD à partir de ces séquences nécessite une succession de codons rares ou électro-négatifs telle qu'il est difficile d'en rencontrer dans des messagers naturels. Ces séquences ont été et sont cependant très utilisées pour comprendre les mécanismes du NGD. Par ailleurs, les ARN endommagés lors de stress oxydants sont aussi considérés comme cibles de la voie du NGD (Simms *et al.*, 2014). Nous serions tentés de dire que, pour ces ARN cibles du NGD (codons rares, codons dictant l'incorporation d'acides aminés électro-négatifs), l'absence d'une séquence poly(A) en lecture par les ribosomes est l'élément qui les distingue réellement du NSD.

En résumé, nous définissons donc par défaut qu'une cible NGD est un ARN associé à des ribosomes bloqués en cours de traduction mais qui ne correspond pas à la définition d'une cible NSD comme mentionnée plus haut (ARNm associé à des ribosomes bloqués par le décodage de séquence poly(A) sans que ces mêmes ribosomes n'aient au préalable rencontré ou détecté un codon STOP de traduction).

De manière intéressante, nous verrons par la suite que de nombreuses études effectuées sur les ARN cibles NSD montrent qu'ils se distingueraient, de manière nuancée aussi des ARN cibles du NGD, par les mécanismes mis en œuvre.

2.2.2.2.3 *Le cas particulier des ARN tronqués*

Les ARN messagers tronqués constituent à nos yeux une classe particulière de messagers. Ils sont en effet dépourvus de codon STOP, si bien qu'ils sont parfois décrits comme des ARN non-STOP. Cependant, la perte de leur séquence poly(A) les différencie fortement des ARN cibles du NSD (Guydosh and Green, 2014). Ils mériteraient toutefois une définition particulière car ils se distinguent aisément par l'absence physique d'un codon complet au site A du ribosome. Le nom d'une voie de dégradation de ce type pourrait donc plutôt s'inspirer d'une signalétique routière existante du type « Bridge to Nowhere » ou bien artistique comme « Road to Nowhere » pour aboutir à la voie du « Go-NoWhere » mRNA Decay. Ces ARN ont différentes origines comme, par exemple, la ligation défectueuse d'exons en cours d'épissage. Il a effectivement été montré que l'activité kinase ou ligase de la protéine Trl1, durant l'épissage de l'ARNm HAC1 dans le cytoplasme, n'était pas optimale et menait à l'accumulation naturelle d'une forme tronquée de HAC1 (Guydosh and Green 2014 ; Cherry *et al.*, 2019). Une autre population d'ARNm tronqués peut quant à elle être produite à l'issue de dommages induits par l'oxydation sur les acides nucléiques ou bien de toutes autres cassures d'origine chimique de l'ARN (Zhao *et al.*, 2013).

De manière remarquable, tous les ARN aberrants cibles NSD et NGD décrits plus haut, y compris ceux tronqués, ont en fait la particularité d'être la cible d'une activité endoribonucléolytique pour produire au final de nouveaux ARN tronqués (Gatfield and Izaurralde, 2004 ; Doma and Parker, 2006). Les ARN tronqués sont donc un point de convergence entre la voie du NGD et du NSD et révèlent ainsi la complexité des interconnexions qui peuvent exister entre ces deux voies.

Un autre point de convergence est que, quelle que soit l'origine du clivage des messagers, on observe une accumulation de ribosomes bloqués en cours d'élongation au niveau de leurs extrémités 3' qui les rend particulièrement sensibles aux facteurs de recyclage des ribosomes, ce que nous aborderons ci-dessous (Tsuboi *et al.*, 2012).

2.2.2.2.4 Reconnaissance et recyclage des ribosomes bloqués

Dans la cellule, l'élongation de la traduction n'est pas un phénomène linéaire et homogène. Dans des conditions physiologiques, la vitesse de traduction est influencée par la nature des codons et par certains éléments qui peuvent provoquer le ralentissement voire la pause des ribosomes (Revue Collart and Weiss, 2020). Cependant, comme explicité précédemment, le blocage des ribosomes sur le messenger peut avoir lieu avec des conséquences importantes sur l'homéostasie cellulaire. Faire la distinction entre les arrêts physiologiques et pathologiques des ribosomes est donc un enjeu majeur pour la cellule. Le mécanisme responsable de la reconnaissance des ribosomes bloqués a été pendant longtemps mal compris mais de nombreuses études publiées ces dernières années ont permis d'en décrire les principales étapes.

Le processus de détection des ribosomes bloqués de manière aberrante a été largement étudié dans le cadre du NGD, et dans le cadre de la voie de surveillance du NSD les résultats obtenus avec des constructions poly(A) suggèrent qu'il existe une certaine conservation des mécanismes impliqués (Brandman and Hegde, 2016 ; Garzia *et al.*, 2017). Selon le modèle proposé pour le NGD, le blocage d'un ribosome en cours d'élongation sur l'ARN génère un embouteillage des 80S en amont de celui-ci. Ce phénomène, qualifié de collision des ribosomes, semble être le premier signal indiquant aux voies de surveillance que la traduction d'un ARN messenger est problématique (Simms *et al.*, 2017). L'accumulation des ribosomes sur un messenger provoque l'apparition d'une structure particulière au niveau des deux ribosomes bloqués les plus en 3' de l'ARN (aussi appelés disome) (Figure 11). La conformation adoptée par le disome, aussi appelée interface 40S/40S, est composée d'un ribosome en état de post-translocation situé en 3' d'un ribosome en état hybride A/P P/E (Juszkiewicz *et al.*, 2018 ; Ikeuchi *et al.*, 2019) (Figure 11). Le disome ainsi positionné est alors reconnu par l'E3 ubiquitine ligase Hel2 (ZNF598 chez les mammifères) qui, avec la protéine associée au ribosome Asc1 (RACK1 chez les mammifères), permet une poly-ubiquitination de type K63 de la protéine ribosomale uS10 au niveau des lysines en position K6 et K8. Il a été montré que ces modifications de uS10 jouent un rôle majeur dans le processus d'élimination du peptide tronqué (Matsuo *et al.*, 2017 ; Garzia *et al.*, 2017 ; Juszkiewicz and Hegde, 2017 ; Sundaramoorthy *et al.*, 2017 ; Saito *et al.*, 2015). La poly-ubiquitination K63 de uS10 est d'ailleurs essentielle au recrutement du complexe du RQT (**R**ibosome **Q**uality control **T**rigger) composé des protéines Rqt3 (ou Cue3), Rqt4 et de l'hélicase Slh1. Le rôle de ce complexe est encore mal compris, mais il semblerait qu'il puisse jouer un rôle important dans la dissociation des ribosomes

bloqués et dans la dégradation du peptide dépendante du RQC (**R**ibosome **Q**uality **C**ontrol) (Matsuo *et al.*, 2017).

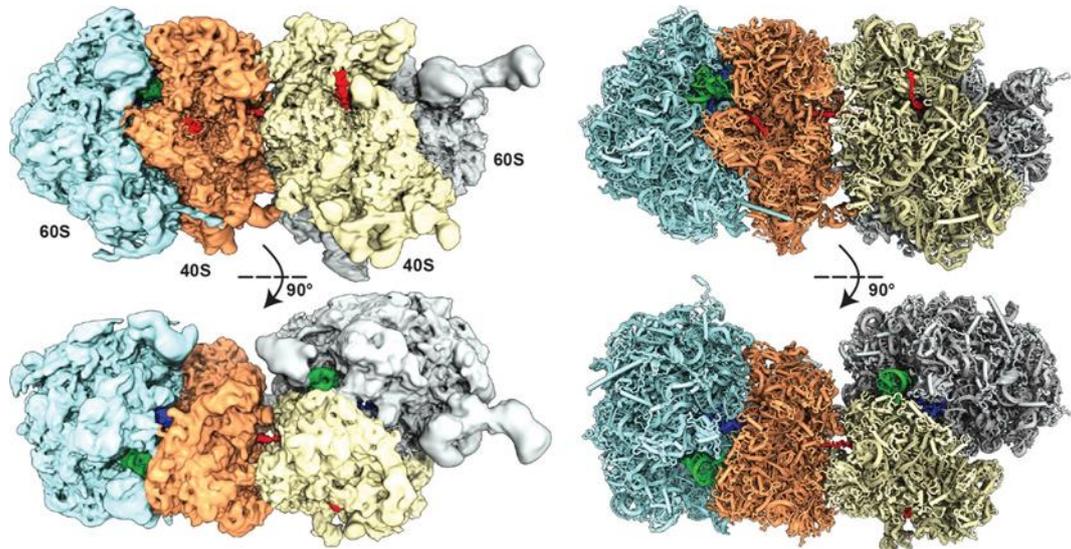


Figure 11 : Structure de disome en collision sur un ARN aberrant par Cryo-EM
(D'après Ikeuchi *et al.*, 2019).

L'ARN messager en cours de traduction est coloré en rouge, l'ARNt-désacétylé en vert et l'ARNt-peptidyl en bleu. Le ribosome leader est le ribosome bloqué au niveau de l'anomalie portée par l'ARN. Le ribosome en collision est positionné sur l'ARN en 5' de ce dernier.

Le peptide tronqué associé à la particule ribosomale 80S ne peut être éliminé en l'état, il faut au préalable que le ribosome bloqué soit dissocié et recyclé. De manière générale, la dissociation des sous-unités des ribosomes bloqués s'effectue *via* le recrutement dans le site A libre du 80S du facteur Dom34 (Pelota chez les mammifères) en complexe avec le facteur Hbs1 (Tsuboi *et al.*, 2012 ; Saito *et al.*, 2013). Alors que Dom34 n'est pas une protéine essentielle chez *S. cerevisiae*, l'absence de ce facteur est embryo-létal chez les mammifères. De la même manière, le fait que les mutations affectant Hbs1 impactent la viabilité des globules rouges chez les mammifères souligne l'importance de ce facteur qui est conservé chez tous les eucaryotes. (Tsuboi *et al.*, 2012 ; Adham *et al.*, 2003 ; Menzel *et al.*, 2007 ; Atkinson *et al.*, 2008). Structurellement, Dom34 est une protéine très proche du facteur de terminaison de la traduction eRF1 (Lee *et al.*, 2007 ; Graille *et al.*, 2008). Les domaines C-terminaux et centraux de ces deux protéines possèdent des similarités de conformations et de fonctions. Cependant, la différence majeure entre ces deux facteurs provient du domaine N-terminal de Dom34. Celui-ci ne possède ni de motif NIKS ni de motif GGQ. Il n'est donc pas capable de catalyser la libération de peptide lors du recyclage des ribosomes (*Introduction 1.2.4*) (Chavatte *et al.*, 2002 ; Frolova *et al.*, 2002). La GTPase Hbs1, quant à elle, possède une structure analogue à eRF3 et, en tant que

co-facteur de Dom34, joue deux rôles principaux dans le recyclage des ribosomes. Elle permet d'une part, l'accommodation de Dom34 dans la sous-unité 60S, et d'autre part, assure la spécificité du ciblage des ribosomes bloqués par Dom34:Hbs1 (Pisareva *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2007 ; Hilal *et al.*, 2016). Il est intéressant de noter que, en plus de son implication dans la dissociation des ribosomes bloqués en cours d'élongation, le complexe Dom34:Hbs1 joue aussi un rôle dans le contrôle qualité de l'ARN ribosomique 18S (van den Elzen *et al.*, 2010). L'ensemble des fonctions assurées par Dom34 :Hbs1 fait donc de ce complexe un acteur majeur dans la surveillance de la machinerie traductionnelle lors de la réponse et l'adaptation des cellules aux stress.

Des études *in vitro* suggèrent que Dom34 et Hbs1 peuvent former un complexe ternaire Dom34:Hbs1:GTP de manière libre dans le cytoplasme (Graille *et al.*, 2008 ; van den Elzen *et al.*, 2010). L'association de ce dernier avec les ribosomes bloqués ne peut intervenir que lorsque ceux-ci sont en état de post-translocation de la traduction. La reconnaissance des ribosomes immobilisés par le complexe Dom34:Hbs1 est indépendante de la séquence du codon porté par l'ARN et nécessite la présence d'un site A libre dans le ribosome (Shoemaker *et al.*, 2010). L'extrémité N-terminale de Dom34 est capable de s'insérer, par l'intermédiaire du site A, à proximité du site de décodage de la sous-unité 40S du ribosome bloqué. L'accommodation de Dom34 à l'intérieur du site A s'effectue alors *via* l'hydrolyse d'une molécule de GTP par le facteur Hbs1 (Figure 12) (Pisarev *et al.*, 2010, Shoemaker *et al.*, 2010 ; Pisareva *et al.*, 2011 ; Young *et al.*, 2015). Hbs1 est alors recyclée tandis que Dom34 est maintenue dans le site A du ribosome. Le facteur général de terminaison de la traduction Rli1, de par sa structure et son activité ATPase, intervient alors pour dissocier les deux sous-unités du ribosome bloqué.

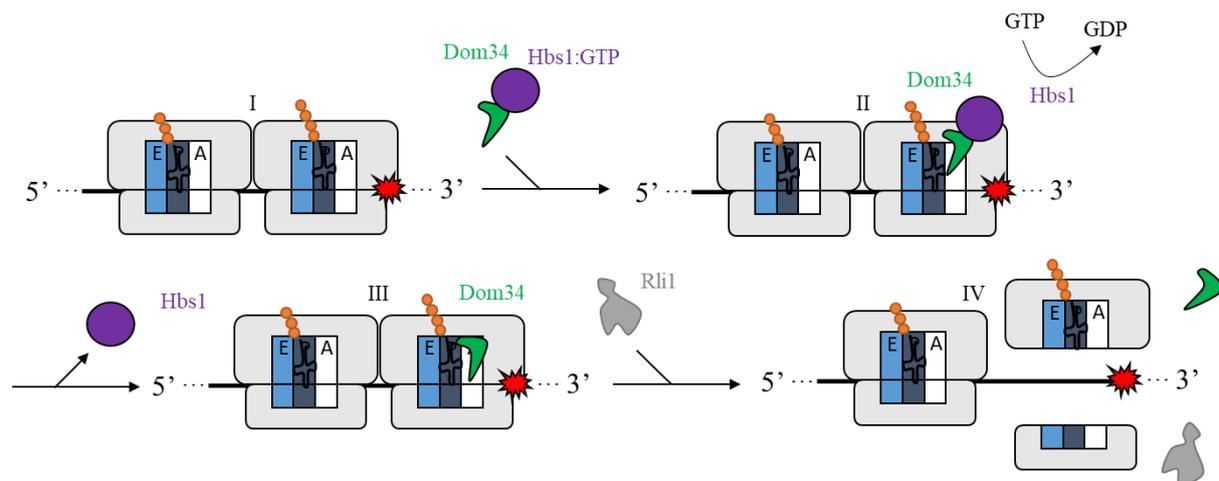


Figure 12 : Recyclage des ribosomes bloqués par le complexe Dom34:Hbs1.

(I) Le site A libre des ribosomes bloqués au cours de la traduction mène au (II) recrutement du complexe Dom34:Hbs1:GTP dans leur site A. Suite à l'hydrolyse du GTP par Hbs1, cette dernière est relarguée et (III) Dom34 s'accommode au site A. (IV) Rli1 permet alors la dissociation du ribosome mais la sous-unité 60S du ribosome reste associée au peptide naissant.

Néanmoins, contrairement à la dissociation classique d'un ribosome, le recyclage des ribosomes bloqués ne permet pas la libération du peptide de la sous-unité 60S du ribosome. En effet, comme indiqué précédemment, Dom34 ne possède pas le motif GGQ capable d'activer le PTC. Le maintien de l'association entre la sous-unité 60S et le peptide naissant représente d'ailleurs l'élément central qui permet d'empêcher l'agrégation toxique de ces derniers (Figure 12-IV) (Shoemaker *et al.*, 2010 ; Shoemaker and Green, 2011).

2.2.2.2.5 Elimination des peptides tronqués

L'élimination des peptides tronqués produits lors des arrêts des ribosomes au cours de la traduction fait généralement intervenir le complexe RQC. Ce dernier est composé de l'E3 ubiquitine ligase Ltn1, de l'ATPase Cdc48 et des protéines Rqc1 et Rqc2 (respectivement les protéines Listerine, p97, TCF25 et NEMF chez les mammifères) (Shao *et al.*, 2013 ; Shao and Hegde, 2014). Lorsque les sous-unités du ribosome sont dissociées, Rqc2 s'associe à la sous-unité 60S après avoir détecté la présence anormale d'un ARNt-peptidyl dans le site P (Figure 11) (Lyumkis *et al.*, 2014 ; Shao *et al.*, 2015). Le recrutement de Rqc2 assure une double fonction puisqu'il permet d'une part d'empêcher la réassociation des sous-unités 60S/40S, et d'autre part de recruter Ltn1 puis Rqc1 (Bengtson and Joazeiro 2010 ; Brandman *et al.*, 2012 ; Defenouillère *et al.*, 2013). En même temps, Rqc2 génère un allongement du peptide naissant *via* un mécanisme de traduction indépendant de la petite sous-unité du ribosome. Ce

phénomène, aussi appelé le CAT-Tailing, consiste en l'ajout de thréonines et d'alanines à l'extrémité C-terminale du peptide encore associé au 60S. Il permet la sortie de résidus lysines susceptibles d'être enfouies dans le tunnel de sortie du peptide de la grande sous-unité ribosomale (Kostova *et al.*, 2017). Ainsi, l'ubiquitine ligase Ltn1, positionnée à proximité du peptide naissant, est alors à même d'ubiquitiner celui-ci afin de favoriser sa dégradation par le protéasome. Étonnamment, le système de CAT-Tail n'est pas essentiel au RQC puisque des mutants de Rqc2 déficients en CAT-Tailing n'affectent pas pour autant l'élimination du peptide tronqué dépendante de Ltn1 (Figure 13) (Shen *et al.*, 2015). Cependant l'accumulation de CAT-tail dans le cytoplasme semble jouer un rôle déterminant dans le déclenchement de certaines réponses cellulaires telles que la réponse au stress impliquant le facteur de transcription Hsf1 (Brandman *et al.*, 2012).

La dernière étape du RQC consiste à extraire le peptide du site P de la sous-unité 60S. Pour ce faire, l'hydrolyse de la liaison entre l'ARNt et le polypeptide pourrait être catalysée par le recrutement de la protéine Vsm1 dans le site A de la sous-unité 60S (Figure 13). Cette dernière possède, tout comme eRF1, une structure qui peut s'apparenter à un ARN de transfert. De plus, Vsm1 possède un domaine GGQ dégénéré (GSQ) qui est à même d'activer le PTC et d'hydrolyser de l'ARNt-peptidyl (Zurita Rendon *et al.*, 2018 ; Su *et al.*, 2019). S'ensuit alors l'extraction de peptide hors du 60S par Cdc48 associé à ses co-facteurs Npl4 et Ufd1. Le peptide se retrouve ainsi dans le cytoplasme où il peut être dégradé par le protéasome (Brandman *et al.*, 2012 ; Defenouillère *et al.*, 2013 ; Verma *et al.*, 2013).

Il faut cependant noter qu'il existe une autre voie d'ubiquitination des peptides naissants qui est indépendante de l'activité ubiquitine de Ltn1. Celle-ci fait intervenir l'E3 ubiquitine ligase Not4 associée à ses co-facteurs Ubc4 et Ubc5 pour permettre l'adressage des protéines tronquées au protéasome. Il a été montré que, contrairement au RQC qui interagit principalement avec une sous-unité 60S isolée, Not4 est associée aux polysomes bloqués sur les messagers aberrants ce qui suggère que son action pourrait être co-translationnelle (Dimitrova *et al.*, 2009 ; Panasenko, 2014). Chez la levure, les effets des mutations s'additionnent dans les doubles mutants de *LTN1* et *NOT4* ce qui suggère qu'il existe une redondance entre ces deux voies d'élimination du peptide. Il a d'ailleurs été montré que dans le cadre de la dégradation des peptides tronqués, Not4 cible spécifiquement les arrêts des ribosomes dépendants des séquences polybasiques (Lysines/Arginines). Au contraire, Ltn1 semble à même d'assurer l'ubiquitination de l'ensemble des peptides pouvant être produits lors de la traduction de messagers aberrants (Dimitrova *et al.*, 2009 ; Bengtson and Joazeiro, 2010 ; Matsuda *et al.*, 2014).

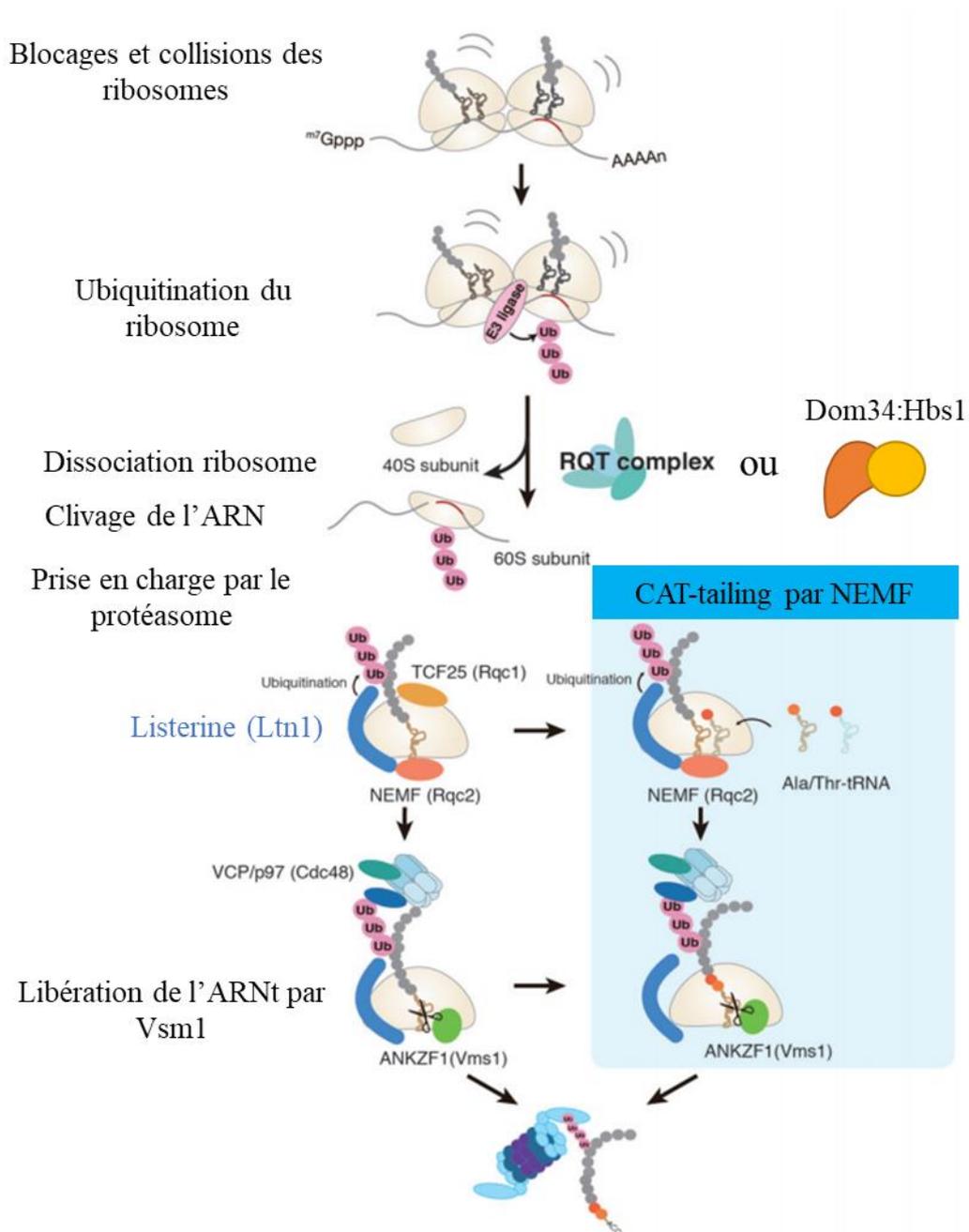


Figure 13 : Elimination du peptide tronqué par le RQC après recyclage des ribosomes bloqués. (Adaptée de Inada, 2020)

Après la dissociation des ribosomes par Dom34:Hbs1 ou le RQT, les peptides naissants sont pris en charge par Rqc2 puis Ltn1 afin d'assurer la dégradation de ces derniers par le protéasome.

2.2.2.3 *Elimination des ARN par le Non-Stop Decay*

Le NSD est la voie de surveillance chargée d'éliminer les messagers dépourvus de STOP fonctionnels dans leur séquence codante. De par cette absence, les ARN Non-STOP accumulent des ribosomes bloqués sur la queue poly(A), à l'extrémité 3' de l'ARN. Selon la littérature, l'élimination d'un ARN aberrant par le NSD permet le recrutement de la machinerie générale de dégradation 3'-5' des ARN dans le cytoplasme. Chez la levure, cette dernière fait intervenir le complexe SKI ainsi que l'exosome cytoplasmique (Exo10) composé entre autres de sa sous-unité catalytique Rrp44 (*Introduction 1.3.2* – Figures 5 et 6) (Frischmeyer *et al.*, 2002 ; van Hoof *et al.*, 2002). Cependant, contrairement à la dégradation des ARN canoniques dans le cytoplasme, l'élimination des messagers Non-STOP ne nécessite pas leur déadénylation préalable par le complexe Ccr4-Not (*Introduction 1.3.1*) (van Hoof *et al.*, 2002). Il est proposé que Ski7 joue un rôle dans le recrutement de l'exosome à proximité des ribosomes bloqués sur la queue poly(A). Cette hypothèse s'appuie sur la nature du domaine C-terminal de Ski7 qui appartient à la famille des GTPases associées aux ribosomes au même titre que eRF3 ou Hbs1. Ce domaine, lorsqu'il est muté, empêche notamment le recrutement de l'exosome sur les ARN Non-STOP (van Hoof *et al.*, 2002). Le modèle proposé est donc, chez la levure, que Ski7 interagit avec le site A des ribosomes bloqués sur la queue poly(A) des messagers Non-STOP afin de préparer leur dégradation en recrutant l'exosome à l'extrémité 3' de ces derniers. Pour rappel, la sous-unité catalytique de l'exosome possède à la fois une activité exoribonucléolytique essentielle à la dégradation 3'-5' et une activité endoribonucléolytique mal caractérisée (Lebreton *et al.*, 2008 ; Schaeffer *et al.*, 2009). Des études ont montré que le domaine endonucléase de Rrp44 jouait un rôle important dans le cadre du NSD puisqu'il était à même de compenser l'activité exoribonucléolytique de l'exosome. Chez la levure, l'activité endonucléase de Rrp44 n'est activée que dans des conditions non-physiologiques. Cela suggère donc que cette activité d'apparence mineure de l'exosome pourrait permettre d'assurer l'élimination des messagers aberrants Non-STOP dans des conditions environnementales non-optimales (Schaeffer *et al.*, 2011).

Des études récentes menées par le laboratoire de Rachel Green suggèrent que la dégradation 3'-5' du NSD ne serait pas le seul mécanisme de dégradation des ARN Non-STOP. Il existerait ainsi une coopération entre la voie du NSD et du NGD qui assurerait une redondance fonctionnelle avec le NSD en cas de dysfonctionnement de l'exosome cytoplasmique. Ce système de sauvetage chargé de l'élimination des ARN Non-STOP fait intervenir des clivages endonucléolytiques caractéristiques du NGD en amont des ribosomes

bloqués sur la queue poly(A) du messenger (Guydosh and Green, 2017). La multiplicité et la complémentarité entre les différentes voies de surveillance cytoplasmique soulignent ainsi qu'il est essentiel pour la cellule d'accomplir efficacement l'élimination des messagers aberrants.

2.2.2.4 Elimination des ARN par le No-Go Decay

Le No-Go Decay intervient dès lors que des ribosomes se trouvent bloqués en cours d'élongation sur la séquence codante d'un messenger. Ce dernier fait appel à des mécanismes conservés chez l'ensemble des eucaryotes et son étude a été sujette à de nombreuses publications scientifiques durant ces dernières années. Cette section propose ainsi de passer en revue les différents éléments connus dans la littérature ainsi que les zones d'ombres qui persistent sur le recrutement du NGD et son action menant à l'élimination des ARNm aberrants.

2.2.2.4.1 Clivage endonucléolytique et importance des ribosomes

Découvert en 2006, le NGD est alors décrit comme un processus capable de cliver en deux fragments (fragments 5'-NGD et 3'-NGD) des ARN aberrants. Il a ainsi été proposé qu'une activité endoribonucléolytique interviendrait dans cette voie de surveillance pour participer à l'élimination de l'ARN (Doma and Parker, 2006). Lorsqu'un ARN est ciblé par le NGD, les clivages qui en résultent sont répétés de manière séquentielle tout au long de l'ARN messenger (Tsuboi *et al.*, 2012). Il a été montré que l'espacement entre deux séquences de clivage est d'environ 30 nucléotides, soit la taille que couvre un ribosome sur l'ARN. Il est donc admis que la position des sites de clivage est déterminée par le positionnement des ribosomes bloqués sur le messenger (Tsuboi *et al.*, 2012 ; Guydosh and Green, 2017 ; Simms *et al.*, 2017). Cependant, ces clivages n'ont pas été cartographiés précisément, et l'existence d'une endonucléase n'a jamais pu être démontrée formellement puisqu'aucune correspondance entre les fragments 5'-NGD et 3'-NGD n'a pu être détectée lors de différentes approches sur des ARN spécifiques (Doma and Parker, 2006 ; Pasos *et al.*, 2009 ; Tsuboi *et al.*, 2012) ou lors d'analyses globales (Guydosh and Green, 2014 ; Guydosh and Green, 2017 ; Simms *et al.*, 2017). Récemment, un crible génétique utilisant des messagers aberrants contenant des codons rares ou des séquences poly-lysines suggère que l'activité endoribonucléolytique du NGD est portée par la protéine Cue2 (D'Orazio *et al.*, 2019 ; Glover *et al.*, 2020). Cette dernière possède plusieurs domaines de liaison aux ubiquitines en plus d'un domaine endonucléase SMR (Small MutS-Related) conservé chez les eucaryotes au niveau de son extrémité C-terminale (D'Orazio *et al.*, 2019 ; Glover *et al.*, 2020). L'interaction directe de Cue2 avec le messenger aberrant n'a

pas été observée si bien que son rôle précis dans le clivage NGD, bien que très probable par différents aspects, reste encore à démontrer.

2.2.2.4.2 Ubiquitination du ribosome et recrutement du NGD

Les collisions des ribosomes représentent le signal à l'origine du recrutement de plusieurs systèmes de surveillance (Simms *et al.*, 2017). Dès 2017, il a été montré que l'ubiquitine ligase Hel2 agit comme un senseur des collisions puisqu'elle permet de recruter le RQC par l'intermédiaire de la poly-ubiquitination K63 des lysines uS10 (Saito *et al.*, 2015 ; Matsuo *et al.*, 2017). Par la suite, il a été suggéré que l'ubiquitination de uS10 par Hel2 pouvait aussi jouer un rôle déterminant dans l'initiation du NGD. En effet, des mutations de *HEL2* ou des K63 ubiquitine ligases chez la levure provoquent une inhibition totale de la production des fragments NGD (Figure 14- II) (Ikeuchi *et al.*, 2019). Dans cette situation, Hel2 possède donc un double rôle puisque son action permet de recruter de manière couplée le NGD et le RQC afin d'éliminer de manière concomitante les ARN et les protéines naissantes. Le couplage de ces deux systèmes dans le cytoplasme est ainsi appelé NGD^{RQC+} et il génère des clivages qui semblent être positionnés au niveau du disome bloqué (Figure 14-II) (Ikeuchi *et al.*, 2019). Il est suggéré que ces derniers soient générés à l'issue de la dissociation du disome par le RQT puisqu'une délétion de Slh1 semble inhiber la dégradation NGD^{RQC+}. Cependant, le positionnement de ces clivages reste mal cartographié et leur origine sera discutée plus en détail à la lumière des résultats qui seront présentés dans le développement du manuscrit.

Lorsque le NGD^{RQC+} ne peut être engagé par la cellule, un second système qualifié de NGD^{RQC-} semble être activé pour éliminer l'ARN aberrant. Ce dernier n'est pas associé au RQC car son déclenchement ne dépend pas de l'ubiquitination de la protéine uS10. Du point de vue du devenir de l'ARN, ces deux événements de dégradation se différencient par le positionnement des clivages qu'elles provoquent sur l'ARN. Alors que ces derniers interviennent au niveau des deux premiers ribosomes bloqués dans le cadre du NGD^{RQC+}, les clivages NGD^{RQC-} semblent quant à eux se produire à la lisière des ribosomes qui sont stationnés en amont du disome (Figure 14). La première étape menant au recrutement du NGD^{RQC-} serait initiée par la mono-ubiquitination de plusieurs résidus de lysines de la protéine ribosomale eS7 par Not4 (Figure 14-I). Hel2 assurerait ensuite une poly-ubiquitination K63 des chaînes d'ubiquitines alors présentes sur le ribosome. Il en résulterait le recrutement d'une activité endoribonucléase à la lisière des ribosomes bloqués pour permettre la dégradation de l'ARN aberrant (Ikeuchi *et al.*, 2019).

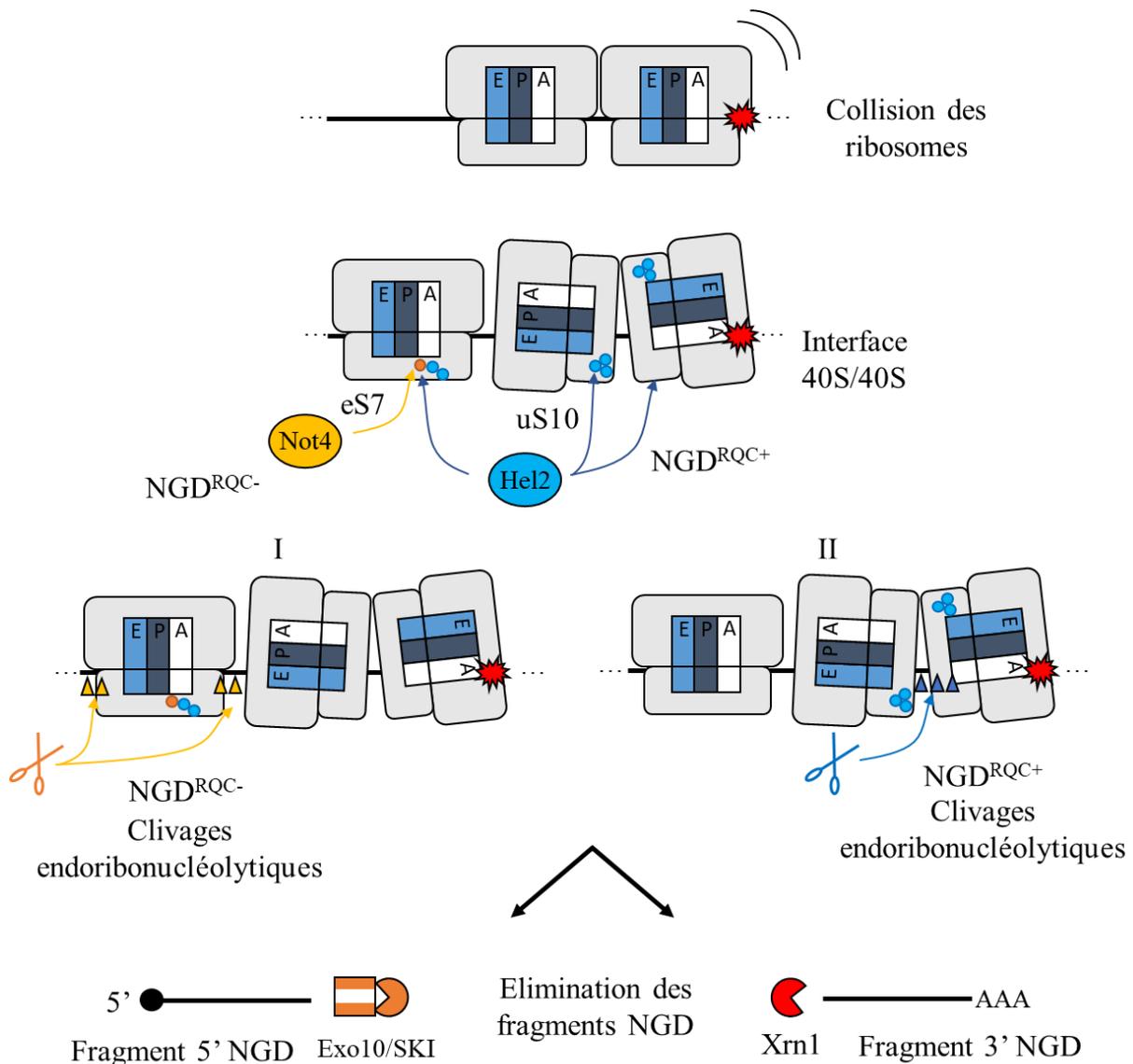


Figure 14 : Modèle de recrutement du NGD dépendant de la polyubiquitination de protéines ribosomales uS10 ou eS7 par Hel2 et d'élimination des fragments NGD. (Selon Ikeuchi *et al.*, 2019).

Les positions des clivages (I) *NGD^{RQC-}* intervenant à la suite de l'ubiquitination *Not4*-dépendante de *eS7* sont représentées par des triangles jaunes. (II) Les clivages *NGD^{RQC+}* intervenant après l'ubiquitination de *uS10* par *Hel2* sont quant à eux symbolisés par des triangles bleus. Le clivage endonucléolytique est représenté par une paire de ciseaux.

2.2.2.4.3 *Elimination des fragments NGD dans le cytoplasme.*

Le clivage endonucléolytique des messagers aberrants par le NGD produit deux fragments d'ARN appelés respectivement fragment 5'-NGD et 3'-NGD (Doma and Parker, 2006). On constate que le NGD produit une grande quantité de fragments ARN dont l'origine résulte aussi du déclenchement d'une succession de « cycles » de NGD sur les fragments 5'-NGD nouvellement produits (Guydosh and Green, 2017). Habituellement protégés par leur séquence poly(A) et leurs protéines associées, les ARN une fois tronqués deviennent, en ce qui concerne les fragments 5'-NGD du fait de leur nouvelle extrémités 3', particulièrement sensibles aux dégradations exoribonucléolytiques 3'-5'. Ce phénomène est d'ailleurs accentué par l'activité du complexe Dom34:Hbs1 qui permet le recyclage des ribosomes bloqués en 3' de l'ARN facilitant ainsi sa reconnaissance et son élimination par l'exosome cytoplasmique (Tsuboi *et al.*, 2012). A l'inverse, les fragments 3'-NGD ont, quant à eux, perdu au niveau de leur nouvelle extrémité 5' la structure de la coiffe et ses facteurs associés, ce qui les rend particulièrement sensibles aux attaques 5'-3' exoribonucléolytiques faisant intervenir Xrn1 dans le cytoplasme (Figure 14) (Doma and Parker, 2006).

3 Contexte et objectifs de la thèse

Depuis la découverte du No-Go Decay (NGD) en 2006, de nombreux groupes se sont attelés à comprendre les mécanismes impliqués dans la gestion d'un ARN aberrant *via* cette voie. Cependant, au début de ma thèse en 2017, l'identité de l'endonucléase impliquée dans le NGD et le positionnement précis des clivages générés par cette dernière n'étaient toujours pas caractérisées.

Les informations dont nous disposions faisaient alors référence à l'existence possible d'un clivage endoribonucléolytique intervenant à la lisière de ribosomes bloqués au cours de la traduction (Doma and Parker, 2006). Il était décrit que ces ribosomes pouvaient ensuite être dissociés par le complexe Dom34:Hbs1, facilitant l'élimination du peptide tronqué par l'intermédiaire du RQC (Pasos *et al.*, 2009 ; Chen *et al.*, 2010 ; Tsuboi *et al.*, 2012 ; Brandman *et al.*, 2012 ; Defenouillère *et al.*, 2013). Par la suite, il a été montré que le NGD jouait un rôle lors de l'élimination des ARN oxydés ce qui a permis de mettre en évidence son importance dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Simms *et al.*, 2014). De la même manière, une étude menée au sein de notre équipe avait permis de proposer que le NGD participait à la dégradation de certains ARNm dont la séquence codante formait des interactions ARN-ARN intermoléculaires (Sinturel *et al.*, 2015).

Afin de mieux comprendre les mécanismes du NGD, nous avons, dans un premier temps, cherché à identifier, au nucléotide près, l'ensemble des fragments d'ARN produits par cette voie de surveillance grâce à l'utilisation d'une construction plasmidique capable d'exprimer, *in vivo*, un ARN tronqué ciblé par le NGD. En parallèle à cette approche, et du fait de l'importance des ribosomes dans la mise en place de cette voie de surveillance, nous avons décidé de caractériser avec précision le positionnement de ces ribosomes sur les différents fragments d'ARN que nous aurons eus à identifier. Forts de ces informations, nous avons donc pour objectif d'établir une cartographie précise des événements de dégradation de l'ARN qui interviennent lors du NGD, et d'observer pour la première fois l'existence de deux fragments ARN potentiellement issus d'un clivage endoribonucléolytique précis.

De la même manière, nous avons utilisé cette construction pour identifier de nouveaux facteurs cytoplasmiques qui seraient nécessaires au bon fonctionnement du NGD chez *Saccharomyces cerevisiae*.

La dernière étape de notre démarche a aussi consisté à tester la robustesse de notre modèle sur une autre cible ARN du NGD, comme par exemple, un messenger contenant des codons rares.

Les résultats issus de notre approche ont fait l'objet d'un article publié en janvier 2020 dans *Nature Communications* (Navickas *et al.*, 2020). Récemment, de nombreux articles démontrant l'importance de Hel2 et identifiant Cue2 comme l'endoribonucléase du NGD ont été publiés en parallèle de nos travaux (Ikeuchi *et al.*, 2019 ; D'Orazio *et al.*, 2019 ; Glover *et al.*, 2020). Ces nouveaux éléments, qui sont apparus au cours de notre approche, seront discutés à l'issue de la présentation des résultats.

RESULTATS

1 Stratégie d'étude du No-Go Decay

Le No-Go Decay (NGD) a été défini comme une voie de surveillance au travers de l'étude de nombreux transcrits dont la plupart ne sont pas naturels. Selon la littérature, l'ARN en question peut contenir un élément favorisant le blocage de l'élongation de la traduction comme une structure tige-boucle ou bien des éléments qui empêchent le décodage optimal de la séquence codante, comme la présence d'une série de codons rares ou bien encore une séquence codante tronquée (Doma and Parker, 2006 ; Tsuboi *et al.*, 2012 ; Guydosh and Green, 2014 ; Guydosh and Green, 2017 ; Ikeuchi *et al.*, 2019). Au-delà de l'étude de ces ARN outils, il existe des ARN endogènes, notamment des ARN endommagés qui sont reconnus et ciblés par le NGD (Simms *et al.*, 2014). Cependant, l'apparition des aberrations, et en particulier l'altération des bases, est un phénomène aléatoire dans une séquence d'ARN et donc difficile à étudier au sein d'une séquence désignée au préalable.

Les précédentes études ont permis d'identifier des facteurs impliqués dans cette voie de surveillance, en particulier ceux nécessaires à la gestion des peptides naissants. Néanmoins, les outils ARN utilisés jusqu'à présent n'ont pas permis de déterminer avec précision la nature des clivages. Nous avons cependant décidé de ne pas déroger à cette règle en étudiant également un ARN artificiel cible du NGD, mais de la manière la plus poussée qui soit, avec des approches certes classiques, mais qui pourraient nous procurer de nouvelles informations. Nous avons donc choisi une construction plasmidique qui permette de produire un ARNm contenant au sein de sa séquence codante un ribozyme de type « *hammerhead* » (construction ARN1-FL) (Meaux and van Hoof, 2006) (Figure 15A). Ce dernier produit, par un clivage endonucléolytique autocatalytique, un ARN messenger tronqué en un site défini (ARN1) (Figure 15B). Cet ARN traduit nous assure, de par sa troncation, que le premier ribosome atteignant son extrémité 3' lors de l'élongation n'aura en son site A aucun codon à décoder.

Le choix de cet outil s'appuie sur deux hypothèses. D'une part, nous avons estimé que le blocage des ribosomes s'effectuerait selon un positionnement homogène sur l'ensemble de la population d'ARN1. En effet, puisque ce dernier est tronqué en une position unique, il ne devrait exister qu'une seule position possible de blocage pour le premier ribosome atteignant l'extrémité 3' de l'ARN. La position des ribosomes en cours de collision étant déterminée par l'arrêt du premier ribosome, ces derniers devraient à leur tour être bloqués en une position qui serait commune à l'ensemble des ARN tronqués (Figure 15C).

D'autre part, comme nous savions que la localisation des clivages produits par le NGD était dépendante de la position des ribosomes bloqués, nous avons présumé, selon l'hypothèse

énoncée précédemment, que les clivages du NGD devraient également intervenir à des positions très localisées, voire uniques sur l'ARN1.

Nous avons analysé, par northern blot, l'ensemble des ARN générés lors de la dégradation de l'ARN1 par le NGD. Pour ce faire, l'ARN1 porte à son extrémité 3' une séquence comprenant neuf nucléotides résiduels de la séquence du ribozyme après son autoclivage. Ces derniers nous ont ainsi permis de cibler de manière spécifique les intermédiaires de dégradation provenant de l'ARN1 avec des oligonucléotides s'hybridant au niveau de leur extrémité 3'. De ce fait, nous avons pu nous focaliser sur les événements de clivage qui ne peuvent avoir eu lieu qu'en 5' des ARN associés à la sonde radioactive (Figure 15C).

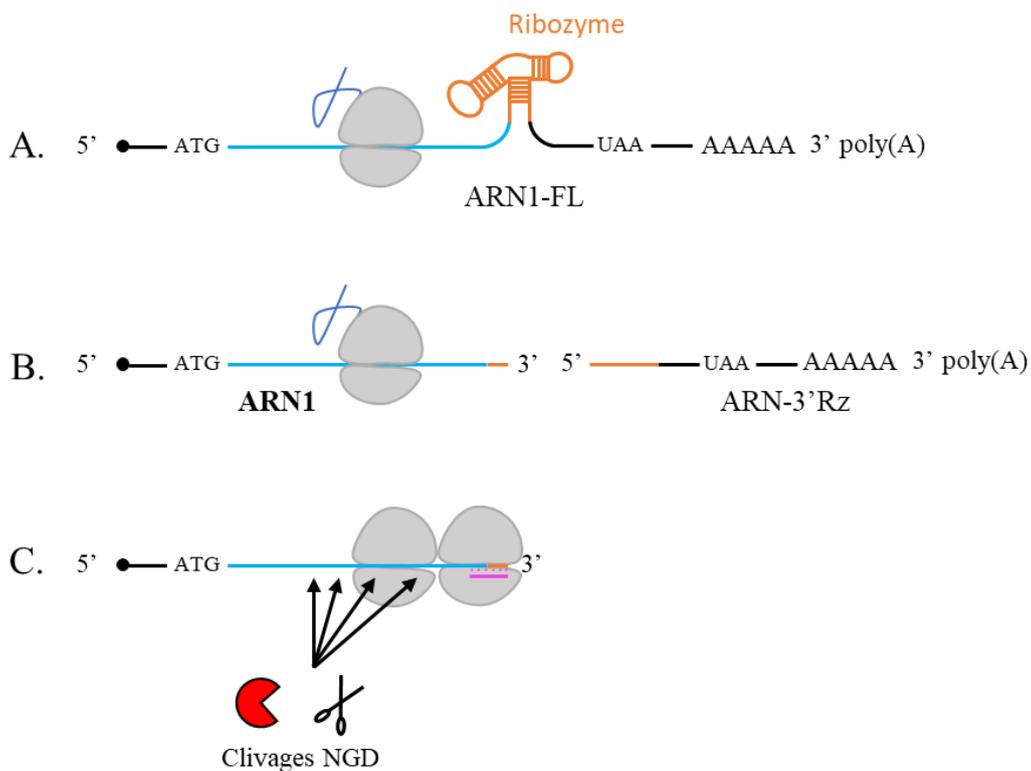


Figure 15 : Schéma de la construction ribozyme utilisée pour l'étude du No-Go Decay chez la levure.

(A) Sous le contrôle du promoteur ADH1, un ARNm chimérique ARN1-FL est produit. Cet ARNm possède la séquence codante du gène URA3 (Bleu), un ribozyme dans l'ORF de URA3 (Orange) ainsi que des séquences 5' et 3' UTR. (B) Deux fragments d'ARN sont produits par l'activation du ribozyme dont la séquence se trouve partagée entre le fragment 5' (ARN1) et 3' (ARN-3'-Rz). (C) Le site de fixation de la sonde (3'-Rz) utilisée dans la majorité des approches de northern blot et de transcriptase inverse spécifique du 3' de l'ARN1 est schématisé en rose. Le nom des différents fragments produits par ce processus est indiqué aux abords de chacun d'entre d'eux.

2 Identification et caractérisation des clivages sur un ARN tronqué

2.1 *Adom34* : un contexte génétique intéressant pour l'étude du NGD

Afin de pouvoir utiliser la construction ribozyme, nous avons dû, dans un premier temps, nous assurer qu'elle exprimait correctement l'ARN1 et que des fragments issus de sa dégradation par le NGD étaient observables par northern blot.

Il est proposé dans la littérature que l'élimination d'un ARN tronqué est fortement accélérée dans le cytoplasme par l'action du complexe Dom34:Hbs1 (Tsuboi *et al.*, 2012). En effet, ce dernier assure le recyclage des ribosomes bloqués à l'extrémité 3' de l'ARN, ce qui favorise sa dégradation par des attaques d'exoribonucléases 3'-5' (Tsuboi *et al.*, 2012).

Nous avons donc dans un premier temps analysé l'impact de la mutation *Adom34* sur le devenir de l'ARN1 dans le cytoplasme. Alors qu'aucun signal n'est détecté pour la souche sauvage, nous avons constaté qu'une échelle de petits fragments d'ARN provenant de la dégradation de l'ARN1 par le NGD apparaissait dès lors que *DOM34* était muté (Figures 16A et 16B). Aucune variation de ce profil de dégradation n'est par ailleurs observée entre un mutant de l'exosome (*Aski2*) et sa version sauvage, tous deux bien sûr dans un contexte *Adom34*. En accord avec la littérature, ces résultats nous permettent de confirmer que la mutation de *DOM34* stabilise les fragments d'ARN1 produits par le NGD en les protégeant des attaques 3'-5' exoribonucléolytiques. Nous avons donc décidé de l'utiliser comme un outil génétique capable de faciliter l'analyse des fragments produits par le NGD lors de son recrutement au niveau de l'ARN1.

2.2 Importance de Xrn1 dans la dégradation des ARN par le NGD

L'ARN1 est localisé dans le cytoplasme lorsqu'il est pris en charge par le NGD. Il est suggéré que cette voie provoque des clivages endoribonucléolytiques responsables de la production de fragments 5'-NGD ou 3'-NGD qui sont ensuite éliminés par les voies générales de dégradation cytoplasmique des ARNm (Doma and Parker, 2006 ; Tsuboi *et al.*, 2012). Nous avons donc analysé le devenir de l'ARN1 à l'aide de mutants des principaux acteurs de la voie de dégradation 5'-3' en utilisant les souches *Δxrn1* et *Δdcp2*. Comme indiqué précédemment, ces mutations se placent dans un contexte *Adom34* afin de visualiser efficacement par northern blot, les fragments produits par le NGD.

Nous observons ainsi qu'il existe, selon le contexte de mutation, des motifs comprenant trois ARN qui semblent se répéter de manière séquentielle le long de l'ARN1 (Figures 16A et

16B). Afin de pouvoir les comparer et dans le but de les étudier, nous avons ensuite déterminé la taille de chacun de ces fragments d'ARN par extension d'amorce. Les motifs précédemment identifiés sont ainsi composés des ARN B1 (47nt), B4 (71nt) et B5 (77nt) dans le mutant $\Delta dom34$ tandis que les ARN B2 (65nt), B3 (68nt) et B4 (71nt) sont présents lorsque $XRN1$ est inactivée (Figure 16C). Remarquablement, le fragment B4 (71nt) est présent dans l'ensemble des mutants testés, ce qui suggère que sa production serait incontournable, ou pour le moins indépendante de l'action d'une exoribonucléase telle que $Xrn1$. Cette dernière sera d'ailleurs détaillée au cours des résultats. De même, nous détectons la présence d'un ARN mineur B1b que nous avons cependant décidé de ne pas analyser en détail du fait de sa faible abondance.

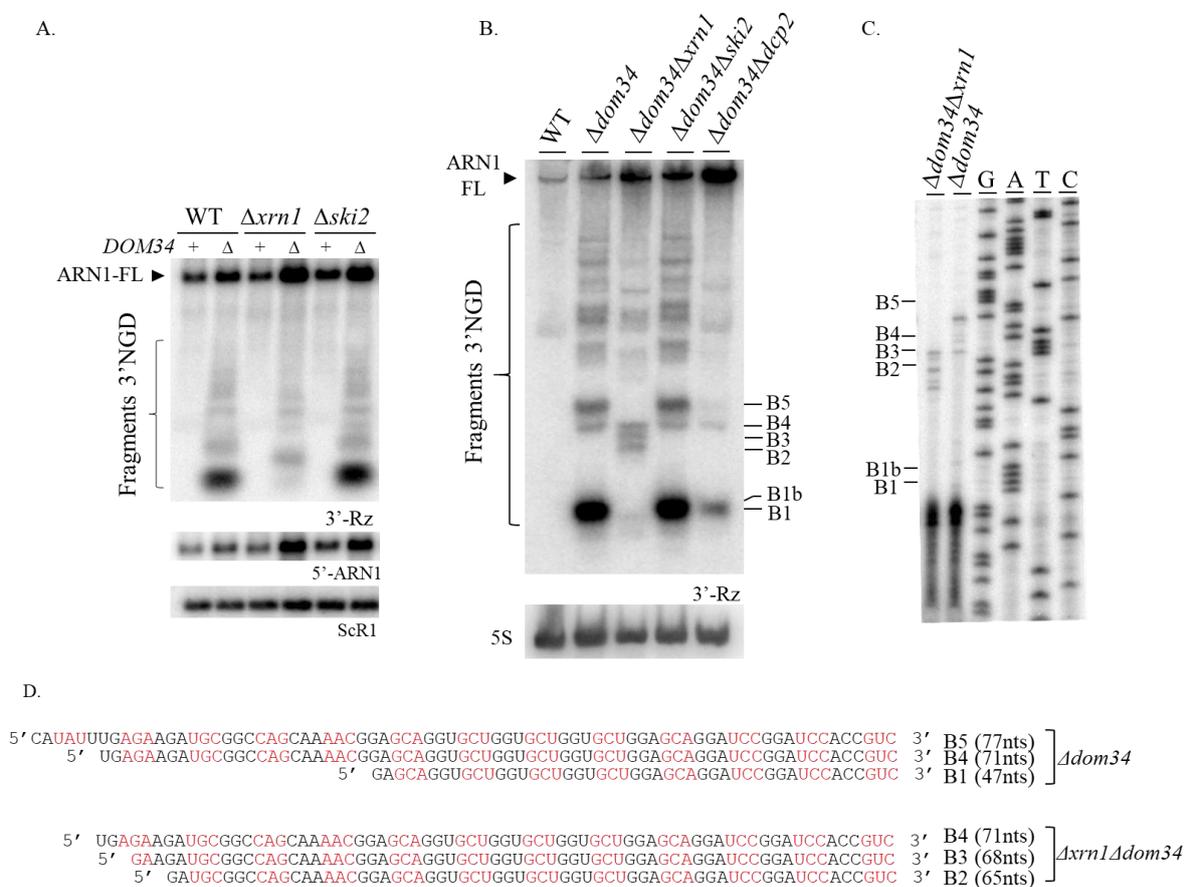


Figure 16 : Analyse de la dégradation des ARN1 par northern blot.

Les ARNm issus de souches sauvages ou mutantes ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1.8% (A) ou d'acrylamide 8% (B) avant d'être transférés sur membrane de nylon. La révélation des ARNm ARN1 et de ses autres formes clivées est effectuée par la sonde 3'-Rz radiomarquée complémentaire de l'extrémité 3' de ARN1 ou 5'-ARN1 complémentaire à l'extrémité 5' de l'ARN1. Les ARN SCR1 et 5S nous servent de témoin de charge. (C) La taille des différents fragments identifiés (B1, B2, B3, B4 et B5) a ensuite été déterminée par extension de l'amorce 3'-Rz. (D) L'ensemble des informations relatives aux fragments d'ARN identifiés est représenté dans un schéma.

Cette partie de l'étude nous a permis de mettre en évidence l'importance de Xrn1 dans l'élimination des ARN aberrants. En effet, nous constatons la disparition des ARN B1 et B5 dans le mutant $\Delta dom34\Delta xrn1$, ce qui révélerait que Xrn1 participe à la production de ces deux fragments d'ARN qui sont, en termes d'abondance, majoritaires dans notre analyse (Figures 16A et 16B). A ce stade de l'étude, nous sommes conscients que nous ne devrions pas être si catégoriques, car il reste toujours la possibilité que l'inactivation de Xrn1, n'empêche pas la production des ARN B1 et B5, mais active une voie inconnue et alternative de dégradation qui pourrait éliminer totalement ces ARN (la disparition d'un ARN étant toujours un compromis entre sa production et sa dégradation). Mais nous faisons le choix de la simplicité dans notre modèle de travail en proposant le rôle direct de Xrn1 dans la production des ARN B1 et B5.

Afin de comprendre comment Xrn1 est amenée à produire les ARN B1 et B5, nous avons décidé d'utiliser un mutant du décoiffage des ARNm ($\Delta dcp2$). Cette mutation nous permet d'inhiber la capacité de Xrn1 à dégrader l'ARN1 pleine longueur par son extrémité 5' (la persistance de la coiffe bloquant les attaques par Xrn1). Nous constatons cependant que les ARN B1 et B5 persistent, bien que leur abondance soit fortement diminuée (Figure 16B). Il semblerait donc que deux populations d'ARN B1 et B5 soient produites par la dégradation de l'ARN1 par Xrn1. La première population, dont l'existence est révélée par la différence de signal entre le mutant $\Delta dom34$ et $\Delta dom34/\Delta dcp2$, serait générée par Xrn1 à la suite du décoiffage de l'ARN1 par Dcp2. La seconde serait, quant à elle, produite par un mécanisme indépendant de la coiffe. A partir des connaissances dont nous disposons sur le NGD, l'hypothèse la plus probable serait que cette dernière résulte de l'action de Xrn1 sur l'ARN1 à la suite de clivages endoribonucléolytiques.

Enfin, nous avons constaté que deux fragments d'ARN, B2 et B3, étaient uniquement produits dans le double mutant $\Delta dom34/\Delta xrn1$ (Figure 16B). Il est donc envisageable qu'une activité de dégradation puisse être masquée par l'activité Xrn1 ou bien qu'une dégradation alternative soit possible lorsque Xrn1 est inactivée. L'identification et la caractérisation de cette dernière feront l'objet d'une étude détaillée dans la suite des résultats (*Résultats 2.4 et 2.5*).

2.3 Association des fragments NGD aux ribosomes

L'analyse précédente nous a permis de redémontrer que l'ARN1 était potentiellement reconnu par le NGD car réduit en petits fragments d'ARN détectables dans un contexte mutant $\Delta xrn1$, et de surcroît, sous forme de clivages répétés de manière séquentielle tout le long de l'ARN. Pour que l'analyse soit complète, les clivages produits par le NGD doivent pouvoir être

corrélés à la présence de ribosomes bloqués à l'extrémité 3' de l'ARN tronqué (Doma and Parker, 2006 ; Tsuboi *et al.*, 2012 ; Simms *et al.*, 2017 ; Ikeuchi *et al.*, 2019). A ce stade, il était donc essentiel de montrer que l'ARN1, et ces fragments ARN, étaient associés à des ribosomes bloqués en cours de traduction. De plus, afin d'affiner la cartographie des clivages du NGD que nous avons initiée, nous avons souhaité déterminer le positionnement exact de chacun de ces ribosomes bloqués.

Notre objectif était de définir la quantité maximale de ribosomes associés à chacun des fragments d'ARN que nous avons identifiés afin d'en déduire le nombre de ribosomes nécessaire à leur production par le NGD. Ainsi, nous avons étudié, par ultracentrifugation sur gradient de saccharose, des extraits cellulaires contenant des ARN encore liés aux ribosomes en cours de traduction (aussi appelés extraits polysomaux) (Figures 17A et 17B). Cette technique permet de séparer, au sein des extraits cellulaires non-dénaturés, les ARN en fonction du nombre de ribosomes qui leurs sont associés. Par conséquent, différents extraits cellulaires issus de levures *Δdom34* ont été séparés puis collectés selon des fractions correspondant à la présence de soit un, deux, trois, quatre ou plus de cinq ribosomes. L'ensemble des ARN contenus dans ces fractions a alors été purifié et analysé par northern blot à l'aide de la sonde 3'-Rz (Figure 17B). L'intensité de chaque signal a ensuite été quantifiée dans le but de déterminer l'enrichissement des différents fragments d'ARN1 (B1, B4 et B5) selon le pourcentage calculé entre la quantité d'un ARN présent dans chacune des fractions ribosomales sur sa quantité dans la totalité des fractions.

Les valeurs d'enrichissement obtenues pour chaque fragment, dans chaque fraction, ont été reportées dans un graphique (Figure 17C). Ce calcul permet d'évaluer la quantité relative d'un ARN donné en fonction de son association avec les ribosomes. Si cette valeur varie effectivement pour un même ARN entre ces différentes fractions, nous avons été très attentifs à la présence d'un ARN donné dans les fractions les plus lourdes, dans le sens que ces fractions lourdes témoignent de la capacité maximale de cet ARN à s'associer avec des ribosomes. Il est capital de rappeler ici que, du fait de l'étude de fragments ARN 3'-NGD (et non 5'-NGD), il est inconcevable que ces fragments d'ARN, une fois produits, soient chargés par de nouveaux ribosomes. Ainsi, la présence significative d'un ARN dans les fractions les plus lourdes correspondrait au nombre maximal de ribosomes au moins présents sur ce dernier au moment de l'activation du NGD. Nous considérerons donc que la présence de ces mêmes ARN dans les fractions les plus légères correspondront à une dissociation spontanée des ribosomes suite au NGD *in vivo* ou ayant eu lieu pendant la production des extraits et la collecte des fractions.

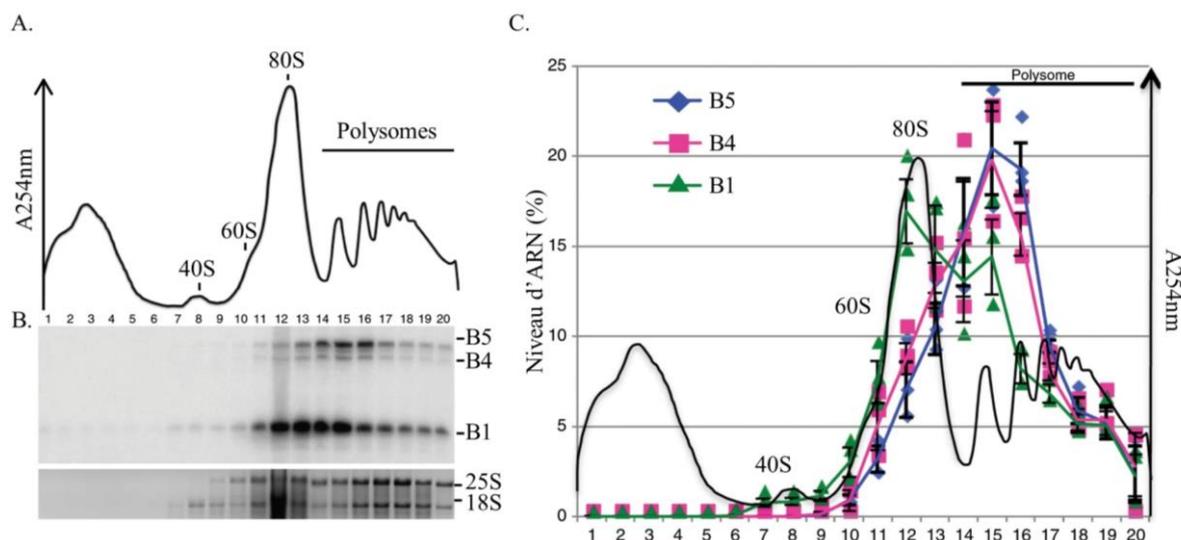


Figure 17 : Analyse de l'association des ARN B1/4/5 aux ribosomes dans un mutant $\Delta dom34$.

(A) Le nombre de ribosomes présents dans les fractions que nous avons séparées est déterminé par l'absorbance de l'ARN ribosomique à 254nm. (B) Les ARN ont ensuite migré sur un gel résolutif de polyacrylamide 8% avant d'être quantifiés. En parallèle, l'analyse des ARN 25S et 18S nous indique la répartition des polysomes dans les différentes fractions collectées (C) Les résultats de la quantification des ARN B1, B4 et B5 selon leur abondance globale ainsi que la correspondance des fractions en nombre de ribosomes ont été reportés dans un graphique.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la quantité maximale de ribosomes que nous pouvons détecter sur les ARN B1, B4 et B5 dans un mutant $\Delta dom34$. L'ARN B1, qui comme notre étude l'a montré est produit par Xrn1, est trouvé à la fois enrichi dans la fraction des ARN associés à un ribosome (fractions 11-12-13) et à deux ribosomes (fractions 14-15) (Figure 17C). Nous en déduisons donc que cet ARN est produit lorsque deux ribosomes sont bloqués sur l'ARN1. Ce même raisonnement nous a permis de déterminer que les ARN B4 et B5, les deux autres fragments identifiés dans le mutant $\Delta dom34$, étaient tous deux produits lorsqu'au moins trois ribosomes étaient présents sur l'ARN1 (Figure 17C).

A l'aide de l'ensemble de ces informations, et sachant que typiquement Xrn1 bloque à 17 nucléotides en amont du site A lorsqu'elle bute contre un ribosome (Pelachano et al., 2015), nous avons pu affiner la cartographie des clivages intervenants sur l'ARN1 en intégrant à celle-ci la position des ribosomes bloqués lors de l'induction du NGD (Figure 18). Dans la littérature, il est décrit qu'un ribosome en cours de traduction couvre entre 28 à 30 nucléotides d'un ARNm. De la même manière, il a été montré que le ribosome le plus en 3' d'un ARN tronqué couvrirait

quant à lui environ 16 à 17 nucléotides (Pelechano *et al.*, 2015). Ainsi, nos observations que les fragments B1 (47nt) et B5 (77nt) soient associés respectivement à deux et trois ribosomes, concordent parfaitement avec la littérature (Figure 18).

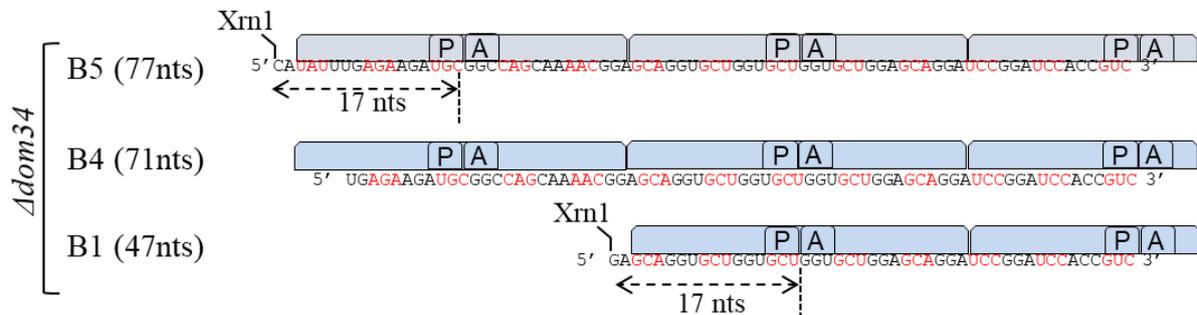


Figure 18 : Schéma de la cartographie des clivages et de l'association des ARN aux ribosomes bloqués dans un mutant $\Delta dom34$ ou $\Delta dom34/\Delta xrn1$.

Les ribosomes sont représentés en bleu, le positionnement des sites A et P est indiqué par une lettre.

2.4 Dxo1 : un nouvel acteur de la dégradation des ARN tronqués

La cartographie précise des clivages présents sur l'ARN1 nous offre maintenant la possibilité de déterminer l'identité des acteurs impliqués dans leur production. Dans cette optique, nous avons décidé de cribler à l'aide de l'ARN1 une collection de mutants de ribonucléases dont nous disposons. Grâce à cette approche, nous avons constaté que les ARN B2 et B3 étaient absents lorsque que la protéine Dxo1 était inactivée dans un mutant $\Delta dxo1\Delta xrn1/\Delta dom34$ (Figure 19). Dans la littérature, Dxo1 est décrite comme une exoribonucléase 5'-3' dotée d'un domaine pyrophosphohydrolase permettant d'hydrolyser des coiffes aberrantes présentes sur certains messagers (*Introduction 2.2.1.1*) (Chang *et al.*, 2012). C'est donc avec étonnement que nous avons constaté qu'en plus de ce rôle, Dxo1 participait à l'élimination d'un ARN tronqué.

produits par cette dernière, que nous avons observés avec les différents Rz, suggèrent que Dxo1 est sensible à la séquence de l'ARN qu'elle dégrade.

A l'inverse, pour l'ARN B4, nous n'avons pas constaté de variation entre les différents Rz testés. Il semblerait donc que cet ARN soit produit de manière indépendante de la séquence de l'ARN ciblé par le NGD (Figure 20).

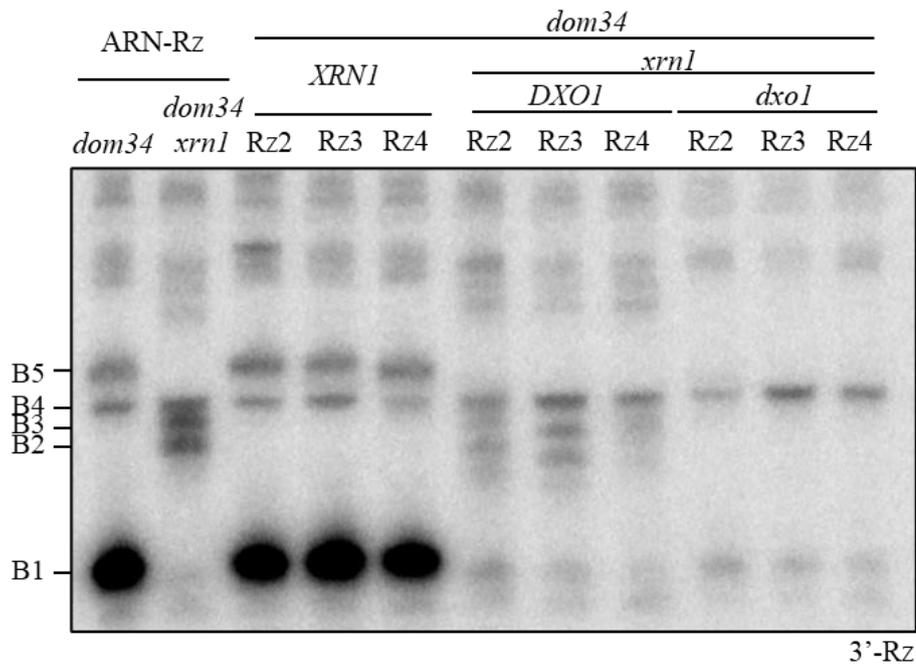


Figure 20 : Dxo1 est sensible à la séquence de l'ARN messenger.

Les ARN totaux provenant de différents mutants $\Delta dom34$, $\Delta dom34/\Delta xrn1$ ou $\Delta dom34/\Delta xrn1/\Delta dxo1$ ont été transformés avec les constructions Rz2, Rz3 ou Rz4 ont été séparés sur un gel d'acrylamide 8% avant d'être révélés à l'aide de la sonde 3'-Rz.

3 Existence d'un clivage endoribonucléolytique

3.1 Le clivage endonucléolytique intervient au niveau du troisième ribosome bloqué

Notre approche nous a permis de mettre en évidence l'importance de Xrn1 et de Dxo1 dans la dégradation de l'ARN1. Lorsque ces deux exonucléases 5'-3' sont mutées, il ne persiste qu'un unique clivage B4 qui, selon nous, intervient au niveau du troisième ribosome bloqué sur l'ARN tronqué (Figure 19).

Selon la littérature, le NGD se caractérise par l'intervention d'un clivage de nature endoribonucléolytique sur le messenger aberrant. Par définition, un clivage qui est assuré par une endonucléase produit deux fragments d'ARN 5' et 3' contigus. Aucune étude n'a jusqu'alors démontré l'existence de tels fragments car les ARN qui ont été analysés possédaient une forte hétérogénéité au niveau de leurs extrémités 3' et 5' (Simms *et al.*, 2017).

Nous postulons alors que seul l'ARN B4 pourrait être le résultat d'un clivage endoribonucléolytique puisque les ARN B1/2/3/5 sont chacun issus d'attaques exoribonucléolytiques. Nous avons donc cherché à démontrer qu'il existait un ARN 5'-NGD ayant une séquence contiguë à celle de l'ARN B4 (B4-5'NGD). Pour ce faire, nous avons mené une approche de séquençage des extrémités 3' basée sur l'utilisation de la technique de 3'-RACE (Adkar-Purushothama *et al.*, 2017). Afin de limiter les dégradations pouvant affecter l'ARN B4-5'NGD, nous avons aussi décidé d'effectuer cette analyse sur des ARN produits dans des mutants $\Delta ski2$ et $\Delta dom34/\Delta ski2$. Cette technique de 3'-RACE consiste donc à liguer un oligonucléotide spécifique (univ-3'), en 3' d'ARN issus d'un extrait d'ARN total. Ainsi, après reverse transcription de tous les ARN ligués à cet oligonucléotide, il est possible d'effectuer sur les ADN complémentaires obtenus une réaction PCR afin d'obtenir des amplicons correspondants aux ARN de la région d'intérêt (Figure 21).

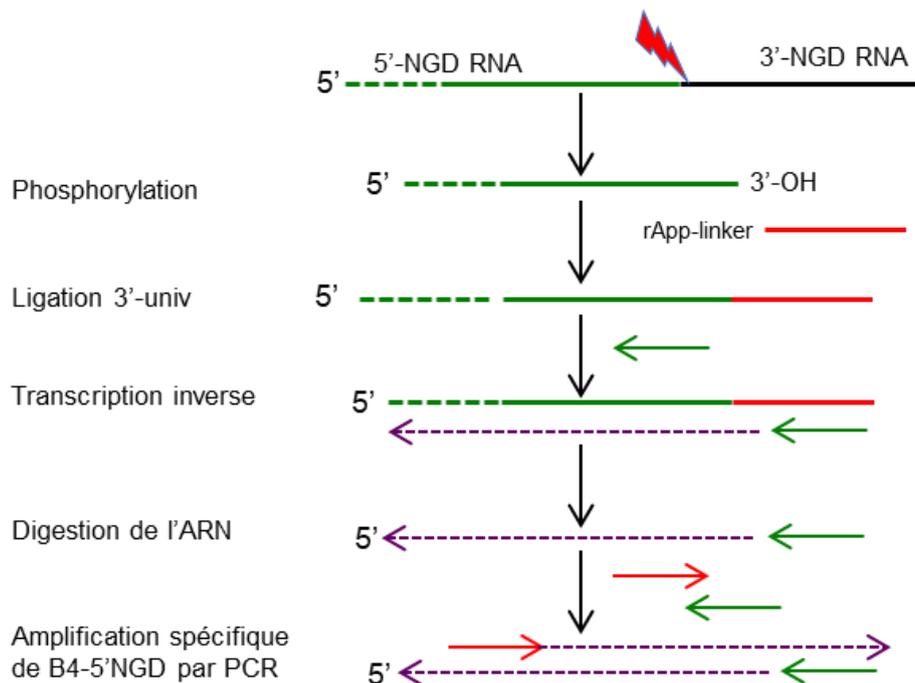


Figure 21 : Principe de la technique de 3'-RACE.

La PCR que nous avons effectuée nous a permis d'amplifier, dans le mutant *Δski2* et *Δdom34/Δski2*, un ADN d'une taille comprise entre 50 et 100 nucléotides. Ce résultat très encourageant était en accord avec les calculs théoriques de la taille du produit PCR que nous attendions en cas d'amplification de l'ARN B4-5'NGD, soit un amplicon de 66 nucléotides (Figure 22A). Après une étape d'extraction et de purification, nous avons fait séquencer les produits de la PCR afin de déterminer leurs séquences exactes.

A l'issue du séquençage, nous concluons que nous avons capturé par 3'-RACE un seul type d'ARN, et que cet ARN possède une séquence en nucléotide contiguë à celle de l'ARN B4 (Figure 22B). Ce résultat nous permet d'affirmer que l'ARN B4 résulte bien d'un clivage endoribonucléolytique qui interviendrait à 71 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARN1. Qui plus est, nous confirmons que ce clivage n'est pas un artefact dû à la délétion de *DOM34* puisque nous avons aussi détecté et séquencé l'amplicon correspondant à l'ARN B4-5'NGD dans le contexte où le facteur Dom34 était présent (souche *Δski2*).

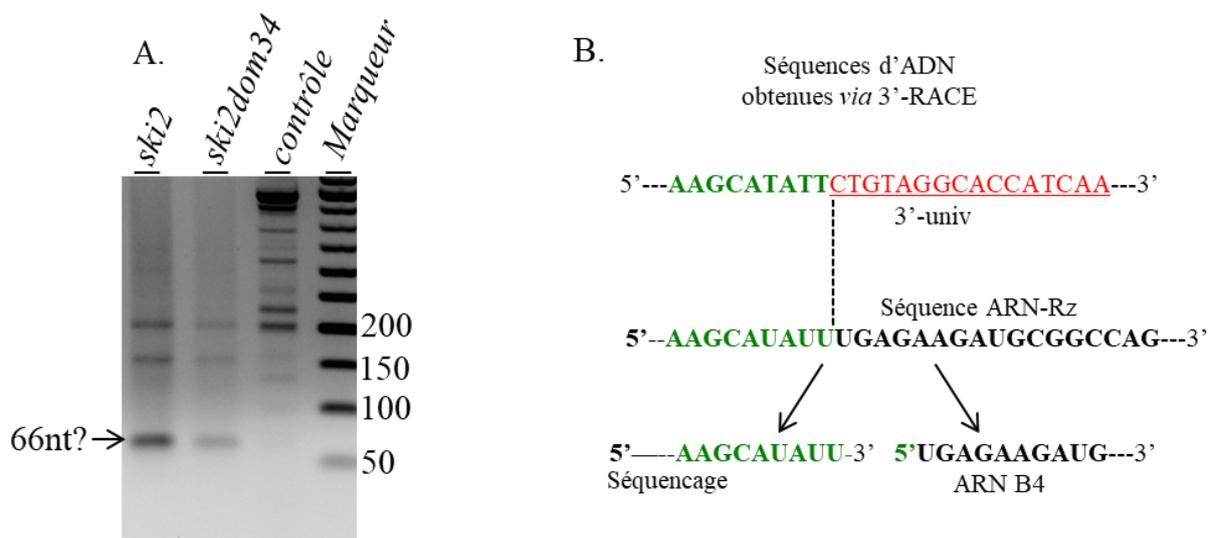


Figure 22 : Utilisation de la technique de 3'RACE pour identifier l'ARN B4-5'NGD.

(A) Révélation par BET et sur gel d'agarose des produits PCR que nous avons obtenus à l'issue de la 3'-RACE. La taille du marqueur de poids moléculaire est précisée à sa droite (B) Résultat schématique du séquençage de ces ADN (en vert) et reconstruction de l'ARN1 à partir de la séquence de l'ARN B4 (en noir).

Remarquablement, nous n'avons pas capturé d'ARN 5'-NGD qui pourrait résulter d'un clivage endonucléolytique qui interviendrait plus en 3' de l'ARN1. Ce résultat, qui est en accord avec la cartographie des clivages présentée précédemment, suggère qu'aucun clivage endonucléolytique n'interviendrait au niveau du disome bloqué. Nous proposons donc que le clivage endoribonucléolytique du NGD serait déclenché à une distance de 8 nucléotides en amont du site P du troisième ribosome bloqué sur l'ARN1, laissant envisager que le clivage se déroulerait de manière interne à celui-ci. Au vu de la séquentialité des clivages que nous avons observée, un clivage endonucléolytique pourrait également se produire au niveau des ribosomes bloqués sur l'ARN en 5' du trisome, selon le même mécanisme.

3.2 Avenir de l'ARN tronqué après le clivage endonucléolytique

Il est proposé dans la littérature que l'élimination des ARN tronqués puisse résulter d'une succession de « cycles » de NGD sur les nouveaux fragments 5'-NGD produits (Guydosh and Green, 2017). Maintenant que nous connaissons l'existence de l'ARN B4-5'NGD, nous avons décidé de déterminer sa capacité à être pris en charge par le NGD. L'ARN B4-5'NGD est un ARN tronqué puisqu'il résulte d'un clivage endoribonucléolytique et nous l'avons analysé selon la stratégie que nous avons appliquée pour l'étude de l'ARN1. Pour ce faire, nous avons dessiné une sonde (New-3') capable de s'hybrider au niveau de l'extrémité 3' de cet ARN (Figure 23A).

Par cette approche, nous sommes à même de détecter une échelle de fragments d'ARN d'apparence similaire à celle observée avec la sonde 3'-Rz (Figure 23A). Ces fragments, qui proviennent de la dégradation de l'ARN B4-5'NGD par le NGD, sont semblables entre le mutant $\Delta dom34$ et $\Delta dom34/\Delta ski2$ (Figure 23B). Suite à une extension d'amorce, les tailles de ces nouveaux fragments ARN (pour les deux plus courts et importants en signal, Figure 23B) sont estimées à des longueurs de 48 et 78 nucléotides (Figure 23C). Il semble donc, à l'instar de l'ARN1, que l'ARN B4-5'NGD est rapidement protégé de la dégradation 3'-5' par la présence de deux ou trois ribosomes bloqués à son extrémité. De manière intéressante, il est escompté, du fait du clivage dans la phase +1, que le ribosome soit bloqué en 3' de l'ARN B4-5'NGD avec un nucléotide dans son site A. Il est donc attendu que les fragments B1', B4' et B5' issus de la dégradation de l'ARN B4-5'NGD, s'ils sont produits sur le même schéma que les ARN B1, B4 et B5, possèdent une taille respective de 47+1, 71+1 et 77+1 nucléotides. De manière remarquable, cela est vérifié (Figure 23C).

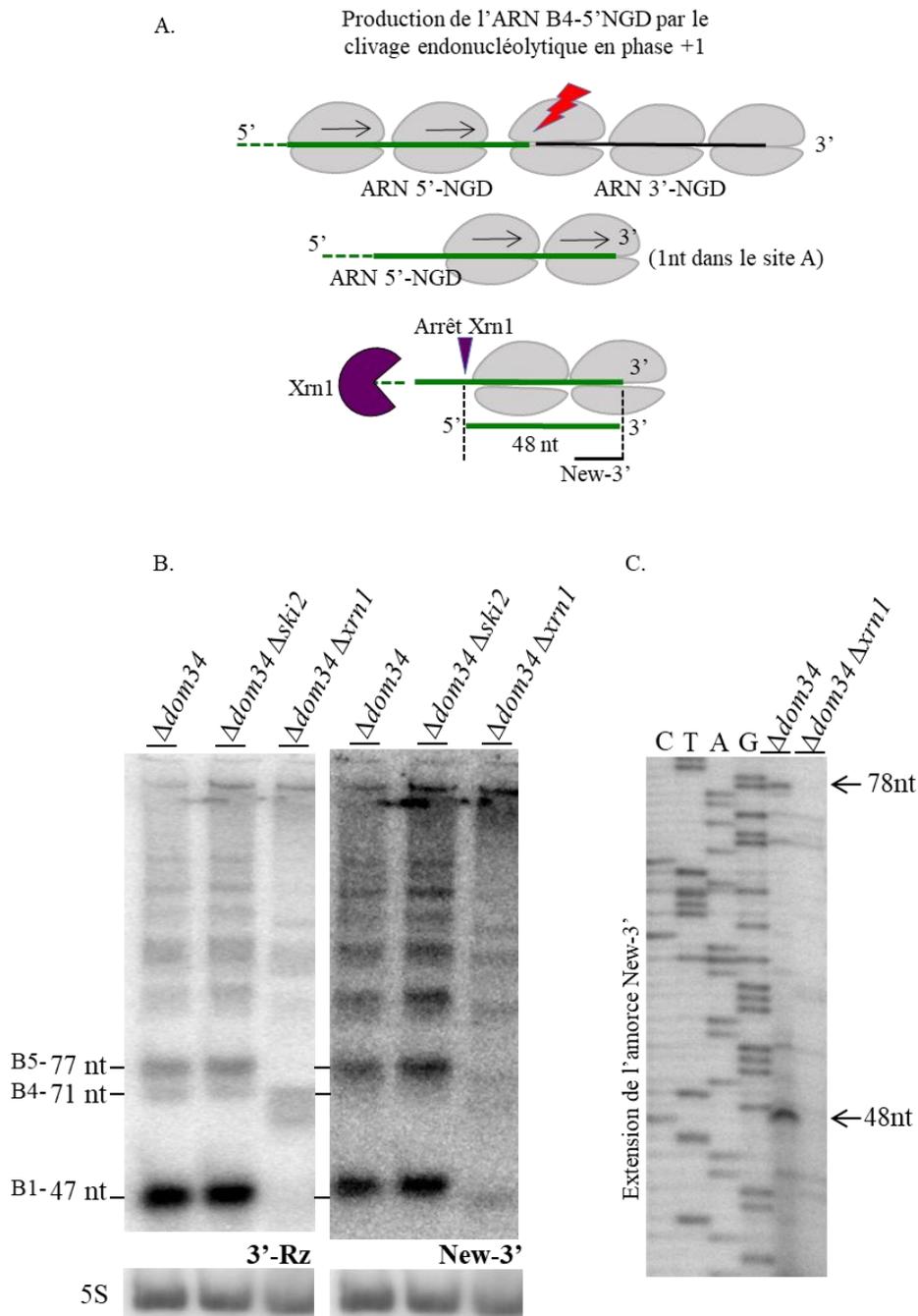


Figure 23 : L'ARN tronqué provoque l'apparition de nouvelles cibles de la dégradation NGD.

(A) Schéma explicatif du positionnement des sondes radioactives utilisées lors des northern blot visant à déterminer le devenir de l'ARN B4-5'NGD après sa reconnaissance par le NGD. (B) Après migration sur gel d'acrylamide 8%, les mêmes ARN totaux ont été révélés à l'aide de la sonde 3'-Rz (gauche) ou New-3' (droite). (C) La taille en nucléotides (nt), des intermédiaires de dégradation de l'ARN B4-5'NGD que nous avons détectés, a été déterminée par l'extension de l'amorce New-3'.

Il est alors envisagé que, lorsque le clivage endonucléolytique a lieu au niveau du troisième ribosome, deux ou trois ribosomes au moins soient déjà présents en amont. Ainsi, suite au clivage, les ribosomes poursuivraient l'étape d'élongation jusqu'à atteindre la nouvelle extrémité 3' nouvellement formée (correspondant à l'ARN B4-5'NGD) (Figure 23A). Toutefois, l'abondance de l'ARN B4' (71+1 nucléotides) est faible en comparaison aux signaux détectés pour B1' et B5' dans l'ensemble des mutants que nous avons testé (Figures 23B et 23C). Ces résultats suggèrent donc que Xrn1 joue un rôle prépondérant dans la dégradation des fragments 5'-NGD. Nous ne pouvons expliquer la faible abondance de l'ARN B4', ce phénomène pourrait être le résultat de la présence d'un nucléotide dans le site A du ribosome bloqué en 3' de l'ARNm qui pourrait affecter le recrutement de l'endonucléase. Une autre possibilité serait que la collision des ribosomes présents sur le nouvel ARN tronqué ne serait pas suffisamment importante pour déclencher efficacement le clivage endonucléolytique du NGD.

3.3 Hel2 est nécessaire au clivage endoribonucléolytique

L'utilisation de l'ARN1 nous a permis de cataloguer et cartographier l'ensemble des clivages intervenant sur un ARN tronqué durant le NGD. Nous disposons donc désormais d'un outil particulièrement efficace pour étudier les différents acteurs pouvant être impliqués dans cette voie de surveillance. Parmi ces derniers, l'ubiquitine ligase Hel2 semble particulièrement importante dans la reconnaissance des ribosomes bloqués et leur capacité à déclencher le NGD (*Introduction 2.2.2.2*). Nous avons donc décidé d'étudier l'impact de la mutation de *HEL2* sur le devenir des ARN précédemment identifiés dans le mutant *Δdom34*.

Nous constatons d'abord que l'ARN B4, qui est le produit d'un clivage endoribonucléolytique, est totalement absent dans le mutant *Δhel2/Δdom34* (Figure 24A). En accord avec la littérature, nous confirmons donc que Hel2 est essentielle au recrutement de l'activité endoribonucléolytique du NGD (Ikeuchi *et al.*, 2019).

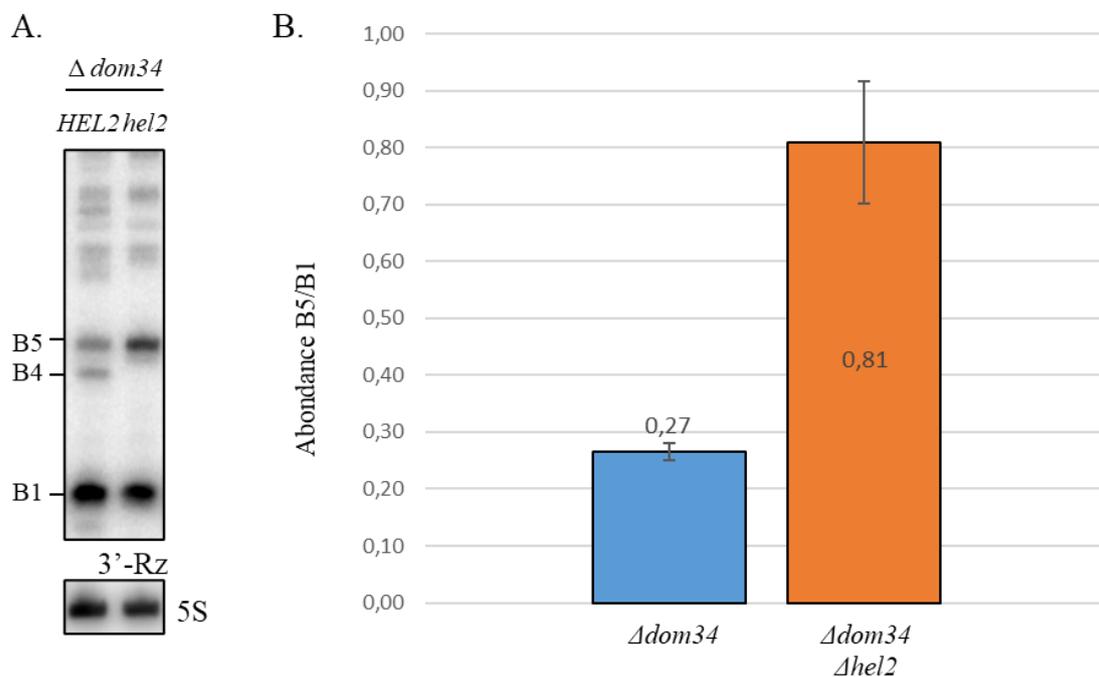


Figure 24 : Le clivage endonucléolytique du NGD dépend de l'ubiquitine ligase Hel2.

(A) Des ARN totaux provenant de mutants $\Delta dom34$ ou $\Delta dom34 \Delta hel2$ ont été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% avant d'être révélés par northern blot à l'aide de la sonde 3'-Rz. La révélation de l'ARN 5S sert de témoin de charge à l'expérience. (B) Histogramme rapportant les ratios calculés entre les ARN B5/B1 dans les mutants $\Delta dom34$ ou $\Delta hel2/\Delta dom34$.

Nous avons ensuite voulu comparer les quantités d'ARN B5 visibles dans les mutants $\Delta dom34$ et $\Delta dom34/\Delta hel2$. Il est notable que la mutation $\Delta hel2$ provoque une augmentation de la quantité de l'ARN B5 (en se rapportant à la quantité du 5S) (Figure 24A). Comme il existe toujours un risque qu'une mutation affecte la dynamique cellulaire et que la production faible ou forte d'un ARN soit simplement liée à un état particulier de la traduction, nous avons aussi calculé le ratio entre la quantité de l'ARN B5 et l'ARN B1 produite au sein de chaque mutant (Figure 24B). Nous observons donc un effet très net sur la production de l'ARN B5 vis à vis de B1 dans le mutant $\Delta hel2$. Nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses pour expliquer ce phénomène. Il serait ainsi possible que l'activité de décoiffage de l'ARN tronqué soit augmentée dans le mutant $\Delta hel2$, ce qui favoriserait la production de l'ARN B5 vis à vis de B1 par Xrn1 dans un contexte où l'ARN B4 n'est jamais produit. D'autres pourraient s'étonner que seule une accumulation de l'ARN B5 soit observée et non pas celle d'autres ARN produits

par Xrn1 (par exemple l'ARN B1 lorsque Xrn1 bute sur le disome). Une hypothèse serait alors que la proportion de trisome bloqué sur l'ARN1 soit bien plus abondante, ou bien plus stable en absence de clivage endonucléolytique (mutant *Ahel2*), et d'imaginer alors que le clivage soit un élément qui pourrait favoriser la dissociation de ce troisième ribosome.

3.4 Le clivage endonucléolytique génère un ARN 5'-OH

Pour aller plus loin dans l'analyse du clivage endonucléolytique du NGD, nous avons décidé d'analyser la nature chimique de l'extrémité 5' du fragment B4. En effet, la présence d'un groupement hydroxyle (5'-OH) ou monophosphate (5'-P) à l'extrémité 5' d'un ARN clivé permet d'apporter une information importante sur l'identité de l'endonucléase à l'origine de sa production. Deux principales catégories d'endonucléases ont été décrites dans la littérature. La première fait intervenir des ions métalliques capables de générer un ARN 5'-P tandis que la seconde provoque des clivages dits métaux-indépendants qui mènent à l'apparition d'ARN 5'-OH (Yang, 2011).

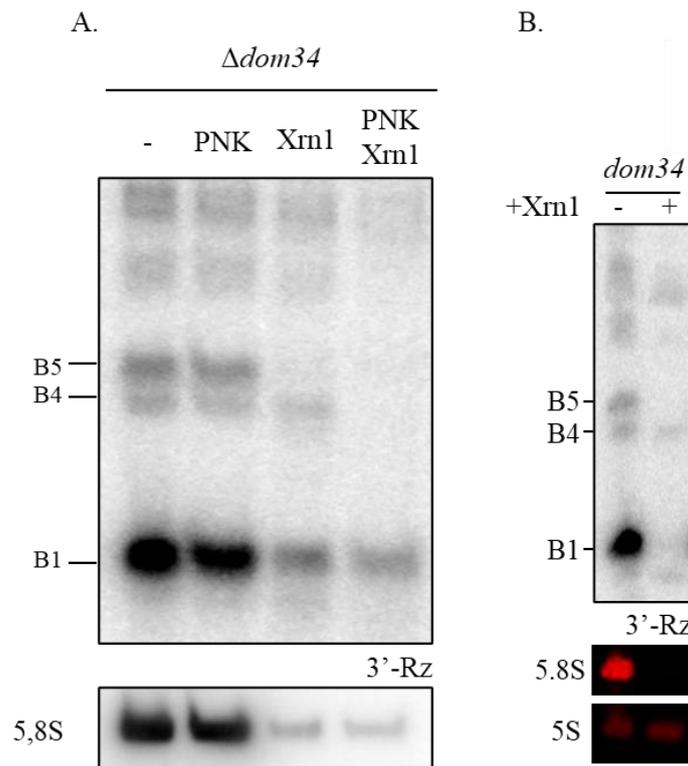


Figure 25 : Etude de la phosphorylation de l'ARN B4 dans un mutant $\Delta dom34$.

Des ARN totaux provenant de mutants $\Delta dom34$ ont été traités avec une kinase (PNK), Xrn1 (Xrn1) ou les deux (PNK Xrn1) durant 30 minutes dans un tampon optimal pour la PNK (A) ou optimal pour Xrn1 (B). Ils ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% avant d'être révélés par northern blot à l'aide de la sonde 3'-Rz. La révélation de l'ARN 5S sert de témoin de charge et la disparition de l'ARN 5.8S permet de contrôler l'efficacité de la dégradation de Xrn1 *in vitro*.

Dans le but d'étudier l'extrémité 5' l'ARN B4, nous avons décidé d'exploiter la capacité de Xrn1 à ne dégrader que des ARN 5'-monophosphates. Ainsi, nous avons traité, *in vitro*, des ARN totaux provenant de souches $\Delta dom34$ ou $\Delta dom34/\Delta xrn1$ avec Xrn1 ou/et une polynucléotide kinase (PNK) (Figure 25).

Conformément à nos attentes, l'utilisation de la PNK n'a aucun impact sur les fragments B1, B4 et B5 que l'on peut observer dans le mutant $\Delta dom34$ (Figure 25A). Lorsque les ARN sont traités avec Xrn1, nous observons que l'ARN B5 disparaît, et que la quantité d'ARN B1 diminue fortement. Nous avons d'ailleurs constaté que dans des conditions optimales de dégradation l'ARN B1 était intégralement éliminé par Xrn1 (Figure 25B). A l'inverse, la stabilité de l'ARN B4 semble très peu affectée par l'utilisation de Xrn1 seule (Figure 25A).

Dès lors que nous ajoutons la PNK avec Xrn1, l'ARN B4 est totalement dégradé ce qui suggère que la phosphorylation de son extrémité 5' par la PNK est suffisante pour assurer son élimination par Xrn1. Ainsi, nous proposons que l'ARN B4 se trouve sous une forme 5'-OH dans le mutant $\Delta dom34$. Cette information révèle que l'endonucléase impliquée dans le NGD est donc sûrement une enzyme avec un domaine nucléase dépourvu d'ion métallique en son centre catalytique.

Afin de compléter notre compréhension du système, nous avons aussi mené une étude similaire avec des extraits cellulaires provenant de souches $\Delta dom34/\Delta xrn1/\Delta dxo1$. Dans ces conditions, et contrairement à ce qui est observé pour des extraits issus de souches $\Delta dom34$ (Figures 25A et 25B) nous avons constaté qu'une partie des ARN B4 était dégradé par Xrn1 qui viendrait alors buter sur le disome. Ce résultat suggère que deux populations d'ARN B4 cohabitent dans le cytoplasme : une population d'ARN 5'-P sensible à Xrn1 qui ne serait associée qu'à un disome et une population d'ARN 5'-OH résistante à cette dégradation, probablement couverte par un trisome (Figure 26).

Selon notre modèle, il existerait une kinase cytoplasmique chargée de phosphoryler l'ARN B4 peu de temps après sa production par le NGD. Il est envisageable que cette dernière n'intervienne qu'après la dissociation d'un ribosome, ce qui expliquerait la forte proportion de B4 5'-OH détectée dans le mutant $\Delta dom34$.

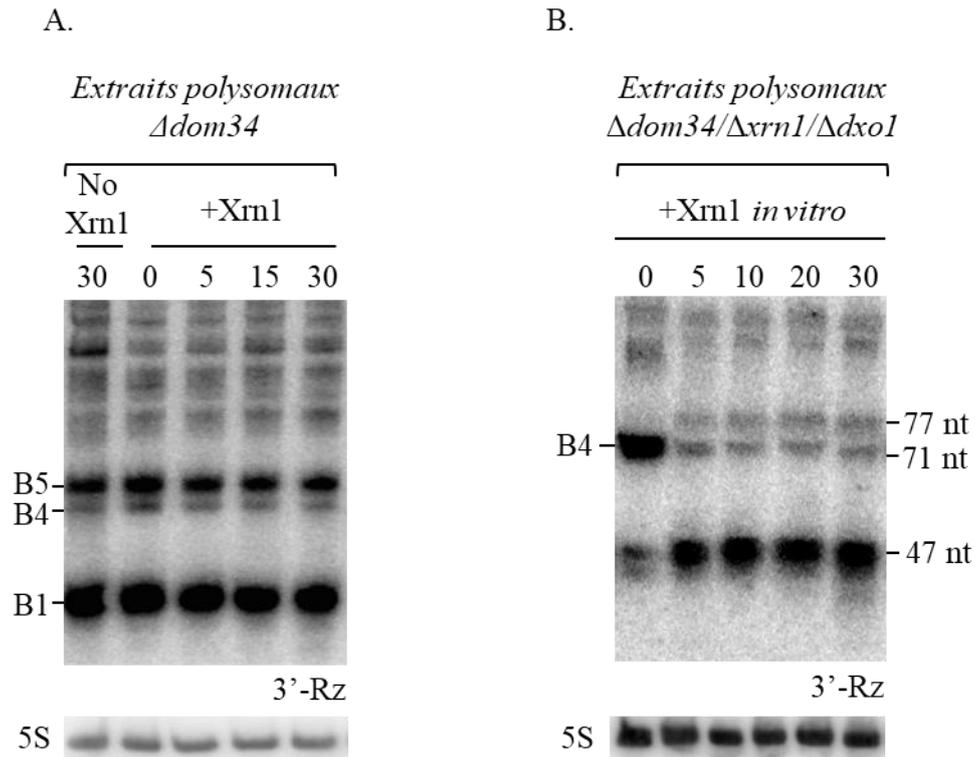


Figure 26 : Etude de la phosphorylation de l'ARN B4 dans des extraits polysomiaux de mutants $\Delta dom34$ ou $\Delta xrn1/\Delta dom34/\Delta dxo1$.

Des extraits polysomiaux provenant de mutants (A) $\Delta dom34$ ou (B) $\Delta xrn1/\Delta dom34/\Delta dxo1$ ont été traités avec 1 U de Xrn1 dans un tampon NEB 3 selon les temps indiqués (min). Ils ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% avant d'être révélés par northern blot à l'aide de la sonde 3'-Rz. La révélation de l'ARN 5S sert ici de témoin de charge à l'expérience.

3.5 Trl1 phosphoryle l'ARN B4

Les résultats précédemment obtenus suggèrent qu'il existe une kinase cytoplasmique qui serait responsable de la phosphorylation de l'ARN B4 peu de temps après sa production par le clivage endoribonucléolytique du NGD. Après une étude de la littérature, il nous est apparu que la kinase Trl1 semblait être le meilleur candidat à cette phosphorylation. En effet, cette kinase d'ARN joue un rôle essentiel dans la maturation de certains ARN de transfert contenant des introns. Elle phosphoryle notamment, après leur excision, les introns 5'-hydroxylés pour assurer leur élimination par Xrn1 (Phizicky *et al.*, 1992 ; Wu *et al.*, 2014). Nous avons donc étudié, à l'aide d'une migration résolutive sur gel acrylamide, l'extrémité 5' de l'ARN B4 dans un mutant $\Delta trl1/\Delta dom34$ (la souche $\Delta trl1$ ayant été fournie par le laboratoire de Jay Hesselberth) (Cherry *et al.*, 2018).

Nous constatons par northern blot que la quantité globale d'ARN B4 est significativement augmentée dans le mutant $\Delta trl1/\Delta dom34$ comparée à l'abondance de cet ARN dans le contexte $\Delta dom34$. Il est donc possible que la dégradation de l'ARN B4 soit fortement ralentie par l'absence de la kinase Trl1 dans le cytoplasme (Figure 27A).

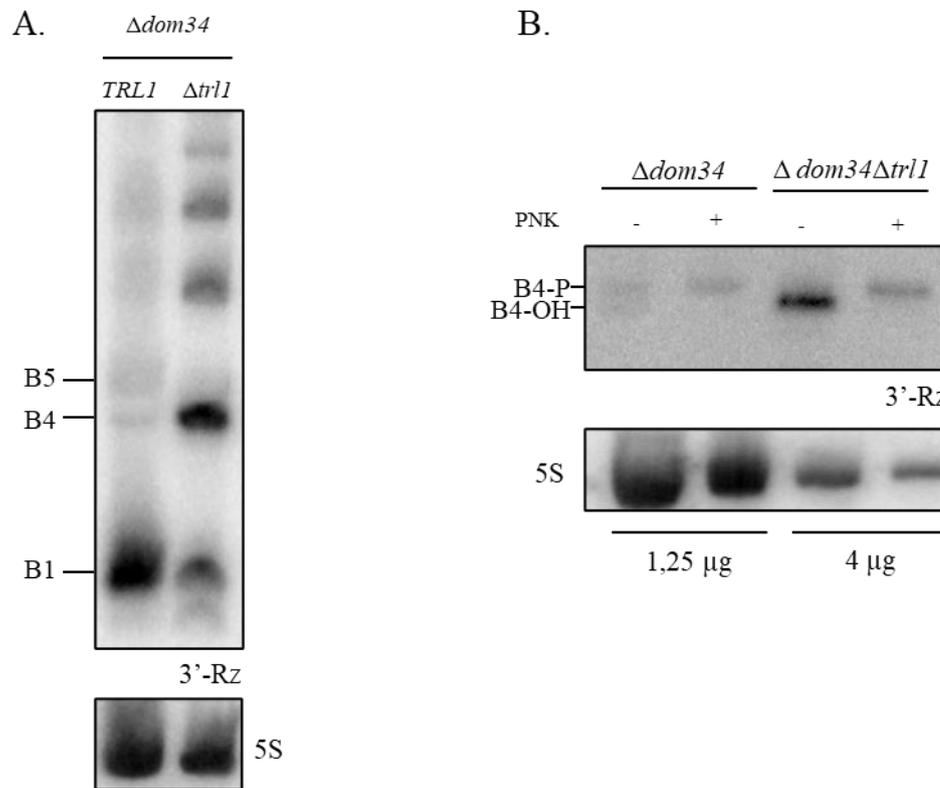


Figure 27 : Importance de Trl1 dans la phosphorylation de l'ARN B4.

(A) Des quantités équivalentes d'ARN totaux provenant de mutants $\Delta dom34$ ou $\Delta dom34/\Delta trl1$ ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% avant d'être révélés par northern blot à l'aide de la sonde 3'-Rz. (B) Ces mêmes ARN ont été traités ou non (-) avec une kinase (PNK). Afin d'homogénéiser l'analyse du mutant $\Delta dom34$ et $\Delta dom34/\Delta trl1$, les quantités (μ g) indiquées d'ARN ont ensuite été migrées de manière résolutive (Matériels et Méthodes (8.1)) sur un gel d'acrylamide 12% puis révélées par northern blot avec la sonde 3'-Rz.

Suite à ces premiers résultats, nous avons analysé avec précision la nature du groupement présent en 5' de l'ARN B4 dans un mutant $\Delta dom34$ ou $\Delta dom34/\Delta trl1$. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique de migration appliquée par le laboratoire de Anita Hopper qui permet de séparer deux fragments d'ARN en fonction du poids moléculaire du groupement présent à leur extrémité 5' (Wu and Hopper, 2014). Préalablement à la migration, les ARN totaux issus des souches $\Delta dom34$ ou $\Delta dom34/\Delta trl1$ ont été traités ou non avec une polynucléotide kinase *in vitro*.

Dans le mutant *Δdom34*, en l'absence de traitement, nous détectons la présence d'une double bande B4 après la migration. Le fait que la forme basse de l'ARN B4 disparaisse au profit de sa forme haute à la suite du traitement des ARN avec la kinase permet de confirmer l'hypothèse précédemment énoncée selon laquelle deux populations d'ARN B4 coexisteraient dans le cytoplasme (Figure 27B). Ainsi, la forme basse correspondrait à la forme hydroxylée de B4 tandis que la forme haute posséderait une extrémité 5'-P. Dans le contexte *Δdom34/Δtrl1*, une seule espèce d'ARN B4, d'un poids moléculaire équivalent à la forme basse précédemment caractérisée, est détectée. Le traitement kinase que nous avons effectué nous permet de confirmer ce résultat puisque, dans ces conditions, nous constatons un retard de migration de la forme basse de B4 vers sa forme haute. Nous déduisons de cette expérience que Trl1 possède un rôle majeur dans le NGD puisqu'elle participe à l'élimination rapide du fragment 3'-NGD résultant du clivage endonucléolytique. Selon notre modèle, Trl1 phosphorylerait l'ARN B4 peu de temps après la dissociation d'un des trois ribosomes présents sur cet ARN. Ces événements feraient alors de l'ARN B4 un substrat de la voie 5'-3' de dégradation ce qui assurerait sa prise en charge par Xrn1 et Dxo1.

3.6 Cue2 est impliquée dans le clivage endonucléolytique

Le modèle du NGD que nous avons développé nous a permis d'une part, de cartographier les clivages selon la position des ribosomes bloqués sur l'ARN tronqué, et d'autre part, d'identifier les différents acteurs impliqués dans la gestion et la dégradation d'un tel ARN. Cependant, malgré ces informations, l'identité de l'endoribonucléase impliquée dans le NGD restait jusqu'alors inconnue. Deux récentes études publiées par les laboratoires de Rachel Green ou de Joshua Arribere proposent que l'activité endonucléase du NGD soit portée par le domaine ribonucléase SMR de la protéine Cue2 (NONU-1 chez *C. elegans*) (D'Orazio *et al.*, 2019 ; Glover *et al.*, 2020).

Pour vérifier l'implication de cette dernière dans le NGD, nous avons analysé par northern blot la présence de l'ARN B4 dans un mutant de *CUE2*. Nous avons constaté que cet ARN, qui est produit par le clivage endonucléolytique du NGD, était totalement absent dans le double mutant *Δdom34/Δcue2* (Figure 28). Ainsi, nous pouvons affirmer que la production de B4 est bien dépendante de Cue2. Cependant, ce résultat ne nous permet pas d'affirmer que Cue2 est responsable du clivage de l'ARN1 par le NGD. En effet, un résultat similaire était observé dans un mutant *Δdom34/Δhel2* alors que Hel2 n'intervient qu'en amont du clivage, lors de la détection des ribosomes bloqués. Néanmoins, si Cue2 était responsable du clivage

endonucléolytique à l'origine de l'ARN B4, cette dernière interviendrait à huit nucléotides en amont du site P du troisième ribosome bloqué sur l'ARN1. Cela suggère donc que le clivage endonucléolytique interviendrait aux abords de la sortie de l'ARN1 hors du troisième ribosome bloqué et non pas au niveau du site A comme proposé dans la littérature (D'Orazio *et al.*, 2019).

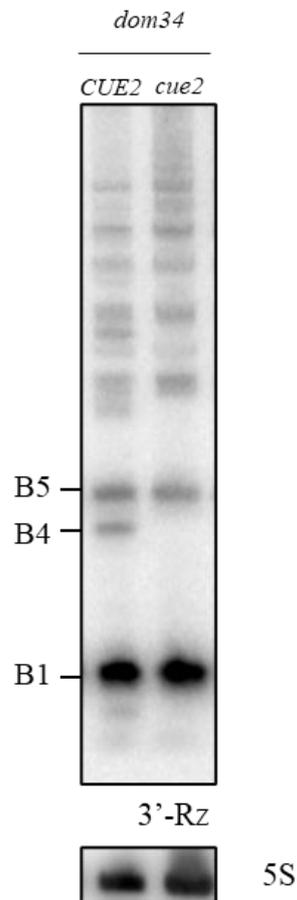


Figure 28 : Le clivage endoribonucléolytique est dépendant de Cue2.

Des ARN totaux issus de souches $\Delta dom34$ ou $\Delta dom34/\Delta cue2$ ont été séparés par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% avant d'être révélés par northern blot à l'aide de la sonde 3'-Rz. La révélation de l'ARN 5S sert de témoin de charge.

4 Étude d'un ARN comportant des codons rares

Nous avons maintenant une vue globale des événements de dégradation qui permettent à la cellule d'éliminer un ARN tronqué ciblé par le NGD. Pour aller plus loin, nous avons cherché à déterminer si nous pouvions transposer notre modèle à d'autres ARN sensibles à cette voie de surveillance. Pour ce faire, nous avons utilisé une construction plasmidique capable d'exprimer *in vivo* un ARN contenant une succession de quatre codons rares (ARN-CGA).

4.1 Xrn1 participe à l'élimination de l'ARN-CGA

Dans un premier temps, nous avons étudié le rôle que pouvaient jouer les voies générales de la dégradation cytoplasmique des ARNm sur l'ARN-CGA. D'une manière similaire au raisonnement que nous avons appliqué pour l'ARN1, nous avons utilisé une sonde radioactive capable de s'hybrider à la séquence placée en 3' des codons rares (3'-rare) (Figure 29A). En accord avec la littérature, nous avons constaté que des fragments d'ARN 3'-NGD provenant de la dégradation de l'ARN-CGA par le NGD étaient produits, et ce, indépendamment de la mutation $\Delta dom34$ (Figure 29) (Tsuboi *et al.*, 2012). De plus, la diminution du signal 3'-NGD dans le mutant $\Delta xrn1$ nous indique que cette dernière est responsable de la production de la majorité des intermédiaires de dégradation que nous détectons par northern blot avec la sonde 3'-rare. A l'inverse, l'exosome semble peu impliqué dans l'élimination de l'ARN-CGA puisqu'aucune variation de sa quantité ou de celle des fragments NGD associés n'a été observée durant notre étude.

4.2 Positionnement des ribosomes bloqués sur les codons rares

Nous nous sommes ensuite assurés que des ribosomes étaient détectables sur l'ARN-CGA. Afin d'obtenir cette information, nous avons étudié l'impact de Xrn1 sur l'ARN-CGA, sachant que des blocages de Xrn1 se produisent généralement à 17 nucléotides en amont du site A d'un ribosome bloqué.

Pour ce faire, nous avons effectué des expériences d'extension d'une amorce située en 3' des codons rares (oligonucléotide reverse-CGA). Les ADN complémentaires produits ont été séparés sur gel d'acrylamide et leur migration effectuée en parallèle d'une séquence ADN obtenue avec la même amorce. Cette approche nous a permis d'analyser avec précision les clivages susceptibles d'intervenir en 5' des codons rares (Figure 29). Nous avons ainsi constaté des arrêts d'extension, notés X1, X2, X3 et X4, uniquement présents lors que Xrn1 est active dans le cytoplasme. Nous avons donc attribué la production de ces fragments à la ribonucléase Xrn1 qui viendrait buter sur les ribosomes bloqués sur l'ARN-CGA, au cours de sa dégradation

(Figures 29B et 29C). Remarquablement, les arrêts X1 *versus* X2, ou X3 *versus* X4, sont distincts en taille de trois nucléotides (Figures 29B et 29C). Cette hétérogénéité des arrêts de Xrn1, espacés d'un codon, reflète tout simplement la variabilité de la position de blocage des ribosomes sur l'un ou l'autre des codons rares de l'ARN-CGA, ce qui rend bien sûr l'étude du NGD à partir de telles constructions, particulièrement plus complexes que celle effectuée sur l'ARN tronqué.

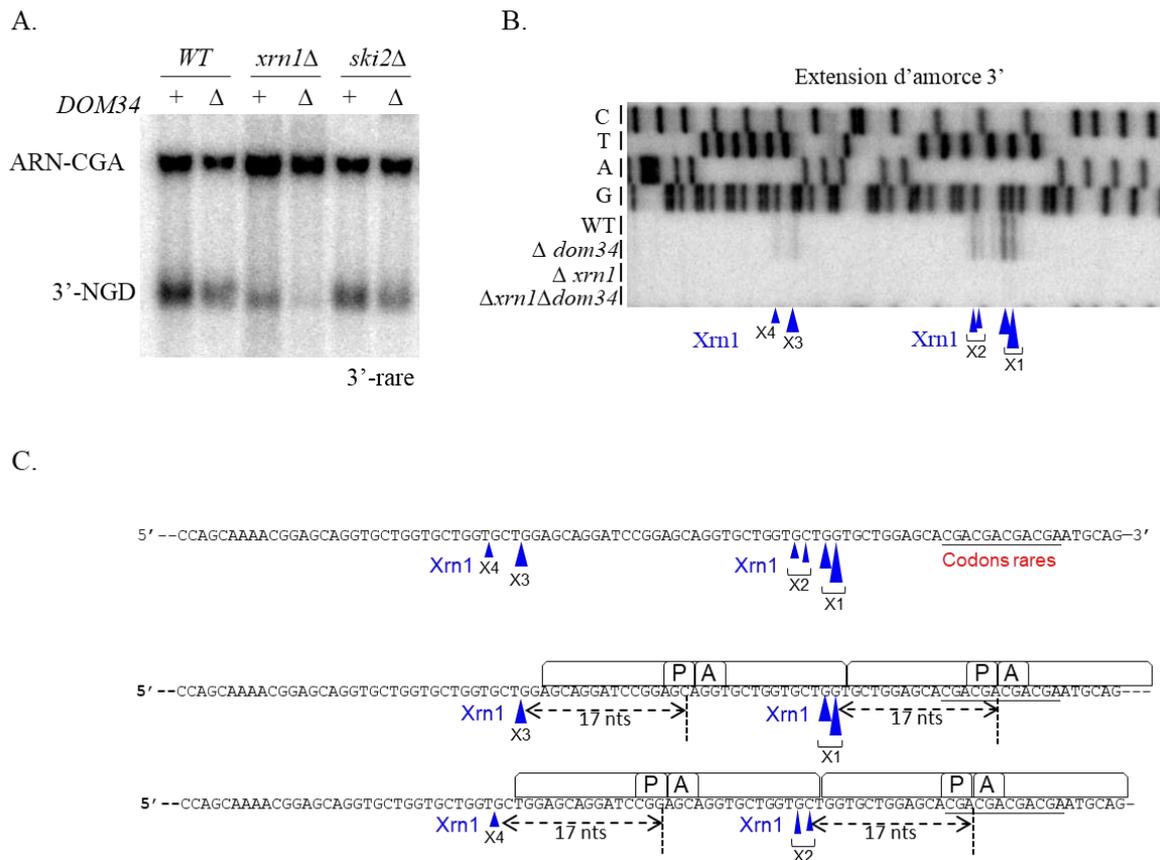


Figure 29 : Xrn1 joue un rôle important dans la dégradation de l'ARN-CGA.

(A) Des ARN totaux provenant de plusieurs mutants ont été séparés par gel d'agarose 1.6% avant d'être révélés par northern blot à l'aide de la sonde 3'-rare. (B) La taille de ces fragments a ensuite été déterminée par extension de l'amorce reverse-CGA. Les ARN générés par des arrêts de Xrn1 (X1-4) ont été symbolisés par des flèches bleues. (C) Positionnement des arrêts de Xrn1 sur l'ARN-CGA. (C) Le positionnement des ribosomes déduit par cette approche est symbolisé par des carrés blancs avec les sites A et P indiqués.

Cependant, puisqu'il est démontré que Xrn1 bloque à 17 nucléotides en amont du site A d'un ribosome (Pelachano *et al.*, 2015), nous proposons que les arrêts majeurs X1 seraient dûs au blocage d'un ribosome ayant en son site A le troisième codon rare de l'ARN-CGA (Figure 29C). De même, l'arrêt de Xrn1 noté X2 serait quant à lui produit par un ribosome bloqué ayant en son site A le second codon rare (Figure 29C). La différence d'un nucléotide

entre les deux arrêts, groupés sous le terme X1 (ou les arrêts X2), est interprétée par l'influence que pourrait avoir la conformation des ribosomes bloqués sur la dégradation effectuée par Xrn1. De plus, l'espacement d'une trentaine de nucléotides entre les signaux X1 et X3 (ou X2 et X4) reflèterait, quant à lui, la présence d'un second ribosome positionné en amont du ribosome stationné sur les codons rares et sur lequel buterait Xrn1 (Figures 29B et 29C).

4.3 **Caractérisation du clivage endoribonucléolytique sur l'ARN-CGA**

Nous avons désormais déterminé la position des ribosomes qui se trouvent bloqués sur les codons rares présents sur l'ARN-CGA. Cependant, la précédente approche ne nous a pas permis de détecter la présence d'un clivage endonucléolytique qui interviendrait sur cet ARN.

Afin de définitivement confirmer l'existence du clivage endoribonucléolytique du NGD sur l'ARN-CGA, nous avons mené une approche de 3'-RACE en l'absence de *SKI2* et/ou de *DOM34*. Ces paramètres visent à limiter au maximum la dégradation du fragment 5'-NGD qui pourrait intervenir naturellement dans la cellule. L'amplification par PCR des fragments capturés à l'aide de l'oligonucléotide 3'-univ a été effectuée grâce à l'amorce 5'-3'RACE-CGA capable de s'hybrider en 5' des codons rares. Nous avons ainsi amplifié, dans le mutant $\Delta ski2$ et $\Delta dom34/\Delta ski2$, un ADN d'une taille d'environ 45 nucléotides que nous avons alors purifié et séquencé (Figure 30A).

nucléotides (Figure 30C). Cependant, de manière notable, les arrêts majeurs de Xrn1 (notés X1), associés à un ribosome ayant son site A sur le troisième codon rare de l'ARN-CGA, placent justement les clivages endonucléolytiques majoritaires C2-C3 à 71 nucléotides du site A de ce ribosome (Figure 30C). De même les clivages C1 interviendraient à 71 nucléotides d'un ribosome ayant en son site A le second codon rare (déterminé par l'arrêt de Xrn1 noté X2 (Figures 29 et 30)). Nous détectons aussi un clivage endonucléolytique en C4, mais nous ne décelons pas d'arrêt de Xrn1 pouvant correspondre à un blocage des ribosomes à une position donnée. Nous spéculons, cependant, qu'il pourrait correspondre à un clivage intervenant à 71 nucléotides en amont d'un ribosome ayant son site A positionné sur le 4^{ème} codon rare (Figure 30C). Nous remarquons que les ARN produits par le clivage C4 sont sous-représentés lors du séquençage effectué à l'issue de la 3'-RACE (Figure 30B). Ceci suggère que le blocage des ribosomes sur le 4^{ème} codon rare serait un événement trop peu fréquent pour que la détection de l'arrêt Xrn1 correspondant puisse être possible.

En résumé, les clivages endonucléolytiques les plus nettes semblent, comme pour l'ARN tronqué, intervenir dans la région qui correspond à celle recouverte par le troisième ribosome qui serait bloqué sur l'ARN-CGA. Conformément à l'étude des ARN tronqués, nous n'avons pas détecté, par 3'-RACE, de clivages plus en 3' sur l'ARN-CGA, ce qui suggère fortement que le disome bloqué au niveau des codons rares ne serait pas capable de déclencher le clivage endonucléolytique du NGD.

Forts des informations dont nous disposons sur la mise en place du clivage endonucléolytique du NGD dans une région nucléotidique située à 71 nucléotides des codons rares, nous avons voulu étudier le devenir de l'ARN tronqué (5'NGD-CGA) produit par le clivage endonucléolytique. Pour ce faire, nous avons dessiné une sonde (71nt-CGA) capable de s'hybrider exactement à 71 nucléotides du second codon rare (Figure 31A). Comme attendu, nous n'avons détecté, ni l'ARN 5'NGD-CGA, ni ses intermédiaires de dégradation lorsque le complexe Dom34:Hbs1 était fonctionnel. En effet, dans ces conditions, les ribosomes bloqués sont rapidement dissociés et l'ARN est alors éliminé par la voie 3'-5' de dégradation (*Résultats 2.1*). Cependant, dans le mutant *Δdom34*, des fragments d'ARN semblables à ceux caractérisés avec l'ARN1 ont pu être détectés par la sonde 71nt-CGA (Figure 31B). De par leur ressemblance avec les ARN B1/4/5, nous les avons appelés B1-like, B4-like ou B5-like.

Ce résultat suggère donc que l'ARN 5'NGD-CGA accumule des ribosomes bloqués qui permettent, ensuite, de provoquer l'intervention du NGD sur ce dernier. Nous supposons d'ailleurs que cet événement se déroule rapidement après le clivage puisque la stabilité des

fragments NGD que nous avons observé n'est pas impactée par la mutation de l'exosome cytoplasmique (Figures 31B et 31C).

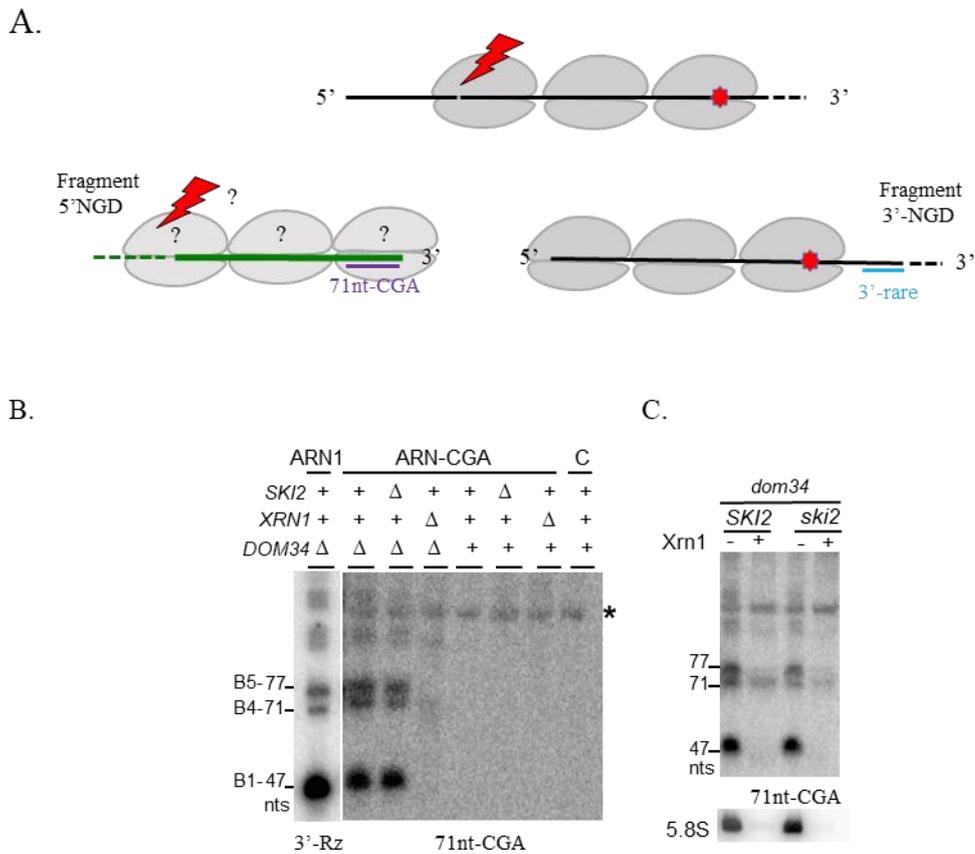


Figure 31 : Des ARN tronqués sont produits par le NGD à partir de l'ARN-CGA.

(A) Schéma explicatif du positionnement des sondes utilisées lors de l'étude du devenir du fragment 5'-NGD produit par le clivage endonucléolytique de l'ARN-CGA par le NGD. Les points d'interrogation représentent les potentiels ribosomes et le clivage endonucléolytique qui pourraient être associés au fragment 5'-NGD. (B) Des ARN totaux de différents mutants ont été séparés sur gel d'acrylamide 8% avant d'être révélés par northern avec la sonde 71nt-CGA (droite) en comparaison aux ARN présents avec l'ARN1 (gauche). (C) Les ARN totaux ont été traités (+) ou non (-) avec 1U de Xrn1 durant 30 minutes avant d'être séparés sur gel d'acrylamide 8% puis révélés avec la sonde 71nt-CGA. La mesure de la disparition de l'ARN 5.8S par Xrn1 permet de vérifier l'efficacité de Xrn1 *in vitro*.

Afin de conforter notre idée selon laquelle l'élimination de l'ARN 5'NGD-CGA fait intervenir des mécanismes similaires à ceux observés sur l'ARN1, nous avons voulu déterminer la nature chimique de l'extrémité 5' de l'ARN B4-like. Ainsi, nous avons étudié la résistance de cet ARN à l'activité de Xrn1. De manière identique à ce que nous avons observé pour

l'ARN1, dans le mutant *Δdom34*, les ARN B1-like et B5-like sont rapidement dégradés tandis que l'ARN B4-like présente une résistance à Xrn1 (Figure 31C). Nous en déduisons donc que l'ARN B4-like est produit avec une extrémité 5'-OH. Nous supposons que, à l'issue des événements menant à l'élimination de l'ARN1 par le NGD, l'ARN B4 est ensuite phosphorylé par Trl1 pour être ensuite dégradé par Xrn1 et Dxo1.

4.4 Dxo1 participe à la dégradation des ARN-CGA

Une étude récente avait proposé que des clivages endonucléolytiques détectables par transcription inverse pouvaient être observés au niveau du disome bloqué sur des codons rares (Ikeuchi *et al.*, 2019). À partir d'une construction similaire à celle utilisée dans cette étude (ARN-CGA₂), nous avons étudié par transcription inverse les différents fragments d'ARN qui pouvaient être produits par le NGD dans plusieurs contextes de mutation. Conformément à ce que nous observions avec l'ARN-CGA, nous avons constaté la présence d'ARN produits par l'arrêt de Xrn1 (X1) sur des ribosomes bloqués en cours de traduction sur l'ARN-CGA₂ (Figure 32A). Cette information nous a ensuite permis de déduire le positionnement des ribosomes bloqués sur cet ARN (Figure 32B).

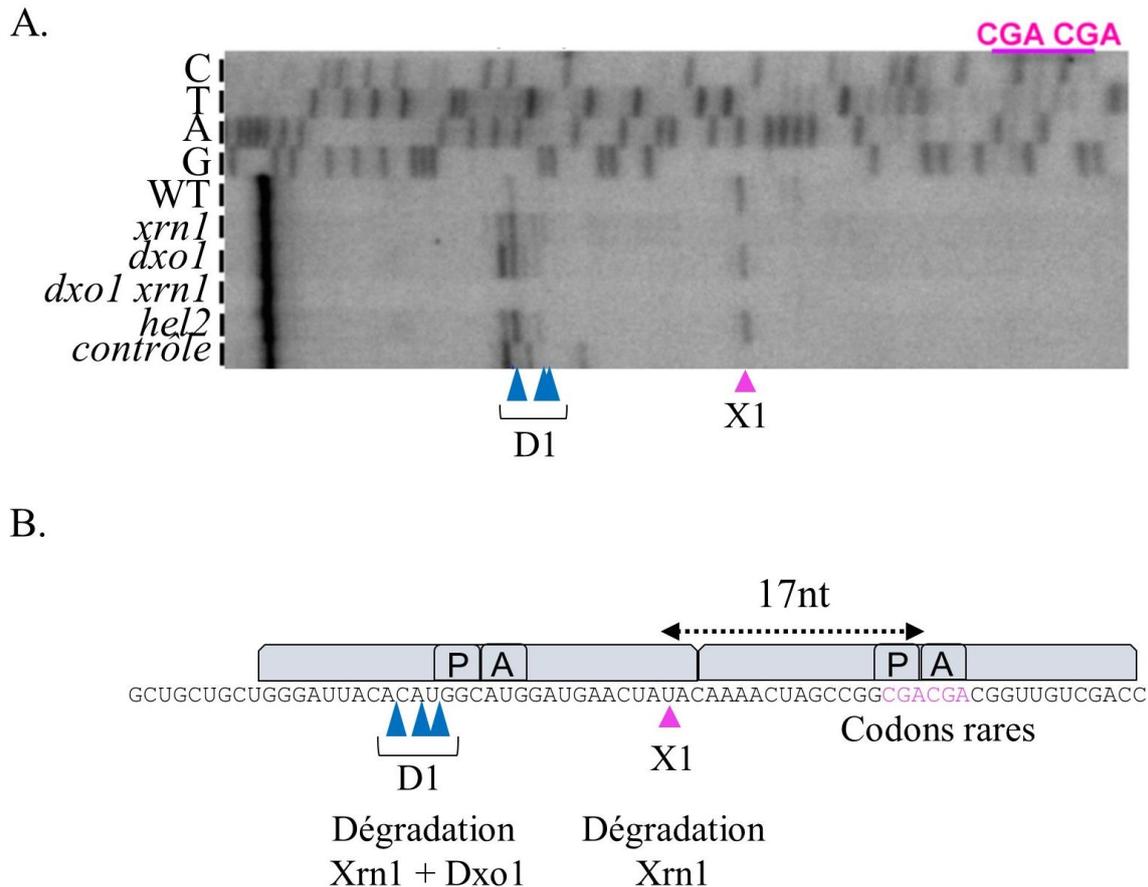


Figure 32 : Analyse d'un ARN contenant des codons rares par transcription inverse.

(A) Détection des extrémités 5' des ARN-CGA par extension d'amorce. Une même amorce située en 3' des codons rares est utilisée pour le séquençage ADN et l'extension. Les produits sont analysés sur un gel de polyacrylamide 5%. Les arrêts d'extension détectables en présence de Xrn1 sont indiqués par X1, ceux ne disparaissant que dans un contexte $\Delta dxo1 \Delta xrn1$ sont notés D1 (B) Représentation schématique des événements de clivage ayant lieu en X1 et D1. Les positionnements des sites A et P sont indiqués par les lettres A et P au sein de rectangles gris symbolisant les ribosomes.

Par ailleurs, nous avons remarqué l'existence d'autres clivages (D1) au niveau du deuxième ribosome bloqué sur l'ARN-CGA₂, à environ 35 nucléotides en amont des codons rares (Figure 32). La persistance de ces derniers dans le mutant $\Delta hel2$ laisse penser que leur origine n'est pas dépendante du clivage endonucléolytique que nous avons identifié à l'aide de l'ARN1 et l'ARN-CGA (Figure 32).

Compte tenu de l'importance de Dxo1 et Xrn1 dans la dégradation d'un ARN tronqué, nous avons voulu vérifier si la production des ARN clivés en D1, ne dépendait pas de l'action de ces exoribonucléases sur l'ARN-CGA₂. Alors que ces ARN étaient présents dans les simples

mutants $\Delta dxo1$ ou $\Delta xrn1$, nous avons constaté que leur production était totalement inhibée par la double mutation $\Delta xrn1/\Delta dxo1$ (Figure 32). Nous proposons donc que l'action conjointe des exoribonucléases Xrn1 et Dxo1 serait à l'origine de l'apparition des clivages en D1 lors de la dégradation de l'ARN-CGA₂. Cette information, en accord avec les données que nous avons obtenues par 3'-RACE, suggère donc qu'aucun clivage endoribonucléolytique n'a lieu au niveau des deux premiers ribosomes bloqués. De ce fait, il est envisageable que les clivages NGD^{RQC+} ne puissent en réalité que résulter d'attaques exoribonucléolytiques 5'-3'.

5 No-Go Decay mRNA cleavage in the ribosome exit tunnel produces 5'-OH ends phosphorylated by Trl1 (*Publication*)

Les données précédemment présentées ont fait l'objet d'une publication (Navickas, Chamois *et al.*, 2020).



ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13991-9>

OPEN

No-Go Decay mRNA cleavage in the ribosome exit tunnel produces 5'-OH ends phosphorylated by Trl1

Albertas Navickas ^{1,2}, Sébastien Chamois ^{1,2}, Rénette Saint-Fort¹, Julien Henri¹, Claire Torchet ¹ & Lionel Benard ^{1*}

The No-Go Decay (NGD) mRNA surveillance pathway degrades mRNAs containing stacks of stalled ribosomes. Although an endoribonuclease has been proposed to initiate cleavages upstream of the stall sequence, the production of two RNA fragments resulting from a unique cleavage has never been demonstrated. Here we use mRNAs expressing a 3'-ribozyme to produce truncated transcripts *in vivo* to mimic naturally occurring truncated mRNAs known to trigger NGD. This technique allows us to analyse endonucleolytic cleavage events at single-nucleotide resolution starting at the third collided ribosome, which we show to be Hel2-dependent. These cleavages map precisely in the mRNA exit tunnel of the ribosome, 8 nucleotides upstream of the first P-site residue and release 5'-hydroxylated RNA fragments requiring 5'-phosphorylation prior to digestion by the exoribonuclease Xrn1, or alternatively by Dxo1. Finally, we identify the RNA kinase Trl1, alias Rlg1, as an essential player in the degradation of NGD RNAs.

¹ Institut de Biologie Physico-Chimique, UMR8226, CNRS, Sorbonne Université, Laboratoire de Biologie moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, Paris, France.

² These authors contributed equally: Albertas Navickas, Sébastien Chamois. *email: lionel.benard@ibpc.fr

The No-Go Decay (NGD) mRNA surveillance pathway degrades mRNAs containing stalled ribosomes^{1,2}. NGD occurs when translation elongation is blocked by the presence of stable intramolecular or intermolecular RNA structures, enzymatic cleavage, chemically damaged sequences or rare codons^{1,3–8}. This mRNA degradation process is dependent on translation and involves an endoribonuclease that cleaves just upstream of the stall sequence^{1,5,6,9}. Other mRNA surveillance pathways can also ultimately lead to NGD. For instance, transcripts synthesized without a stop codon due to premature polyadenylation have stalled ribosomes that are initially detected by the non-stop decay (NSD) pathway^{9,10}. NSD-targeted mRNAs are cleaved by an uncharacterized mechanism and become targets of NGD when ribosomes reach the new 3'-end and stall^{9,11,12}. NGD thus plays a key role in resolving translational issues potentially detrimental to cellular homeostasis. When mRNAs are truncated, the stalled ribosomes are rescued in a process mediated by the Dom34/Hbs1 complex that dissociates the ribosomal subunits⁵. Their association with the 60S subunit is recognized by the ribosome quality control (RQC) pathway, leading to the rapid degradation of the nascent peptide^{13–15}. However, despite extensive study, the precise location of NGD cleavage and the mechanism of degradation of the resulting RNA fragment remain elusive.

In this paper, we focus on the fate of NGD-cleaved mRNAs, with an initial goal of mapping the sites of mRNA cleavage with accuracy. Two major obstacles to achieving this objective are that NGD fragments are rapidly attacked by 5'-3' and 3'-5' exoribonucleases after ribosome dissociation⁵ and that simultaneously blocking the 5'-3' and 3'-5' exoribonuclease decay pathways is synthetically lethal¹⁶. It has been shown, however, that the stability of such mRNAs is largely dependent on the Dom34/Hbs1 complex^{5,17}. In *dom34* mutant cells, ribosomes stalled at the 3'-end of truncated mRNAs inhibit the degradation by the exosome and facilitate the detection of sequential endonucleolytic cleavages upstream of the ribosomal stall site⁵. Interestingly, *dom34* and *xrn1* mutations (inactivating the main 5'-3' exonucleolytic degradation pathway) are not synthetic lethal¹. Moreover, NGD endonucleolytic cleavages still occur in the absence of Dom34^{2,3}. The limited 3'-5' degradation of specific mRNA targets (in the absence of Dom34) combined with 5'-3' exoribonuclease mutants thus allows an accumulation of RNA fragments resulting from endonucleolytic cleavages whose extremities can be mapped accurately. We have created truncated mRNAs in vivo by insertion of a hammerhead ribozyme sequence (Rz)¹⁸ known to generate NGD-targeted mRNAs⁵. This construction mimics chemically or enzymatically cleaved mRNAs, or those resulting from abortively spliced mRNAs that are processed by the NGD pathway^{5,9,19}. As anticipated, these designed truncated 3'-ends block ribosomes at determined positions and, because ribosomes guide NGD mRNA cleavages^{5,20}, we were able to detect 3'-NGD RNA fragments of specific sizes. By analysing these RNAs in detail, we show the importance of the 5'-3' exoribonuclease Xrn1 in the production of 3'-NGD fragments. We also perfectly match a 3'-NGD cleavage product with a 5'-NGD cleavage fragment in the region of the third stalled ribosome. We have mapped this site and show that a unique endonucleolytic cleavage occurs eight nucleotides (nts) upstream of the first P-site nt within the third stacked ribosome. The two leading ribosomes are apparently not competent for this cleavage. We demonstrate that this 3'-NGD RNA has a hydroxylated 5'-extremity and show that 5'-phosphorylation by the Trl1 kinase²¹ is required to allow degradation by 5'-3' exoribonucleases. Interestingly, in the absence of Xrn1, the alternative 5'-3' exoribonuclease Dxo1 takes over²². We additionally analysed mRNAs containing rare codons and demonstrate that at least three stacked ribosomes are also

required for endonucleolytic cleavage of these mRNAs. We show that 5' ends observed in regions covered by disomes are the result of 5'-3' trimming by Dxo1.

Results

Mapping the 5'-ends of 3'-NGD RNA fragments. To generate 3'-truncated mRNA substrates for NGD in vivo, we inserted a hammerhead ribozyme sequence¹⁸ in the 3'-sequence of the *URA3* gene ORF (mRNA1Rz). This results in the production of an mRNA that lacks a stop codon and a polyadenylated tail, called mRNA1 in Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a, and that is known to be an NGD target⁵. We first verified that we could detect NGD cleavages in the 3'-proximal region of mRNA1, by northern blotting with a probe corresponding to the 3'-end (probe prA, Fig. 1a and Supplementary Fig. 1a). The upstream and downstream cleavage products are referred to as 5'-NGD and 3'-NGD RNAs, respectively (Fig. 1a). We indeed detected a ladder of 3'-NGD RNA fragments in *dom34* mutant cells (Fig. 1b), in the presence or absence of active 5'-3' or 3'-5' exonucleolytic decay pathways, i.e. *xrn1* or *ski2* mutations, respectively²³. In agreement with the current NGD model in which endonucleolytically cleaved 3'-NGD fragments are primarily degraded by the 5'-3' exoribonuclease Xrn1⁵, inactivation of the 5'-3' RNA decay pathway (*xrn1* mutant cells) produced a different ladder of 3'-NGD RNAs compared to WT or the *ski2* mutant. This was confirmed by a higher resolution PAGE analysis followed by northern blotting (Fig. 1c). The PAGE analysis was completed by mapping the 5'-ends of the 3'-NGD RNA fragments in the *dom34* and *dom34/xrn1* mutants by primer extension experiments with prA (Fig. 1d). We showed that the truncated mRNAs produce several discrete 3'-NGD RNA bands (B1–B5) that can be mapped to single-nucleotide resolution. B5 (77 nts) and the major RNA species B1 (47 nts) visible in the *dom34* mutant were not detected in the absence of the 5'-3' exoribonuclease Xrn1 (Fig. 1b–d). B3 (68 nts) and B2 (65 nts) RNAs were exclusively observed in the *xrn1* mutant cells, and B4 (71 nts) was detected in all four strains (Fig. 1c). In addition, we analysed a *dcp2Δ* decapping mutant that totally blocks 5'-3' exoribonucleolytic attacks on the 5'-end of mRNAs (Fig. 1b, c)^{23,24}. The particularly strong growth defect of the *dcp2Δ* mutant may explain the decrease in the amount of NGD RNA detected but, interestingly, the fact that NGD RNAs remained detectable (Fig. 1c) suggests that an alternative pathway bypasses mRNA decapping for their production.

The sizes of the major B1 and B5 RNAs differ by 30 nts (Fig. 1d), consistent with the length of mRNA covered by an individual ribosome²⁵. We therefore surmised that the difference in size is most likely due to the presence of an extra ribosome protecting the B5 RNA species from 5'-3' degradation by Xrn1, compared to B1²⁶. This prompted us to analyse the association of these 3'-NGD RNAs with ribosomes in sucrose gradients.

Ribosome association with 3'-NGD RNA fragments. We performed polysome analyses to assess the distribution of 3'-NGD RNAs in different ribosomal fractions in *dom34* mutant cells (Fig. 1e, f). The B1 RNA (47 nts) was found to associate with monosomes (fractions 11–13) and disomes (fraction 15), with disomes being the theoretical maximal coverage of such a short RNA, as proposed by Guydosh et al. and Simms et al.^{9,20,27}. Indeed, the association of a 47-nt RNA species with disomes has been deduced from ribosome-profiling experiments²⁰ and is explained by the approximate size of the trailing ribosome protecting a full ribosome footprint (28–30 nt) and the leading ribosome protecting a half footprint to the site of mRNA truncation (16–17 nts, with no RNA or an incomplete codon in the A-site). An additional ribosome would thus be expected to protect a

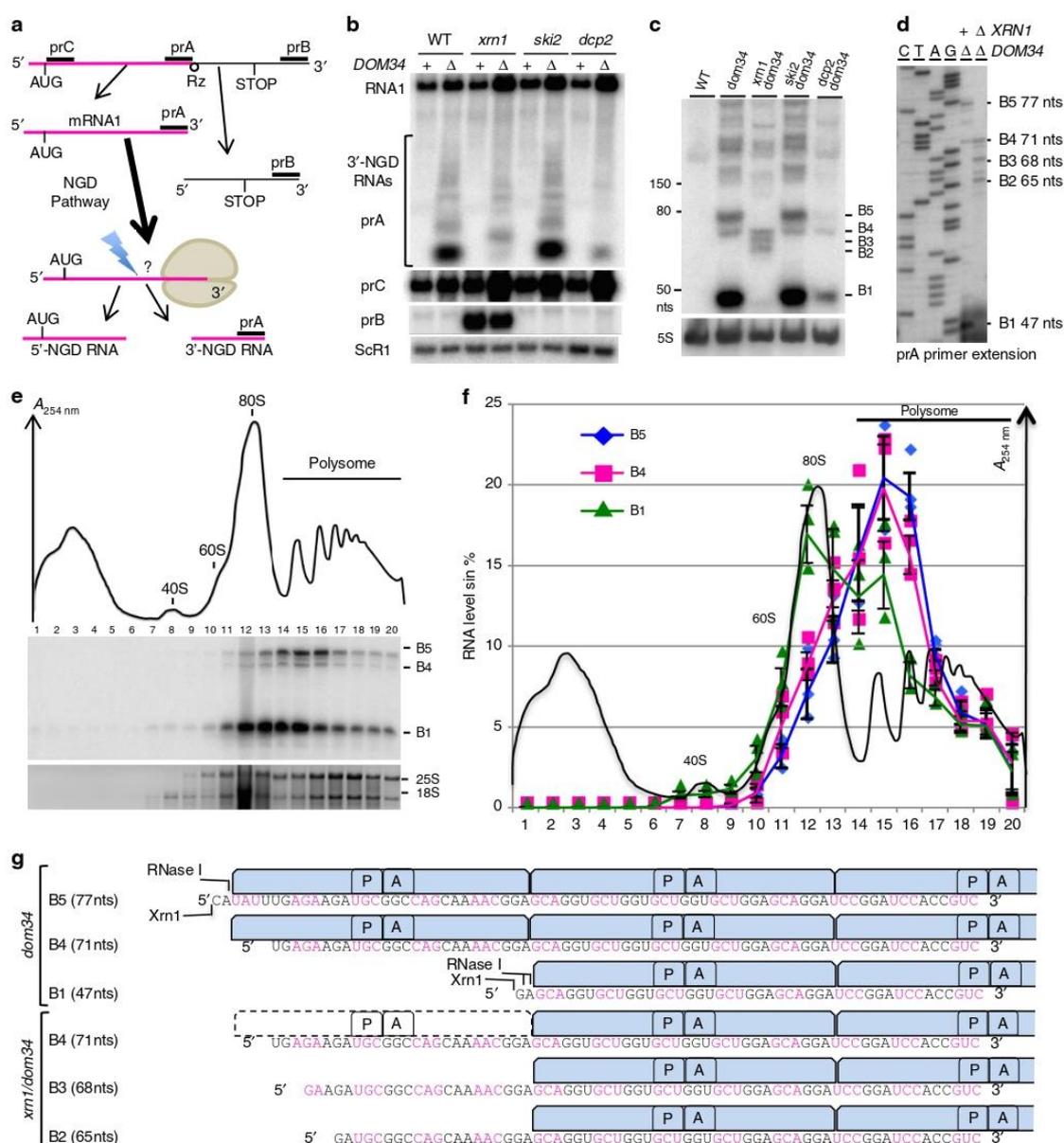


Fig. 1 Size characterization of 3'-NGD RNA fragments and ribosomal association. **a** Schematic view of the URA3Rz mRNA showing the ribozyme (Rz) site (see also Supplementary Fig. 1a). Translational start (AUG) and stop codons are indicated. RNA1 (in magenta) is the stop-codon-less mRNA following ribozyme cleavage. Probes prA, prB and prC used in northern blots analysis are indicated. 5' and 3'-NGD RNAs are the products of NGD cleavage of mRNA1. The lightning flash represents the NGD endonucleolytic cleavage and probe prA is designed for the detection of all potential 3'-NGD RNAs (see also Supplementary Fig. 1a). **b** Agarose gel electrophoresis followed by northern blot showing levels of mRNA1 and 3'-NGD RNA fragments in the indicated strains. The ScR1 RNA served as a loading control. **c** Analysis similar to **b** using 8% PAGE. The 5S rRNA served as a loading control. **d** Primer extension experiments using probe prA to determine the 5'-end of 3'-NGD RNAs. B1, B2, B3, B4 and B5 RNAs shown in **c** are indicated with the corresponding size in nucleotides (nts) calculated by primer extension. **e** Analysis of 3'-NGD RNA association with ribosomes in *dom34* mutant cells. Upper, on ribosome profile, positions of 40S and 60S subunits, 80S and polysome are indicated. Panel below, 20 fractions were collected and extracted RNAs were analysed similarly to **c**. Bottom panel: 18S and 25S rRNAs are shown as references for ribosome and polysome sedimentation, using 1% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. **f** Distribution of the 3'-NGD RNAs analysed in **e**. For each fraction, levels of B1, B4 and B5 RNAs were plotted as a % of total amount of B1, B4 and B5 RNAs, respectively. The profile in **e** is reported in **f**. **g** Schematic view of the ribosome positioning on 3'-NGD RNAs combining information on size resolution, ribosomal association (Fig. 1), and RNase ribosomal protection of 3'-NGD RNAs (Supplementary Fig. 1). Codons are shown in black or magenta. A and P are ribosome A- and P-sites, respectively. Error bars indicate standard deviation (s.d.) calculated from three independent experiments. Source data are provided as a Source Data file.

~77-nt RNA. Accordingly, the B5 RNA (77 nts) was found to associate with two and three ribosomes, in fractions 15 and 16, respectively. The 71-nt B4 RNA was also associated with the disome and trisome peaks (Fig. 1e, f). We suspect that ribosomes do not stay stably bound to the different RNA species during sucrose gradient analysis, but this experiment allows us to propose that two ribosomes maximally associate with B1, while up to three can associate with B4 and B5 in vivo. This also prompted us to determine how these 3'-NGD RNAs were protected from Xrn1 and RNase I activities in cell extracts prior to centrifugation on sucrose cushions (Supplementary Fig. 1). These complementary experiments show that ribosomes persist and protect these RNA species from RNases in vitro and support results presented above (Supplementary Notes 1 and 2 and Supplementary Fig. 1b–i).

The results in Fig. 1 and Supplementary Fig. 1 allow us to infer the precise positions of ribosomes on B5 and B4 RNA species in the *dom34* mutant backgrounds. Our experiments all converge to the conclusion that the B5 species corresponds to RNAs covered by trisomes (Fig. 1g). We also conclude that three ribosomes cover the 71-nt B4 RNA in *dom34* mutant cell extracts as this species is resistant to Xrn1 (Supplementary Note 1), its 5'-region is protected from RNase I digestion in vitro (Supplementary Note 2) and a significant proportion remains associated with fractions corresponding to three ribosomes in sucrose gradients (Fig. 1e, f).

Dxo1 trimming of 3'-NGD fragments in Xrn1-deficient cells.

We strongly suspected that the B4 species was the original NGD product, and because B3 and B2 RNAs were exclusively detected in Xrn1-deficient cells, we speculated that these RNAs might be derived from B4 by an alternative 5'-3' exoribonuclease. We therefore asked whether the 5'-3' exoribonucleolytic activity of Dxo1, which plays an important role in 5'-end capping quality control²², might explain the presence of the B3 and B2 RNAs. Remarkably, deletion of both *XRN1* and *DXO1* genes in a *dom34* background completely abolished the production of the B3 and B2 RNAs, and only the B4 3'-NGD species remained detectable by northern blot analysis (Fig. 2a) or in primer extension assays (Supplementary Fig. 2a). Complementation of the *dom34/xrn1/*

dxo1 mutant with wild-type Dxo1 restored B3 and B2 RNA production to a significant extent, but a catalytic mutant failed to do so (Fig. 2b). We took advantage of the almost exclusive presence of the B4 3'-NGD RNAs in *dom34/xrn1/dxo1* mutant cells to ask how this RNA is protected by ribosomes by adding Xrn1 to cell extracts as described above (Supplementary Fig. 1b). Some of the B4 RNA was Xrn1-resistant (Supplementary Fig. 2b) in accordance with our hypothesis that a portion of this species is protected by three ribosomes in *xrn1/dom34* cell extracts (Fig. 1g). Interestingly, the decrease in the amount of B4 RNA was correlated with an almost equivalent increase of a 47-nt species (Supplementary Fig. 2b, c), suggesting that disomes persist on the majority of the 3'-ends of B4 RNAs in *dom34/xrn1/dxo1* cells in vivo. We thus propose that two populations of B4 RNAs co-exist in Xrn1-deficient cells in vivo, with one population covered by three ribosomes, especially in *dom34* mutants, and the other only covered by two ribosomes, but having a 5'-protuding RNA extremity due to the absence of 5'-3' exoribonucleases.

Mapping of the primary NGD endonucleolytic cleavage site.

The results described above suggest that the principal band detected in the absence of Xrn1 and Dxo1 (B4 RNA) is a specific 3'-product of NGD cleavage in our constructs (Fig. 2a). While B4 RNA resistance to Xrn1 in vitro (Supplementary Fig. 1b) could be explained by a third ribosome dwelling after cleavage, we also considered the possibility that its 5'-phosphorylation state could contribute to its stability, since both Xrn1 and Dxo1 require 5'-phosphorylated extremities to degrade RNA^{22,28}. We therefore asked whether the B4 RNA naturally has a monophosphate (5'-P) or a hydroxyl group (5'-OH) at its 5'-end by treating RNA purified from *dom34* cell extracts with T4 polynucleotide kinase to see whether this would stimulate attack of B4 by Xrn1 in vitro. Remarkably, the B4 RNA was completely degraded by Xrn1 only after 5'-phosphorylation by T4 kinase in vitro (Fig. 3a), demonstrating that the B4 RNA has a 5'-OH extremity in *dom34* cells. A portion of the abundant B1 RNA persisted during Xrn1 treatment in kinase buffer (Fig. 3a, and see the “Methods” section), but parallel Xrn1 digestion in optimal buffer confirms that B1 and B5 RNAs were totally digested (i.e., are fully mono-phosphorylated), while the B4 RNA remained resistant (Supplementary Fig. 3a). It has recently been demonstrated that the Hel2 ubiquitin-protein ligase is crucial for the activation of NGD cleavages²⁹. Consistent with our hypothesis that the B4 species corresponds to the 3' NGD cleavage product, this RNA is no longer produced in the *hel2* mutant (Supplementary Fig. 3b).

By definition endonucleolytic cleavage of RNA results in the production of 5' and 3'-RNA fragments. However, corresponding 5' and 3' fragments have never been definitively demonstrated in the case of NGD-targeted mRNAs. We thus searched for the corresponding 5'-NGD fragment for the B4 3'-NGD RNA. To map the 3'-end of 5'-NGD RNAs, total RNA preparations from *ski2* and *ski2/dom34* mutants were ligated to a pre-adenylated oligonucleotide linker using truncated RNA ligase to perform 3'-RACE (Fig. 3b)^{30,31}. The *ski2* mutant context was used to limit 3'-trimming of these RNAs in vivo, and RNAs were pre-treated with T4 polynucleotide kinase to modify 3' phosphates or 2'-3' cyclic phosphates to 3'-OH to permit RNA ligation³¹. The major RT-PCR product was of the expected size (66 bp; Fig. 3c and Supplementary Fig. 3c) and verified by sequencing the resulting clones (Fig. 3d). The identification of a matching 5'-NGD fragment for the B4 3'-NGD RNA, confirms that an endonucleolytic event occurred at this precise position. The same procedure performed on RNAs isolated from *ski2* mutants where Dom34 was still active yielded the same major PCR product, also verified by sequencing (Supplementary Fig. 3d). Thus, while the

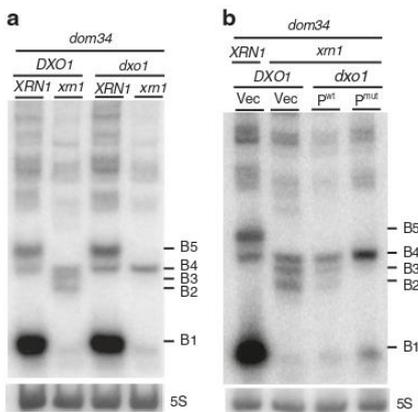


Fig. 2 Dxo1 creates the heterogeneity of 3'-NGD RNA fragments in Xrn1-deficient cells. 8% PAGE followed by northern blot analysis using probe prA showing steady-state levels of RNAs in *dom34* and other indicated mutant strains. The 5S rRNA served as a loading control. **a** Impact of *DXO1* deletion on B2 and B3 RNA production. **b** Plasmid expression of wild-type Dxo1 (*P^{wt}*) or a Dxo1 catalytic mutant (*P^{mut}*) (mutant E260A/D262A)²². The vector control is plasmid pRS313 (Vec). Source data are provided as a Source Data file.

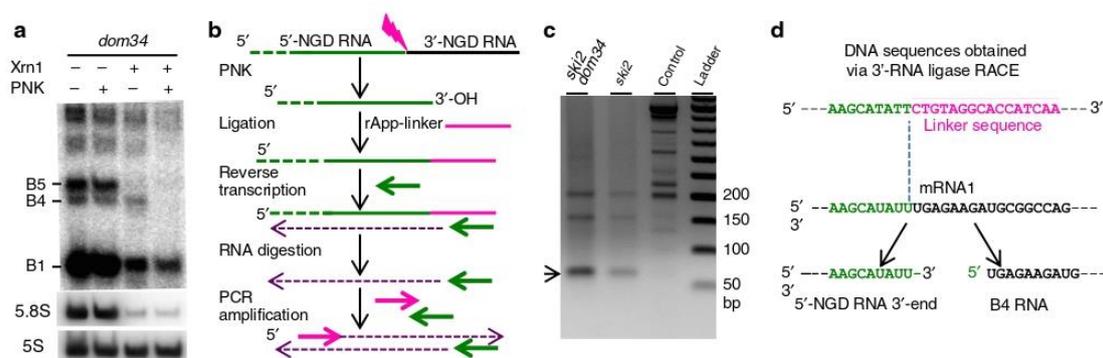


Fig. 3 Characterization of the endonucleolytic RNA fragments. **a** Xrn1 digestion of total RNA extracts from *dom34* mutant cells in the presence or absence of polynucleotide kinase (PNK) in vitro. 8% PAGE followed by northern blot analysis using probe prA. The 5S rRNA served as a loading control and 5.8S rRNA as a positive control of Xrn1 treatment. **b** Flow chart illustrating the method used for 3'-RACE as described in ref. ³¹ with minor modifications according to McGlincy and Ingolia³⁰ (see the Methods section). **c** PCR products obtained from 3'-RACE and separated on a 2% agarose gel. Purified DNAs for sequencing are indicated by an arrowhead. Prior to PCR, cDNAs were produced from total RNA from *ski2*, *ski2/dom34* mutant cells expressing mRNA1. Control is made of total RNA from *ski2/dom34* mutant cells without mRNA1 expression. **d** Sequences obtained after 3'-RACE performed on *ski2* and *ski2/dom34* total RNA. 100% of sequenced clones (omitting a residual 5S rRNA-linker amplification detected) have this DNA sequence. 5'-NGD DNA sequence (in green) and linker sequence (in magenta). Below, the site of mRNA1 is shown before and after the cleavage producing the 3'-NGD RNA B4 and the 3'-extremity of the 5'-NGD RNA confirmed by 3'-RACE. Source data are provided as a Source Data file.

dom34 mutation facilitates the detection of NGD fragments by increasing their stability, the cleavage event itself is Dom34-independent.

The fate of 5'-NGD RNAs. We anticipated that following NGD cleavage of mRNA1, ribosomes that had initiated translation on the 5'-NGD fragments would advance to the new 3'-end and the RNA be subjected to Xrn1 trimming, similar to the process that generates B1 and B5 (Fig. 4a). Since the B4 3'-NGD RNAs were cut in the +1 reading frame (Fig. 1g), upstream ribosomes on these 5'-NGD RNAs would be expected to stall with one nucleotide in ribosome A-site (Fig. 4a and Supplementary Fig. 4) and as result produce new RNA fragments 47 + 1, 77 + 1 nts, protected by two or three ribosomes, respectively (see Supplementary Fig. 4). Indeed, in northern blots using probe prG, which is complementary to the new 3'-ends generated by NGD cleavage, we detected RNA fragments consistent with a 1-nt increase in size compared to those detected by prA on the same membrane (Fig. 4b). We mapped the 5'-ends of these new ribosome protected fragments by primer extension assays using prG (Fig. 4c and Supplementary Fig. 4). The detection of 48-nt (and 78-nt) cDNAs only in cells containing active Xrn1 (Fig. 4c) strongly suggests that the new NGD endonucleolytic products are covered by two and three ribosomes, respectively. The production of cDNAs of exactly the predicted sizes (48 and 78 nts) is an independent confirmation that the 3'-extremity of the 5'-NGD product corresponds precisely to the proposed NGD endonucleolytic cleavage site (Supplementary Fig. 4). Remarkably, the 3'-extremity of the 5'-NGD RNA was detected in the context of active 3'-5' exonucleases, meaning that ribosomes run on and cover the 3'-extremity before any 3'-5' attacks can occur. In summary, we propose that the B4 RNA is produced by endonucleolytic cleavage within the footprint of the third stalled ribosome and that at least two upstream ribosomes promptly protect the resulting 5'-NGD fragment from degradation by 3'-5' exonucleases (Fig. 4d).

The 5'-OH endocleaved product is phosphorylated by Trl1. Despite the fact that a portion of the B4 species was found to be 5'-hydroxylated in *dom34* cell extracts (Fig. 3a), a major fraction

of the B4 RNA from *dom34/xrn1* and *dom34/xrn1/dxo1* cell extracts can be degraded by Xrn1 in vitro without prior 5'-phosphorylation (Supplementary Figs. 1b and 2b), suggesting that B4 accumulates as a 5'-phosphorylated species in this mutant background. A well-characterized factor with RNA kinase activity in yeast is the essential tRNA ligase Trl1^{21,32}. Splicing of tRNAs is known to generate 5'-OH-intron RNAs which require Trl1 kinase activity to permit their degradation by Xrn1. We therefore asked whether the 3'-NGD B4 RNA fragments were substrates of Trl1. Since *TRL1* is an essential gene, we used *trl1Δ* strains expressing pre-spliced intron-less versions of the 10 intron-containing tRNAs that restore viability^{33,34}. If Trl1 were required for B4 degradation, loss of Trl1 function should increase the amount of B4 RNA. Remarkably, in *trl1* versus *TRL1* cells, we observed a 24-fold accumulation of the B4 RNA species and only a two-fold-decrease of B1 RNA levels, while the B5 RNA was barely detectable (Fig. 5a, b). We asked whether the accumulated B4 RNA had a hydroxyl group (5'-OH) at its 5'-end. RNAs were analysed by 12% PAGE allowing separation of 5'-hydroxylated from 5'-phosphorylated RNAs²¹. B4 RNA migrated as two bands in *TRL1* cells, whereas only the lower band was detected in *trl1Δ* cells. This species was fully shifted to the upper band after 5'-phosphorylation of RNA in vitro (Fig. 5c). We also verified that the B4 RNA was resistant to Xrn1 treatment in vitro. In contrast to B1 and B5 RNAs (Supplementary Fig. 5), B4 was completely degraded by Xrn1 only after 5'-phosphorylation by T4 kinase in vitro (Fig. 5d). We conclude that the B4 RNA accumulates as a fully 5'-OH species in the *trl1Δ* mutant. Thus, Trl1 is the major kinase involved in phosphorylating the B4 RNA following NGD cleavage.

NGD cleavage products derived from mRNAs containing rare codons. We asked whether we could identify endonucleolytic cleavages on another NGD-targeted mRNAs, using what we learned about this process on truncated mRNAs. We chose an mRNA containing four contiguous rare CGA codons, which we call (CGA)₄-mRNA, as an NGD target (Fig. 6a and Supplementary Fig. 6a)⁵. Similar to the truncated mRNAs, ribosomes were shown to stall when decoding rare codons, producing 5'- and 3'-NGD RNAs (Fig. 6a). As previously demonstrated^{5,35},

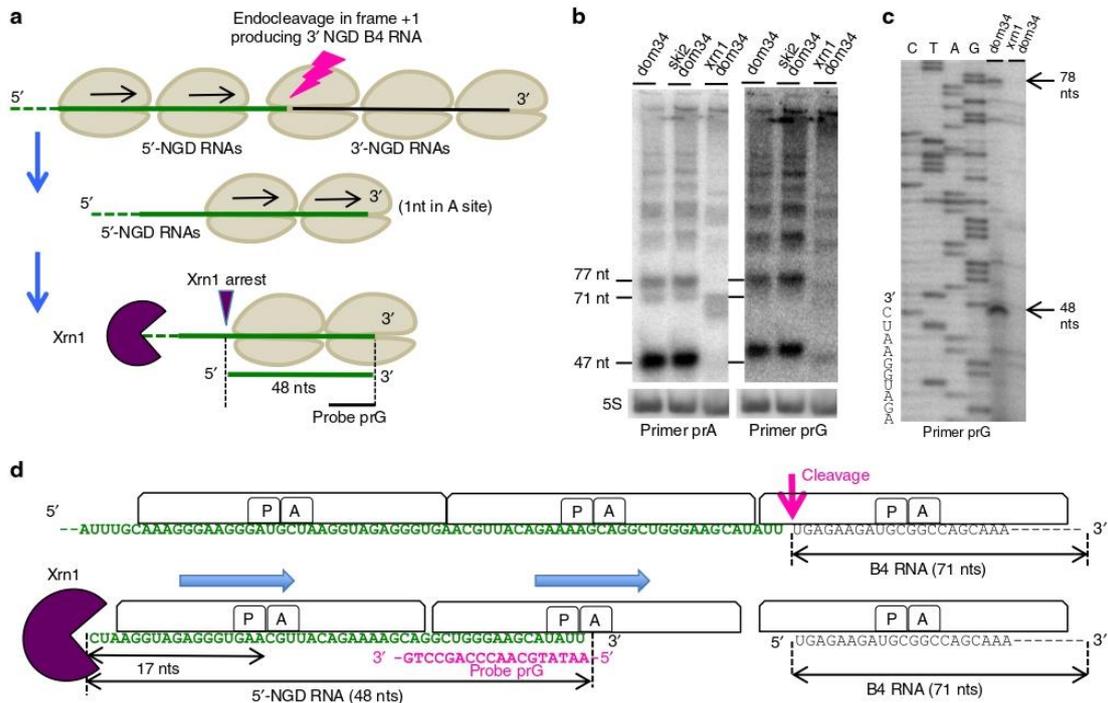


Fig. 4 Analysis of the fate of 5'-NGD RNAs. **a** Schematic model of mRNA1 before and after the endonucleolytic cleavages producing B4 RNAs. 5'-NGD resulting RNAs are shown here covered by two ribosomes and processed by Xrn1 to 48-nt RNAs (see also Supplementary Fig. 4 for 5'-NGD RNAs covered by three ribosomes). **b** 8% PAGE followed by northern blot analysis using probe prG showing steady-state levels of RNAs in the indicated mutant strains (left panel). Same membrane has been probed with prA as a ladder (right panel), and sizes of B5 (77nt), B4 (71 nt) and B1 (47nt) are indicated. The 5S rRNA served as a loading control. **c** Primer extension experiments using probe prG to determine the 5'-end of RNAs (see also Supplementary Fig. 5). **d** Schematic model of ribosome positioning on mRNA1 before and after the unique endonucleolytic cleavage producing B4 RNAs, localized 8 nts upstream of the first P-site nt. The position of disomes on the resulting 48-nt 5'-NGD RNA is shown with the distal ribosome having 1 nt in the A site (see also Supplementary Fig. 4). Source data are provided as a Source Data file.

we detected 3'-NGD RNAs fragments in *dom34* or *DOM34* genetic contexts by northern blotting experiments using probe prB (Supplementary Fig. 6b). The precise identification of endonucleolytic cleavages by primer extension experiments is known to be challenging⁵ probably because, in contrast to truncated mRNAs, the positioning of ribosomes on contiguous rare codons is variable. We first asked whether we could detect 5'-NGD RNAs (Fig. 6a) using the same procedure as for NGD-targeted truncated RNAs (Fig. 4a, b). By probing the (CGA)₄-mRNA in a large region upstream of the four CGA codons (Supplementary Fig. 6a), we detected RNA bands using a probe annealing 71 nts upstream of the first rare codon (probe prH, Fig. 6b and Supplementary Fig. 6a). Similar to the 5'-NGD RNAs produced from NGD-targeted mRNA1 (Fig. 4b), RNA detection required a *dom34* genetic background (Fig. 6b). The profile of the 5'-NGD RNAs resulting from endonucleolytic cleavages of (CGA)₄-mRNA was remarkably similar to the B1, B4 and B5 RNAs from the truncated mRNA1. We then treated these RNAs with Xrn1 and, as anticipated, we observed that the ~71-nt RNA, like the B4 RNA, was Xrn1-resistant, and that ~47-nt and ~77-nt RNAs, like the B1 and B5 RNAs, were Xrn1-sensitive (Fig. 6c). These results strongly suggest that NGD-targeted (CGA)₄-mRNAs are a similar source of truncated RNAs which are, in turn, processed like mRNA1 by the NGD pathway.

The detection of short RNA species by prH probe suggested that endonucleolytic cleavages occurred just downstream, in a region located ~70 nts upstream of the cluster of rare codons (Supplementary Fig. 6a). We thus set out to map the NGD cleavage sites on the (CGA)₄-mRNA, using 3'-RACE for the detection of the 3'-ends of 5'-NGD RNAs in *ski2* and *ski2/dom34* mutant cells (Supplementary Fig. 6c). We obtained major RT-PCR products of about 45 bp that were purified, cloned and sequenced (Fig. 6d and Supplementary Fig. 6d). The 3'-end sequences (Fig. 6e) formed three clusters, C1, C2 and C3 (Fig. 6g), that map to ~71 nts upstream of the second, third and fourth rare codon, respectively, consistent with cleavage within the footprint of the third ribosome as seen for the truncated mRNA1. No 3'-ends were detected within the region covered by two ribosomes, comforting the notion that disomes are not competent for NGD endonuclease activation. Xrn1 arrests mapping to 17–18 nts upstream of the A-site of the two first ribosomes positioned with either the second or third CGA codon in the A-site were also detected by primer extension assay (Fig. 6f–h). The strongest Xrn1 arrests corresponded to those where the lead ribosome contains the third CGA codon in the A-site (Fig. 6h), suggesting that the major stall occurs on this codon. Typically, Xrn1 is preferentially blocked 17 nts upstream of the first ribosomal A-site residue²⁶. We speculate that this 1-nt difference reveals distinct conformations of stalled ribosomes on rare codons versus

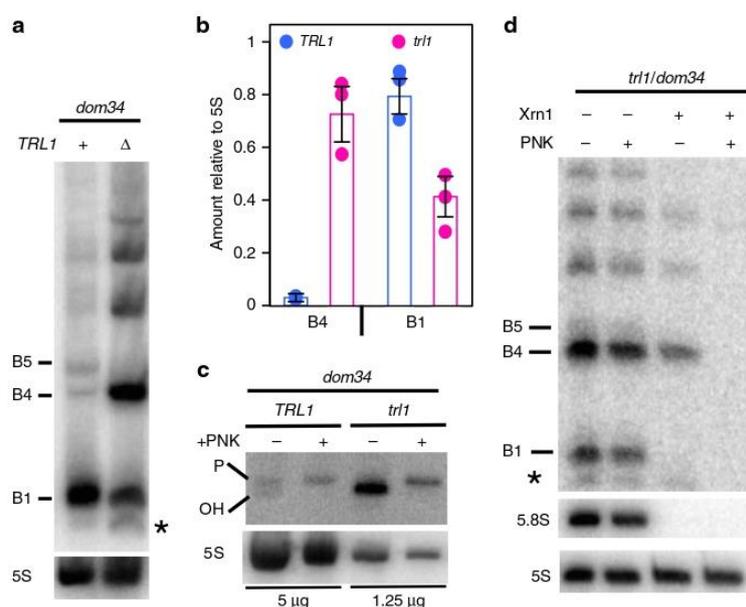


Fig. 5 Endonucleolytically cleaved 5'-OH RNAs are phosphorylated by Trl1. **a** 8% PAGE followed by northern blot analysis using probe prA. Levels of 3'-NGD RNA fragments in *trl1/dom34* cells compared with those from *TRL1/dom34* cells. **b** B1 and B4 RNA quantification relative to 5S rRNA from three independent experiments as shown in **a**. **c** 12% PAGE followed by northern blot analysis using probe prA. Treatment using T4 PNK to determine 5'-OH and 5'-P B4 RNA positions in the indicated strains. One-fourth of *trl1/dom34* total RNA treated was loaded to limit scan saturation and allow *TRL1/dom34* B4 RNA detection. The 5S rRNA served as a loading control. **d** As in Fig. 3a, Xrn1 digestion of total RNA extracts from *trl1/dom34* mutant cells in the presence or absence of T4 PNK treatment in vitro. A minor band detected in *trl1* is indicated by an asterisk (see also Supplementary Fig. 5 in which this band is detectable in *TRL1* cells). Error bars indicate standard deviation (s.d.) calculated from three independent experiments. Source data are provided as a Source Data file.

truncated mRNAs. All these results taken together suggest that the (CGA)₄-mRNA and truncated mRNA1 are NGD-targeted in a highly similar process that results in cleavage within the footprint of the third ribosome, 71 nts upstream of the stall site for the leading ribosome.

Cleavages have been proposed by others to occur in the region covered by disomes using primer extension experiments^{5,29}. We thus analysed an mRNA containing rare codons with an identical ribosome stalling sequence to that previously examined⁵ (Supplementary Fig. 6e). We demonstrate that primer extension arrests detected in the region covered by disomes are abolished in *dxo1/xrn1* mutant cells, suggesting that they are the products of subsequent trimming by these enzymes. In conclusion, our data suggests that stalled disomes on truncated mRNAs or on mRNAs containing short CGA repeats are poorly competent for NGD endonucleolytic cleavages. Endonucleolytic cleavages instead occur upstream of collided disomes, in agreement with other 3'-RACE analyses²⁷. Our data suggests that these cleavages first occur within the mRNA exit tunnel of the third stacked ribosome and those queuing further upstream.

Discussion

In this study, we first characterized the 3'-NGD RNA fragments produced near the 3'-end of truncated mRNAs that mimic natural cleaved mRNAs known to be NGD targets. One advantage of studying the 3'-NGD products of truncated mRNAs is that the precise positioning of stalled ribosomes results in 3'-NGD RNA fragments of specific sizes. Indeed, the precise identification of endonucleolytic cleavages is known to be challenging for mRNAs containing rare codons^{5,29} because the positioning of ribosomes on multiple contiguous rare codons is variable. Using a ribozyme

to efficiently generate precise 3'-ends within an open-reading frame, we were able to obtain detailed information about ribosome positioning on 3'-NGD RNAs, and provide the first precise mapping of the original site of endonucleolytic cleavage on an NGD substrate. Our model suggests that this cleavage occurs 71 nts from the 3' end of the truncated mRNA, 8 nts upstream of the P-site codon in the third stacked ribosome (Figs. 1g and 7). This localizes the 5'-extremity of cleaved RNA fragment within the mRNA exit tunnel, 4 nts downstream of the expected nucleotide position of a canonical mRNA that emerges from the ribosome and becomes available for cleavage by RNase I in vitro, classically used in ribosome foot-printing studies. A buried cleavage site is consistent with the idea that the NGD endonuclease might be the ribosome itself. However, we cannot fully exclude the possibility that the stalled ribosome allows access to an external nuclease with a specific conformation to penetrate this far into the mRNA exit tunnel.

Xrn1 treatment of various mutant cell extracts suggested that the predominant ribosome configuration on truncated mRNAs is disomes. Interestingly, the existence of disomes on truncated mRNAs has been previously reported in ribosome-profiling analysis²⁰ and stacking of two or more ribosomes has been proposed as a prerequisite for the activation of the endonuclease²⁷. The latter observation led to the proposition that ribosome collision triggers NGD cleavage upstream of disomes. Our data suggests that NGD endonucleolytic cleavage detected within the third stalled ribosome, suggests that the first two stalled ribosomes (disome) are not competent for the activation of the endonuclease activity (Fig. 7). Our 3'-RACE experiments did not amplify DNA products corresponding to RNAs matching the predicted sizes of NGD-cleaved RNAs within the second (41 nts) or first stalled ribosome (15 nts) (predicted sizes 95 and 125

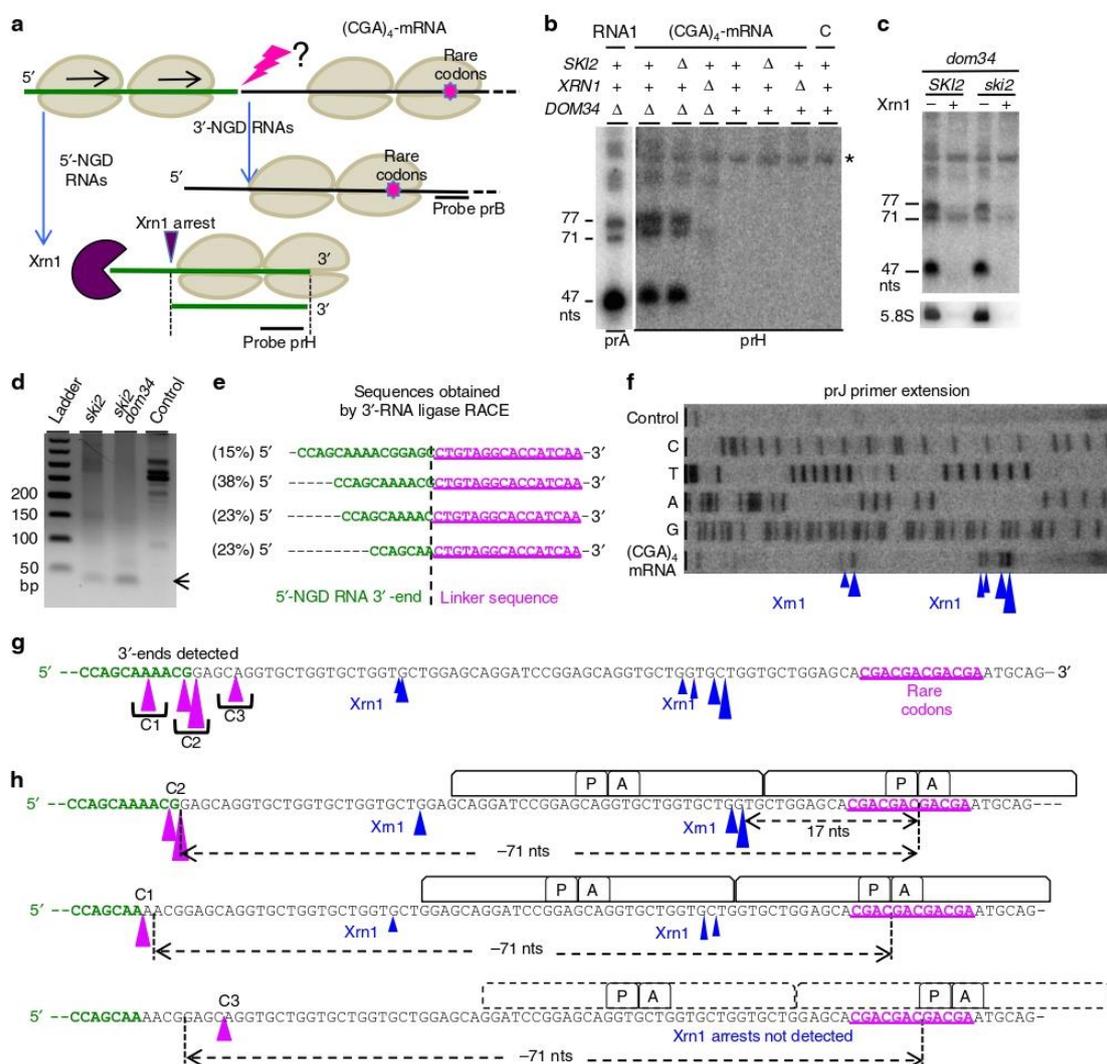


Fig. 6 Identification of the endonucleolytic cuts on the NGD targeted $(CGA)_4$ -mRNA. **a** Schematic view of the $(CGA)_4$ -mRNA. 5'- and 3'-NGD RNAs are products of NGD. The lightning flash represents the potential endonucleolytic cleavage upstream of the ribosome stall site. Probes prB and prH are indicated. 5'-NGD RNAs are shown processed by Xrn1 as described in Figs. 4a, d and Supplementary Fig. 4. **b** Northern blot analysis using probe prH showing steady-state levels of RNAs in the indicated mutant strains. Same membrane has been probed with prA as a ladder, and sizes of mRNA1 products, such as B5 (77 nt), B4 (71 nt) and B1 (47 nt) are indicated. Only the *dom34* lane is shown. See Supplementary Fig. 6a for the sequence probed by prH. The 5S rRNA served as a loading control. Total RNA from WT cells without $(CGA)_4$ -mRNA expression served as a control, noted C. A non-specific band is indicated by an asterisk. **c** Xrn1 treatment in vitro of total RNA from *dom34* or *dom34/ski2* mutant cells and northern blot using probe prH. The 5.8S rRNA is a positive control of Xrn1 treatment. **d** PCR products obtained from 3'-RACE (see also Fig. 3c). Prior to PCR, cDNAs were produced from cells expressing $(CGA)_4$ -mRNA. Total RNA from cells without $(CGA)_4$ -mRNA expression served as a control. **e** Sequences obtained after 3'-RACE performed in **d** on *ski2/DOM34* total RNA. Sequence distribution is given in percentage. **f** Primer extension experiments using probe prJ to determine the 5'-end of RNAs. Xrn1-specific arrests are indicated by arrowheads. **g** Positioning of 3'-ends detected by 3'-RACE on $(CGA)_4$ -mRNA from *ski2/DOM34* cells (magenta arrowhead). Arrowhead sizes are proportional to the relative number of sequences obtained. Three cleavage clusters, C1, C2 and C3 were defined (see Supplementary Fig. 6d). Xrn1 arrests deduced from **f** are indicated by black arrowhead with sizes proportional to the intensity of reverse stops observed in **f**. **h** Schematic view of the ribosome positioning on $(CGA)_4$ -mRNA deduced from Xrn1 arrests combined with the positioning of endonucleolytic cleavages provided by 3'-RACE. Source data are provided as a Source Data file.

nts, respectively), indicating that they do not occur to any significant level. The major ~65-bp RT-PCR product corresponded perfectly to an RNA cleaved 71nt upstream of the 3'-extremity of mRNA1, suggesting this is the primary site of NGD cleavage. This also suggests that the particular conformation of disomes on

these mRNAs is incompatible with an NGD endonuclease activity cutting upstream of the ribosome P-site. The ability to induce this precise NGD cleavage appears thus to be a normal property of stalled ribosomes, with disomes (and monosomes) being exceptions.

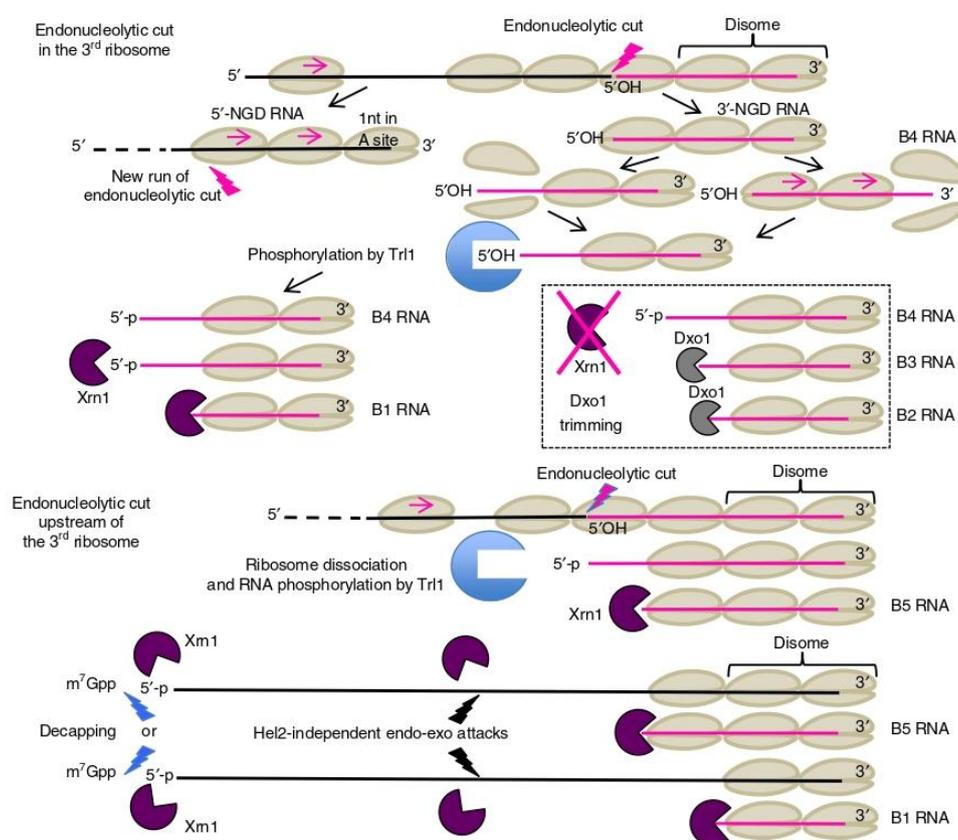


Fig. 7 Model of No-Go decay pathway involving Trf1 kinase and 5'-3' exonucleases. Top of figure, the third ribosome is represented as competent for NGD endonuclease activation. We propose that the two first stalled ribosomes are not properly conformed to trigger the endonucleolytic process. NGD endonuclease cleavage (lightning flash) occurs 8 nts upstream of the first P-site residue, within the mRNA exit tunnel of the ribosome. Upstream ribosomes covering the resulting 5'-NGD fragments can advance and stall on the new 3'-end with 1 nt in the ribosomal A-site. Colliding ribosomes on this new RNA fragment can induce a novel NGD endonuclease activation. On 3'-NGD RNAs, like B4 RNAs, the NGD-competent ribosome dissociates and facilitates access of Trf1 RNA kinase to the 5'-hydroxylated 3'-NGD RNA, but we cannot exclude that the leading ribosome dissociates and upstream ribosomes run to form a new disome with 5'-protruding RNA. Once the RNA is 5'-phosphorylated, the successive 5'-3' exonucleolytic activity of Xrn1 can degrade and produce B1 RNA. Alternatively, upon Xrn1 inactivation, 5'-3' exonucleolytic digestion of this RNA by Dxo1 can occur and produce trimmed RNAs, such as B3 and B2 RNAs. Middle of figure, upstream of the 3rd ribosome, ribosomes are also competent for NGD endonuclease activation. Here, the endonucleolytic cleavage occurs in the 4th ribosome and B5 RNAs can derive from such RNAs after phosphorylation and 5'-3' digestion. Bottom of figure, alternative pathways are proposed: B1 and B5 RNA production could be initiated by decapping or via Hel2-independent uncharacterized endo/exonucleolytic attacks.

We considered the possibility that the *dom34* mutation may exaggerate the ribosome stalling and allow cleavage beyond what would naturally be observed. As discussed in the section Introduction, the analysis of NGD RNA fragments is facilitated by the *dom34* mutation and is crucial for RNA stabilization when analysing truncated mRNAs by northern blotting experiments^{5,20}. In the presence of Dom34, and more efficient ribosome dissociation, the exosome would certainly be more actively involved once the first endonucleolytic cleavage event has occurred^{5,20}. Importantly, however, our 3'-RACE experiments confirmed the existence of 5'-NGD products with 3'-ends matching the 5'-extremity of the 3'-NGD B4 RNA in cells containing Dom34 (Fig. 3c, d). Thus, NGD endonucleolytic cleavage does not occur randomly upstream of the ribosomal stall site and is not an artefact of *dom34* genetic context.

These observations were used to map endonucleolytic cleavages that occur on a second NGD-target mRNA containing rare

codons, also in a *DOM34* genetic context. Endonucleolytic cleavages occurred 71nts upstream of the first residue in the leading ribosome A-site, in the region potentially covered by the third ribosome. Therefore, mRNAs containing rare codons are processed similar to truncated RNAs, although cleavage accuracy is slightly affected, correlating with specific Xrn1 arrests (Fig. 6f) that might be explained by a particular conformation of the first stalled ribosome³⁹.

It has been recently reported that Cue2 is the endonuclease that cleaves NGD/NSD targeted RNAs^{36,37}. Its action has been proposed to occur in the ribosome A site and therefore deviates significantly from our observations. We do not have a good explanation for this difference. However, previous experiments with the naturally occurring truncated HAC1 mRNA are consistent with our mapping of the endonucleolytic cleavage site²⁰. The HAC1 intron is known to be excised by Ire1, but RNA ligation can be incomplete and lead to a truncated but translated

mRNA^{38,39}. Green and colleagues showed by ribosome-profiling analysis that ribosomes stall at the 3'-end of the first exon of the HAC1 mRNA, leading to an endonucleolytic cleavage ~70 nt upstream from the 3'-end⁹. Consistent with this observation, our data suggests that the NGD endonuclease cleaves 71 nt upstream of the 3'-end of the truncated mRNA1 (B4 RNAs, Fig. 1g). We also showed that the NGD endonuclease cleaves mRNA1 in the +1 reading frame. As a consequence, upstream ribosomes run forward on the 5'-NGD mRNA and stall with 1 nt in the A-site (Figs. 1g and 7). This is in agreement with ribosome-profiling analysis reporting the predominance of short RNAs having one 3'-nucleotide in the ribosome A site^{20,36}.

We showed that the Trl1 kinase plays a role in NGD, and we propose that the resistance of the B4 3'-NGD RNA fragments to Xrn1 attacks in vitro and in vivo (Fig. 3a and Supplementary Figs. 1b and 3a) is a direct consequence of the 3rd ribosome preventing access to Trl1, with dissociation of this ribosome triggering the 5'-phosphorylation of the B4 RNA (Fig. 7). It is also possible that the leading ribosome dissociates, and that upstream ribosomes run forward to form a new disome with a 5'-protruding RNA (Fig. 7). Once the RNA is 5'-phosphorylated, the processive 5'-3' exonucleolytic activity of Xrn1 can degrade to produce the disome protected B1 RNA (Fig. 7). The fact that RNAs longer than B5, which accumulate in the *trl1* mutant (Fig. 5a), are Xrn1-resistant (Fig. 5c and Supplementary Fig. 5) coupled with the absence of the B5 RNA upon Xrn1 inactivation (Fig. 1b–d) lead us to propose that the B5 RNA originates from 5'-OH RNAs cleaved within ribosomes upstream of the 3rd ribosome, are phosphorylated by Trl1 and are digested by Xrn1 until it bumps into downstream ribosomes (Fig. 7). A portion of the B1 species (Fig. 5a and Supplementary Fig. 5a) is detected upon Trl1 inactivation, however. Therefore, 5'-phosphorylation of 5'-hydroxylated B4 RNAs only accounts for a portion of B1 RNA production. In agreement, the *hel2* mutation abolishes B4 RNA detection without impacting B1 and B5 RNA levels (Supplementary Fig. 3b). Mutations can thus reveal the existence of alternative pathways. In this regard, we learned that the inactivation of Xrn1 can lead to a Dxo1 trimming and production of B2 and B3 RNAs (Fig. 7). We cannot exclude the possibility that a portion of the B1 and B5 RNAs derive from alternative pathways, such as the canonical 5'-3' decay pathway (i.e., decapping and Xrn1 5'-3' digestion)²⁴ or an uncharacterized endo and/or exonucleolytic decay pathway (Fig. 7). Lower levels of NGD RNAs in a *dcp2* mutant (Fig. 1b, c) do not contradict a decapping requirement in some of their production, but the poor growth of *dcp2* mutant cells prevents us from drawing further conclusions. The potential existence of alternative pathways does not overshadow the strong impact of the *trl1* mutant on NGD RNA production (Fig. 5).

We show that the NGD pathway produces RNAs bearing a 5'-hydroxyl group (Figs. 3a, 5 and 7). 5'-hydroxyl and 2'-3' cyclic phosphate 3' extremities are typically generated by metal-independent endoribonucleolytic reactions⁴⁰. We also show that the Trl1 kinase phosphorylates these 3'-NGD fragments to allow degradation by 5'-3' exoribonucleases. Thus, in addition to its role in tRNA splicing and in phosphorylation of 5'-hydroxylated exon of the HAC1 mRNA³⁴, Trl1 is an important player in NGD pathway. This study also provides mechanistic insights that will help to go further in the comprehension of mRNA surveillance pathways in connection to NGD.

Methods

Yeast media, plasmids, strains, and oligonucleotides. The media, strains of *S. cerevisiae*, oligonucleotides, synthesized DNAs and plasmids used in this study are described in the Supplementary Methods and Supplementary Tables 1, 2, 3 and 4, respectively.

Northern blot analysis. 8 OD_{600nm} of exponentially growing cells were collected by centrifugation. RNA was extracted by adding on cell pellet 500 µl of buffer AE (50 mM Na acetate [pH 5.3], 10 mM EDTA), vortexing, and adding 500 µl of phenol previously equilibrated in buffer AE. After vortexing, the tubes were incubated at 65 °C for 4 min and then frozen in a dry ice-ethanol mix, followed by a 15-min centrifugation at room temperature. A second extraction with 500 µl of phenol-Tris-EDTA-chloroform was performed. RNA from 360 µl of supernatant was precipitated with 40 µl of 3 M Na acetate (pH 5.3) and 2.5 volumes of ethanol and centrifuged at 4 °C for 30 min. The pellet was washed in 80% ethanol, dried at room temperature and resuspended in water. After electrophoresis, RNA was blotted onto a Hybond-N+ membrane (Amersham) and hybridization to end-labelled oligodeoxynucleotide probes was carried out at 42 °C overnight in Roti-Quick solution (Carl-roth). The Hybond-N+ membrane was washed successively at 42 °C in 5 × SSC-0.1% SDS and twice in 1 × SSC-0.1% SDS. Blots were exposed to PhosphorImager screens, scanned using a Typhoon FLA 9500 (Fuji), and quantified with ImageJ software.

Gel electrophoresis for separation of RNA molecules. Total RNA was resolved by 8% TBE-urea polyacrylamide or 1.4% TBE-Agarose gels, and to dissociate 5'-hydroxylated from 5'-phosphorylated RNAs, total RNA was resolved by 12% TBE-urea polyacrylamide gels. All gels were followed by northern blot analysis.

In vitro RNA digestion. RNA digestion of 20 OD_{260nm} of cell extracts were performed by using 1 unit of Xrn1 (Biolabs) in NEB buffer 3 at 25 °C during 30 min unless otherwise indicated. NEB Buffer 3 was replaced by T4 PNK buffer (NEB) in kinase assays in the presence or absence of Xrn1 (Figs. 3a and 5d). For RNase I treatment of cell extracts, 20 OD_{260nm} of extracts (prepared without heparin) were incubated with 0.5, 1, or 2 µl of RNase I (Invitrogen, 100 units/µl) 30 min at 25 °C. For total RNA treatment, 5 µg of RNA were digested 30 min at 25 °C. All RNase treatments were followed by RNA extraction and northern blot analysis as described above.

Polysome analysis. Yeast cells were grown exponentially to 0.8 OD₆₀₀ at 28 °C and the 200 ml cell culture was quickly cooled in ice water and then centrifuged and washed in 20 ml of buffer A containing 10 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl and 30 mM MgCl₂, and 0.5 mg/ml heparin. Heparin was only omitted for RNase I treatment²⁴. Cycloheximide was not used to prevent any drug-induced ribosome positioning. The cell pellet was resuspended in 0.6 ml of buffer A. A 1.4 g amount of glass beads was added, and cell lysis was performed by bead beating twice for 30 s each time (with intermittent cooling). After lysis, the cell extract was clarified for 5 min at full speed in a microcentrifuge. The equivalent of 20 OD_{260nm} units of cell extract (80 µg of total RNA) was then layered onto linear 10–50% sucrose density gradients. Sucrose gradients (in 10 mM Tris-HCl [pH 7.4], 70 mM ammonium acetate, 30 mM MgCl₂) were prepared in 12 × 89 mm polyallomer tubes (Beckman Coulter). Polysome profiles were generated by continuous absorbance measurement at 254 nm using the Lsc fraction collector. Gradients were collected in 20 fractions and processed for northern blotting as described above.

Primer extension. Radiolabelled primers (primers prA and prE for mRNA1, and primer prJ for (CGA)₄-mRNA) were used and Maxima H Minus reverse transcriptase (ThermoFisher) was used to synthesize a single-stranded DNA toward the 5'-end of the RNA. The size of the labelled single-stranded DNA was determined relative to a sequencing ladder (ThermoFisher Sequenase sequencing kit) on 5% TBE-urea polyacrylamide gel. Oligonucleotides were radio-labelled with [γ-³²P] ATP with the T4 polynucleotide kinase (NEB).

3'-end RNA mapping. Mapping was performed according to the 3'-RNA ligase-mediated RACE method³¹ with minor modifications: Total RNA preparations were first 3'-dephosphorylated using T4 PNK for 1 h at 37 °C without ATP and pre-adenylated linker (Universal miRNA cloning linker, NEB) ligation was performed during 4 h at 22 °C in the presence of truncated RNA ligase 2 (NEB)³⁰. Reverse transcriptase reactions were performed using primer prE complementary to the linker sequence. PCR primer prF specific to mRNA1, or primer prK specific to (CGA)₄-mRNA, were used with primer prE in PCR reactions (Supplementary Figs. 3a and 6c). PCR products were purified, cloned into Zero Blunt TOPO PCR Cloning vector (Invitrogen), transformed and plasmids sequenced.

Reporting Summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this Article.

Data availability

A Reporting Summary for this Article is available as a Supplementary Information file. The authors declare that all data supporting the findings of this study are available within the Article and its Supplementary Information files or from the corresponding author upon reasonable request. The source data underlying Figs. 1b–f, 2a, b, 3a, c, 4b, c, 5a–d and 6b–d, f and Supplementary Figs. 1b, d–i, 2a–c, 3a, b, 5 and 6b, e are provided as a Source Data file in the Supplementary Information and at FigShare with DOI information (0.6084/m9.figshare.11317613).

Received: 8 November 2018; Accepted: 11 December 2019;
Published online: 08 January 2020

References

- Doma, M. K. & Parker, R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561–564 (2006).
- Passos, D. O. et al. Analysis of Dom34 and its function in No-Go Decay. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3025–3032 (2009).
- Chen, L. et al. Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for No-Go Decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1233–1240 (2010).
- Letzring, D. P., Dean, K. M. & Grayhack, E. J. Control of translation efficiency in yeast by codon–anticodon interactions. *RNA* **16**, 2516–2528 (2010).
- Tsuboi, T. et al. Dom34hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* **46**, 518–529 (2012).
- Simms, C. L., Hudson, B. H., Mosior, J. W., Rangwala, A. S. & Zaher, H. S. An active role for the ribosome in determining the fate of oxidized mRNA. *Cell Rep.* **9**, 1256–1264 (2014).
- Sinturel, F. et al. Cytoplasmic control of sense–antisense mRNA pairs. *Cell Rep.* **12**, 1853–1864 (2015).
- Simms, C. L., Thomas, E. N. & Zaher, H. S. Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. *RNA* **8**, e1366 (2017).
- Guydosh, N. R. & Green, R. Translation of poly(A) tails leads to precise mRNA cleavage. *RNA* **23**, 749–761 (2017).
- Frishmeyer, P. A. et al. An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**, 2258–2261 (2002).
- van Hoof, A., Frishmeyer, P. A., Dietz, H. C. & Parker, R. Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**, 2262–2264 (2002).
- Kuroha, K. et al. Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* **11**, 956–961 (2010).
- Brandman, O. et al. A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* **151**, 1042–1054 (2012).
- Defenouillere, Q. et al. Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **110**, 5046–5051 (2013).
- Shen, P. S. et al. Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* **347**, 75–78 (2015).
- Johnson, A. W. & Kolodner, R. D. Synthetic lethality of sep1 (xrn1) ski2 and sep1 (xrn1) ski3 mutants of *Saccharomyces cerevisiae* is independent of killer virus and suggests a general role for these genes in translation control. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2719–2727 (1995).
- Shoemaker, C. J., Elyer, D. E. & Green, R. Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* **330**, 369–372 (2010).
- Meaux, S. & Van Hoof, A. Yeast transcripts cleaved by an internal ribozyme provide new insight into the role of the cap and poly(A) tail in translation and mRNA decay. *RNA* **12**, 1323–1337 (2006).
- Guydosh, N. R., Kimmig, P., Walter, P. & Green, R. Regulated Ire1-dependent mRNA decay requires no-go mRNA degradation to maintain endoplasmic reticulum homeostasis in *S. pombe*. *eLife* **6**, e29216 (2017).
- Guydosh, N. R. & Green, R. Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. *Cell* **156**, 950–962 (2014).
- Wu, J. & Hopper, A. K. Healing for destruction: tRNA intron degradation in yeast is a two-step cytoplasmic process catalyzed by tRNA ligase Rlg1 and 5'-to-3' exonuclease Xrn1. *Genes Dev.* **28**, 1556–1561 (2014).
- Chang, J. H. et al. Dxo1 is a new type of eukaryotic enzyme with both decapping and 5'-3' exoribonuclease activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1011–1017 (2012).
- Parker, R. RNA degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **191**, 671–702 (2012).
- Hu, W., Sweet, T. J., Chamnongpol, S., Baker, K. E. & Collier, J. Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **461**, 225–229 (2009).
- Ingolia, N. T., Ghaemmaghami, S., Newman, J. R. & Weissman, J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science* **324**, 218–223 (2009).
- Pelechano, V., Wei, W. & Steinmetz, L. M. Widespread co-translational RNA decay reveals ribosome dynamics. *Cell* **161**, 1400–1412 (2015).
- Simms, C. L., Yan, L. L. & Zaher, H. S. Ribosome collision is critical for quality control during No-Go Decay. *Mol. Cell* **68**, 361–373 (2017).
- Nagarajan, V. K., Jones, C. L., Newbury, S. F. & Green, P. J. XRN 5'->3' exoribonucleases: structure, mechanisms and functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 590–603 (2013).
- Ikeuchi, K. et al. Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *EMBO J.* **38**, e100276 (2019).
- McGlinchy, N. J. & Ingolia, N. T. Transcriptome-wide measurement of translation by ribosome profiling. *Methods* **126**, 112–129 (2017).
- Adkar-Purushothama, C. R., Bru, P. & Perreault, J. P. 3' RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends for validating viroid induced cleavage at the 3' extremity of the host mRNA. *J. Virol. Methods* **250**, 29–33 (2017).
- Phizicky, E. M., Consaul, S. A., Nehrke, K. W. & Abelson, J. Yeast tRNA ligase mutants are nonviable and accumulate tRNA splicing intermediates. *J. Biol. Chem.* **267**, 4577–4582 (1992).
- Cherry, P. D., White, L. K., York, K. & Hesselberth, J. R. Genetic bypass of essential RNA repair enzymes in budding yeast. *RNA* **24**, 313–323 (2018).
- Cherry, P. D., Peach, S. E. & Hesselberth, J. R. Multiple decay events target HAC1 mRNA during splicing to regulate the unfolded protein response. *eLife* **8**, e42262 (2019).
- Chen, H. & Xiong, L. The bifunctional abiotic stress signalling regulator and endogenous RNA silencing suppressor FIERY1 is required for lateral root formation. *Plant Cell Environ.* **33**, 2180–2190 (2010).
- D'Orazio, K. N. et al. The endonuclease Cue2 cleaves mRNAs at stalled ribosomes during No Go Decay. *eLife* **8**, e49117 (2019).
- Glover, M. L. et al. NONU-1 encodes a conserved endonuclease required for mRNA translation surveillance. Preprint at <https://doi.org/10.1101/674358> (2019).
- Cox, J. S. & Walter, P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* **87**, 391–404 (1996).
- Harigaya, Y. & Parker, R. Global analysis of mRNA decay intermediates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 11764–11769 (2012).
- Gonzalez, T. N., Sidrauski, C., Dorfler, S. & Walter, P. Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway. *EMBO J.* **18**, 3119–3132 (1999).

Acknowledgements

This work has been supported by AAP Emergence Sorbonne Université, SU-16-R-EMR-03 and by the “Initiative d’Excellence” program from the French State grant “DYNAMO”, ANR-11-LABX-0011-01. S.C. was a recipient of fellowship from the Ministère pour la Recherche et la Technologie (MNRT). A.N. was supported by a doctoral grant from “DYNAMO”, ANR-11-LABX-0011-01. We thank Jay Hesselberth for providing *trll* mutant and Jeff Collier for the *dcp2Δ* mutant. We thank Ciaran Condon, Josette Barroques and Kyle Tanner for technical assistance. We thank Ciaran Condon for comments on the manuscript and constructive discussions. The first two authors are listed in chronological order of contribution.

Author contributions

A.N., S.C., R.S.-F., J.H., C.T. and L.B. designed, performed and analysed data. L.B. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13991-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to L.B.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020

Supplementary Information

No-Go Decay mRNA cleavage in the ribosome exit tunnel produces 5'-OH ends phosphorylated by Trl1

Navickas et al.

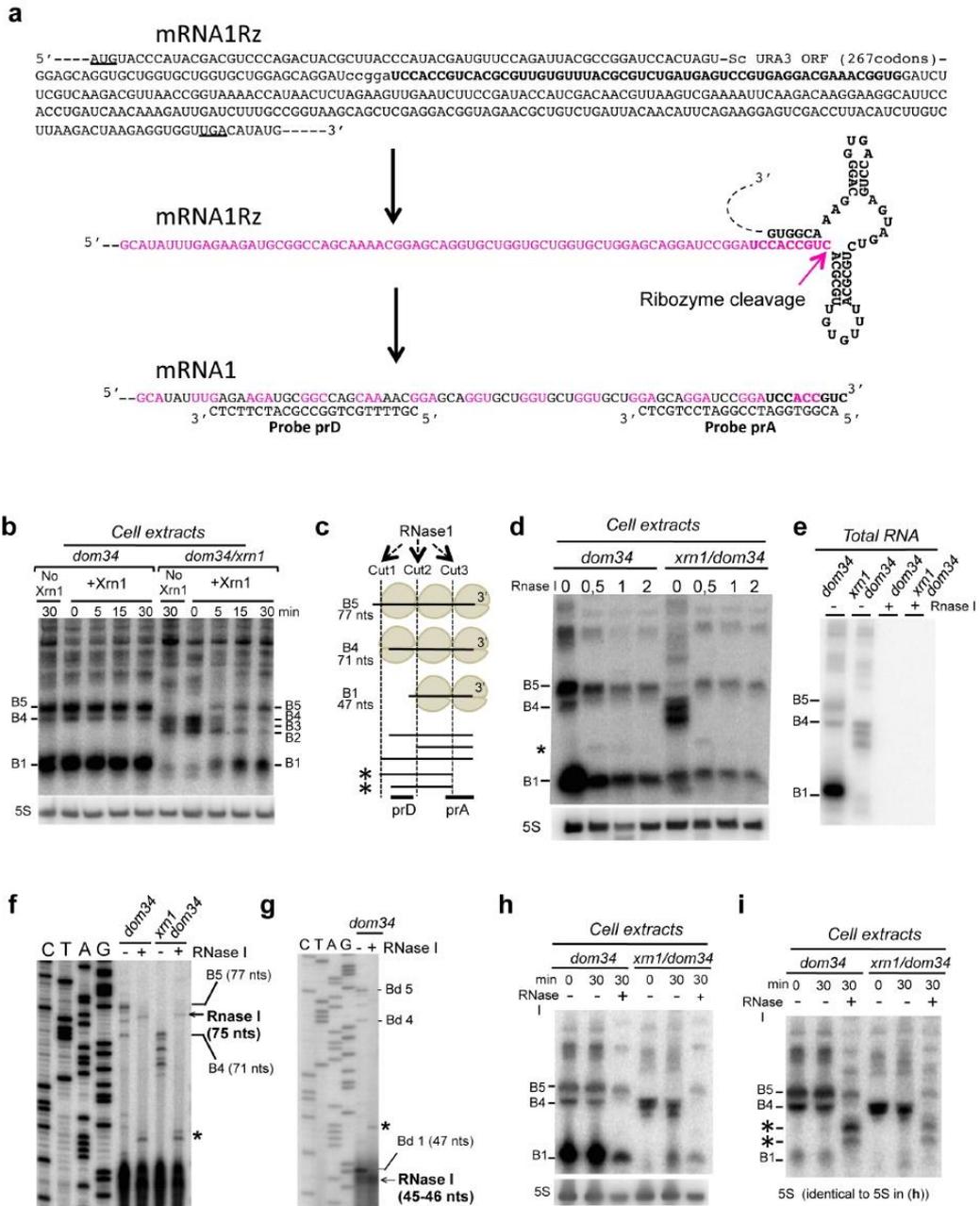
Supplementary Notes

Supplementary Note 1 Ribosome protection of 3'-NGD RNA fragments from Xrn1 activity. We first focused on the fate of the major B1 (47 nts) and B5 (77 nts) RNA species detected in *dom34* cell extracts, which likely correspond to RNAs protected from Xrn1 digestion *in vivo* by trisomes and disomes, respectively. We showed that Xrn1 treatment of RNA in *dom34* cell extracts had no impact on B5 and B1 RNAs *in vitro*, suggesting that these RNA species are indeed protected by ribosomes (Supplementary Fig. 1b). Interestingly, the persistence of the 71-nt B4 RNA after Xrn1 treatment suggests that this RNA may also be protected by up to three ribosomes in the *dom34* background (Supplementary Fig. 1b).

We also added purified Xrn1 to cell extracts of the *dom34/xrn1* strain *in vitro* and showed that it can efficiently recapitulate the production of the B1 species observed in Xrn1-containing cells *in vivo*. The appearance of the B1 RNA was inversely correlated to the amount of B4, B3 and B2 RNAs remaining, suggesting that these three species have unprotected 5'-protruding RNA extremities *in vivo*, due to the absence of the 5'-3' exoribonuclease Xrn1 (Supplementary Fig. 1b). The B5 RNA appears to be also generated at the expense of some larger species by Xrn1 treatment *in vitro*, consistent with the presence of trisomes on this species in the *dom34/xrn1* cell extracts (Supplementary Fig. 1b). Based on these experiments, we propose that the B1 (47 nts) and B5 (77 nts) species correspond to Xrn1-trimmed RNAs protected by two and three ribosomes, respectively¹ and that at least some portion of the 71 nt B4 RNA is also protected from Xrn1 by three ribosomes.

Supplementary Note 2 Ribosome protection of 3'-NGD RNA fragments from RNase I activity. To validate the presence and number of ribosomes on 3'-NGD RNAs by a third method, and particularly the presence of trisomes on the 77-nt B5 and 71-nt B4 species, we also performed RNase I protection assays on cell extracts of *dom34* and *dom34/xrn1* strains. We hypothesized that B5 and B4 RNAs protected from RNase I by three ribosomes should be detectable with both probes prA and prD (Supplementary Fig. 1c). The presence of two or three ribosomes on the major RNA species B1, B4 and B5 in *dom34* cells (deduced from primer extension experiments, ribosome association and Xrn1 treatment *in vitro*) would preferentially conduct RNase I to cleave at three major sites, Cut1, 2 and 3 in Supplementary Fig. 1c. After RNase I treatment (Supplementary Fig. 1d, e), the accumulation of RNase I protected RNAs of similar size to B5 is consistent with the hypothesis that this RNA is covered by trisomes in *dom34* mutant extracts (Fig. 1f). It is known that RNase I and Xrn1 cleave about 15 nts² and 17 nts¹ upstream of the first nt of the ribosomal A-site, respectively. We thus expected 5'-end of the B5 RNA to be 1-2 nts shorter than the Xrn1 product after RNase I treatment, if we had accurately calculated the positions of ribosomes on this RNA. Indeed, primer extension experiments confirmed that ribosomes protect a 75-nt species from RNase I in the *dom34* background (Supplementary Fig. 1f). The equivalent of the B1 RNA was 46 nt in size after RNase I treatment (Supplementary Fig. 1g). B4 RNA was not detected using probe prA (Supplementary Fig. 1d, h). We wondered whether RNase I cleaved preferentially at Cut3 (Supplementary Fig. 1c), thus preventing the detection of B4 using probe prA. We probed the membrane in Supplementary Fig. 1h with prA (Fig. 1i), and two distinct RNA species were detected corresponding to B5 and B4 processed by RNase I at Cut3, and inefficiently cleaved at the Cut2 site (Supplementary Fig. 1c). We thus propose that the 5'- extremities of B4 RNA are also protected by ribosomes (at least two ribosomes limiting RNase I attack at Cut2). We conducted the same experiment on the B4 RNA from *xrn1/dom34* cell extracts. These RNAs were sensitive to Xrn1 treatment *in vitro* (Supplementary Fig. 1b), and using probe prD to detect the B4 RNA specifically, we observed that these RNAs were also protected from RNase I to a similar extent as B4 in *dom34* cell extracts (Supplementary Fig. 1i). Thus, whether two or three ribosomes dwell on the 71-nt B4 RNA in *xrn1/dom34* mutant cell extracts is not completely clear as this species is sensitive to Xrn1 *in vitro* (*i.e.* have 5'-ribosome-free extensions that can be pared down to B1 by Xrn1 digestions) (Supplementary Fig. 1b), which would be consistent with protection by two ribosomes, but it is resistant to RNase I (Supplementary Fig. 1i), which is more consistent with three.

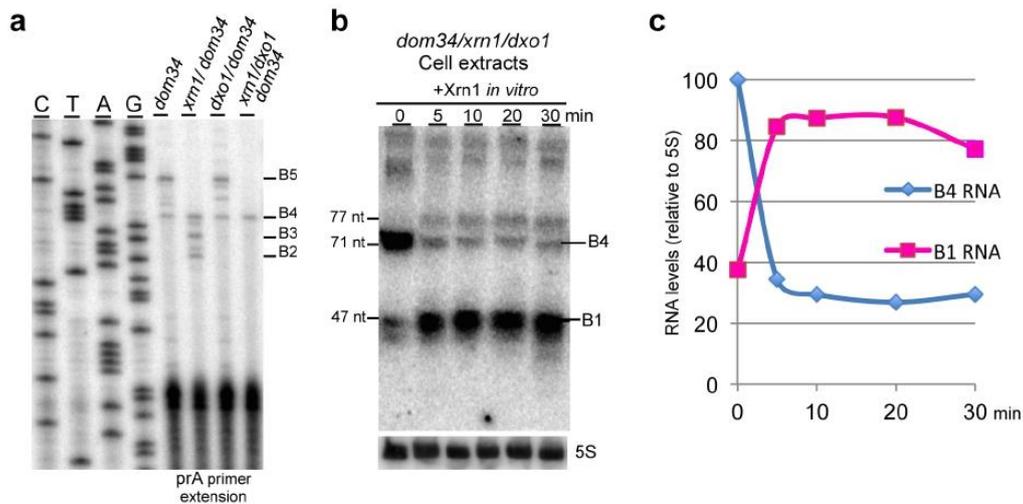
Supplementary Fig. 1



Supplementary Fig. 1 3'-NGD RNA fragment analysis, related to Fig. 1. **a** Sequence of mRNA1Rz. The translational start (AUG) and stop codon (UGA) are underlined. The ribozyme sequence is shown in bold. The magenta arrow indicates the ribozyme cleavage site. mRNA1 is the truncated stop-less codon mRNA after ribozyme cleavage. Probes prA and prD are indicated. **b** Xrn1 treatment *in vitro* of cell extracts (*i.e.* mRNAs in presence of ribosomes) from *dom34* or mutant cells, followed by RNA extraction and northern blot using probe prA.

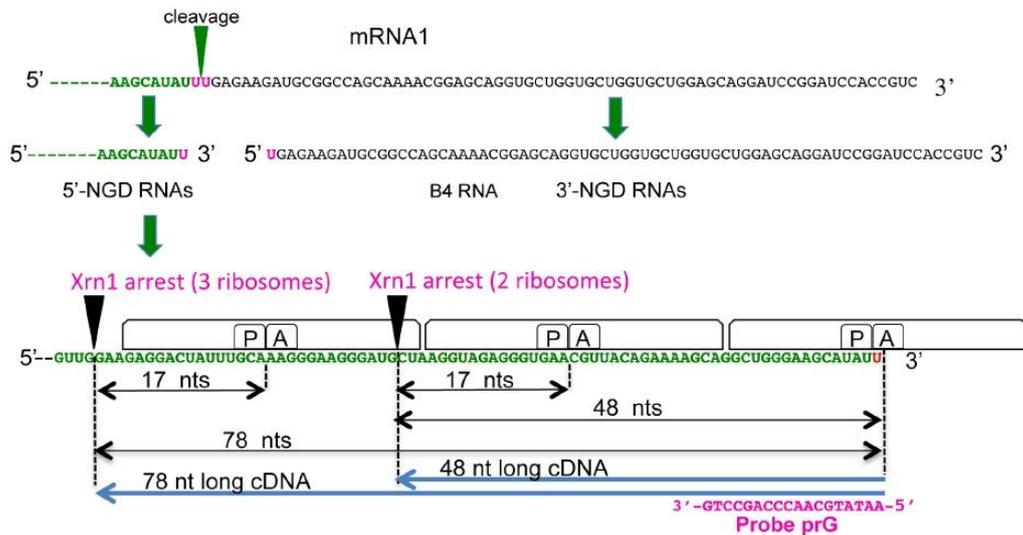
Sizes in nts are deduced from experiments shown in (Fig. 1c-d). **c** Schematic view of ribosomes covering RNA species B1, B4 and B5 observed in *dom34* mutant cells. Cut1, Cut2 and Cut3 represent potential RNase I cleavage sites. Probes prA and prD used in northern blots analysis shown in **(h)** and **(i)** are indicated. 5'-extremities of B5 and B4 RNAs potentially protected by two ribosomes and detected by prD are indicated by asterisks. **d** RNase I treatment *in vitro* of cell extracts (*i.e.* mRNAs in presence of ribosomes) from *dom34* or *dom34/xrn1* mutant cells followed northern blot using probe prA. The 5S rRNA served as a loading control. 0.5, 1, or 2 μ l of RNase I were used (100 units/ μ l). **e** Similar RNase I treatment analysis that in **(d)** but on extracted RNAs (*i.e.* mRNAs in absence of ribosomes). **f-g** Primer extension experiments using probe prA to determine the 5'-end of RNAs after RNase I treatment of *dom34* and *xrn1/dom34* cell extracts as performed in **(d)**. The band indicated by an asterisk is lost at a higher concentration of RNase I as shown in **(d)**. **h** RNase I treatment of cell extracts *in vitro*, analysed as in **(b)**. **i** The same membrane in **(h)** has been probed with prD. Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary Fig. 2



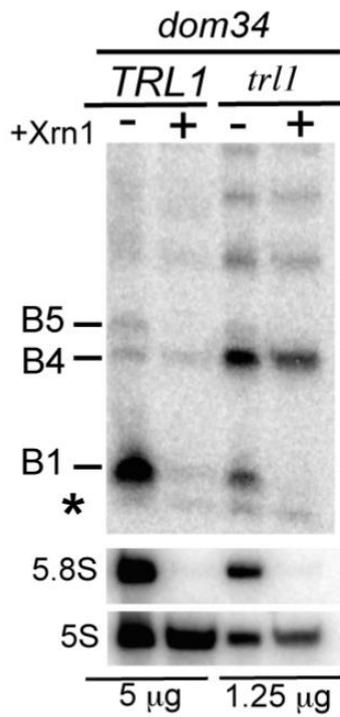
Supplementary Fig. 2 Dxo1 produces heterogeneity of 3'-NGD RNA fragments in Xrn1 deficient cells, related to Fig. 2. **a** Primer extension experiments using probe prA for determining the 5'-end of B1, B2, B3, B4 and B5 3'-NGD RNAs in indicated strains. **b** Cell extracts from *xrn1/dxo1/dom34* cells are digested by Xrn1 *in vitro*. 8% PAGE followed by northern blotting analysis using probe prA. **c** Quantification (a mean of two independent experiments) of RNAs shown in **(b)**. B1 RNA (as the 47 nt species) and B4 RNA (as the 71 nt species) are indicated in amount relative to the 5S rRNA. Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary Fig. 4



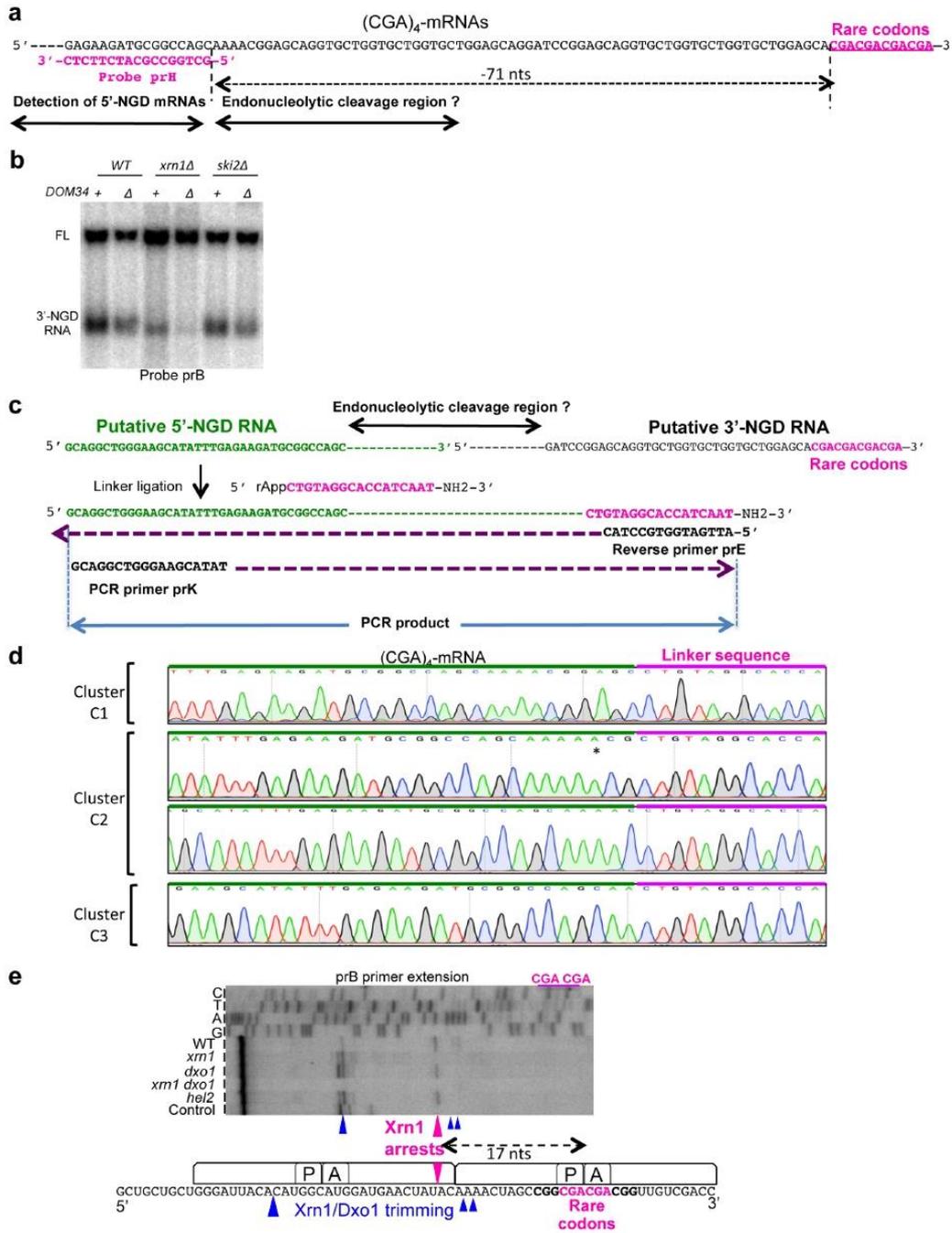
Supplementary Fig. 4 Analysis of the fate of 5'-NGD RNA, related to Fig. 4. Schematic model of mRNA1 before and after the endonucleolytic cleavage producing B4 RNA. The 5'-NGD resulting RNA is shown covered by ribosomes and is shown processed by Xrn1 in 48- and 78-nt RNAs when covered by two and three ribosomes, respectively. Xrn1 arrests occur 17 nts upstream of ribosomal A-site first residues¹. Using probe prG in primer extension experiments, 48- and 78-nt cDNA products are expected.

Supplementary Fig. 5



Supplementary Fig. 5 Related to Fig. 5, endonucleolytically cleaved 5'-OH RNAs are phosphorylated by Trl1. Xrn1 digestion of total RNA extracts from *TRL1/dom34* and *trl1/dom34* mutants in Xrn1 buffer. 5 µg and 1.25 µg of total RNA, from *TRL1* and *trl1* cell extracts respectively, were treated. A minor band detected in *TRL1* and *trl1* cells is indicated by an asterisk. The 5S rRNA served as a loading control. The 5.8S rRNA served as a positive control of Xrn1 treatment. Source data are provided as a Source Data file.

Supplementary Fig. 6



Supplementary Fig. 6 Analysis of (CGA)₄-mRNAs, related to Fig. 6. **a** Partial sequence of (CGA)₄-mRNA showing region upstream the four CGA rare codons. Positioning of probes prH is indicated. **b** 1.4% agarose gel followed by northern blotting analysis using probe prB showing steady state levels of RNAs in *dom34* and other indicated mutant strains. Full length

(CGA)₄-mRNA is noted FL, and the 3'-NGD RNAs are indicated. **c** 3'- RACE. The region of potential endonucleolytic cleavage, the 3'- and 5'-NGD RNAs are indicated. The putative 3'-extremity is shown ligated to the universal miRNA linker (NEB). Sequence of reverse primer prG and PCR primer prK are indicated. **d** Chromatogram representing sequences obtained from 3'-RACE experiments performed on total RNA from *ski2* mutant cells and the three cleavage clusters C1, C2 and C3. The asterisk indicates one nucleotide A mismatch found in sequences. **e** Primer extension experiments using probe prB to determine the 5'-end of the mRNA containing two contiguous CGA rare codons as described previously³. A schematic view of the ribosome positioning on this mRNA is shown below and Xrn1-specific arrest is indicated by a magenta arrowhead. Arrests dependent on Xrn1/Dxo1 activities are also indicated by blue arrowheads. Source data are provided as a Source Data file.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1 Analyse des outils utilisés lors de l'étude du No-Go Decay.

1.1 Choix de l'ARN tronqué

L'utilisation d'un ARNm tronqué, c'est à dire contenant un ribozyme, s'est révélée être particulièrement efficace pour positionner avec précision les ribosomes bloqués en cours d'élongation. Contrairement aux approches précédentes du groupe de Toshifumi Inada sur un ARN similaire, l'étude des fragments 3'-NGD stabilisés dans un mutant *Δdom34* nous a permis de localiser la position exacte des clivages du NGD qui découlent de ces évènements de blocage de la traduction.

Plus précisément, dans l'étude effectuée par northern blot par l'équipe de T. Inada, l'utilisation d'une sonde qui ne détectait pas une dizaine de nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARN tronqué n'a pas permis de détecter les fragments les plus courts (Figure 33A) (Tsuboi *et al.*, 2012). L'impact de Xrn1 dans la production des fragments protégés par un disome est donc passé inaperçu (Figure 33B). Cet élément important permet aujourd'hui de comprendre que Xrn1 joue en réalité un rôle prépondérant dans la dégradation de ces ARN dans un contexte où la dégradation 3'-5' est ralentie ou impossible (Figure 33C). De même, notre choix d'étudier les fragments 3'-NGD issus d'un ARN tronqué tout en bloquant la voie 3'-5' par une mutation *Δdom34* nous a permis de comprendre le rôle précis de Xrn1. En effet, dans ce contexte, son inactivation restait possible alors même que la voie 3'-5' était fortement ralentie pour ces ARN.

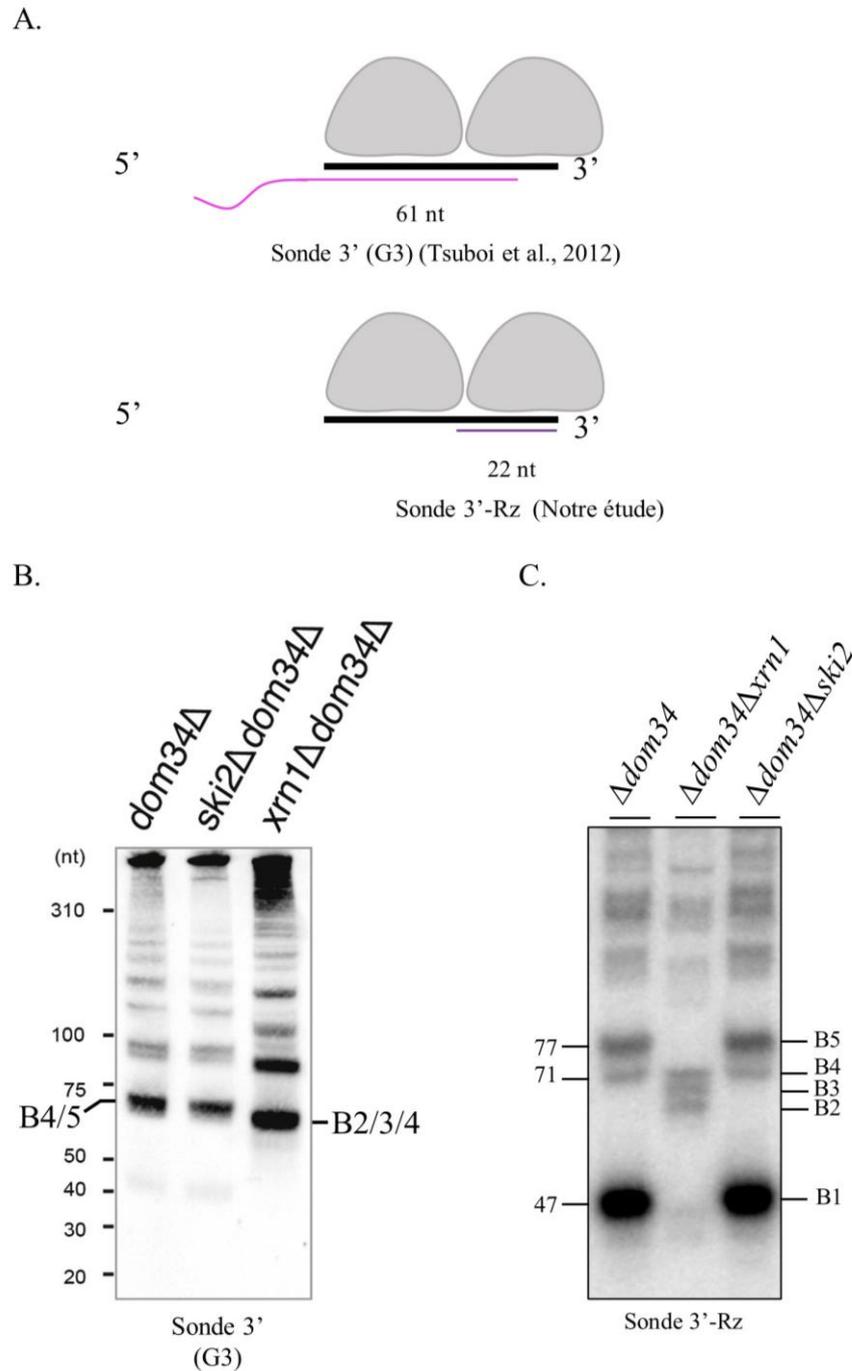


Figure 33 : Différences entre notre approche et celle menée par Tsuboi et al., 2012

(A) Position des sondes utilisées pour l'analyse d'un ARN tronqué lors de notre étude (bas) ou des travaux de Tsuboi *et al.*, 2012 (haut). Les ribosomes 80S sont symbolisés par leur sous-unité 60S. (B) Résultats obtenus par Tsuboi *et al.*, 2012 après la migration de l'ARN tronqué GFP-Rz sur gel d'acrylamide 6% et sa révélation par northern blot avec la sonde G3. La position de fragments d'ARN de taille définie (nt) est indiquée sur la gauche à titre indicatif. (C) Résultats obtenus lors de notre étude de l'ARN1 après sa migration sur un gel d'acrylamide 8% et sa révélation par northern blot avec la sonde 3'-Rz.

Parmi les études basées sur l'utilisation d'ARNm contenant des codons rares ou une tige-boucle, l'une d'elles, menées par le groupe de Hani Zaher, s'est attachée à séquencer les fragments 5'-NGD produits par le clivage endonucléolytique du NGD (Figures 34A et 34B). Contrairement à ce que nous avons constaté avec l'ARN tronqué, leur approche n'a pas permis d'identifier précisément la localisation du clivage endonucléolytique sur leurs constructions puisqu'aucun fragment 5'-NGD contiguë à un ARN 3'-NGD n'a pu être clairement établi. Cette analyse, très difficile selon les auteurs, a pu être complexifiée par le fait que les ARN tronqués qui résultent du clivage endonucléolytique deviennent à leur tour, du fait du blocage des ribosomes en 3' de ces derniers, des nouvelles cibles du NGD (Simms *et al.*, 2017).

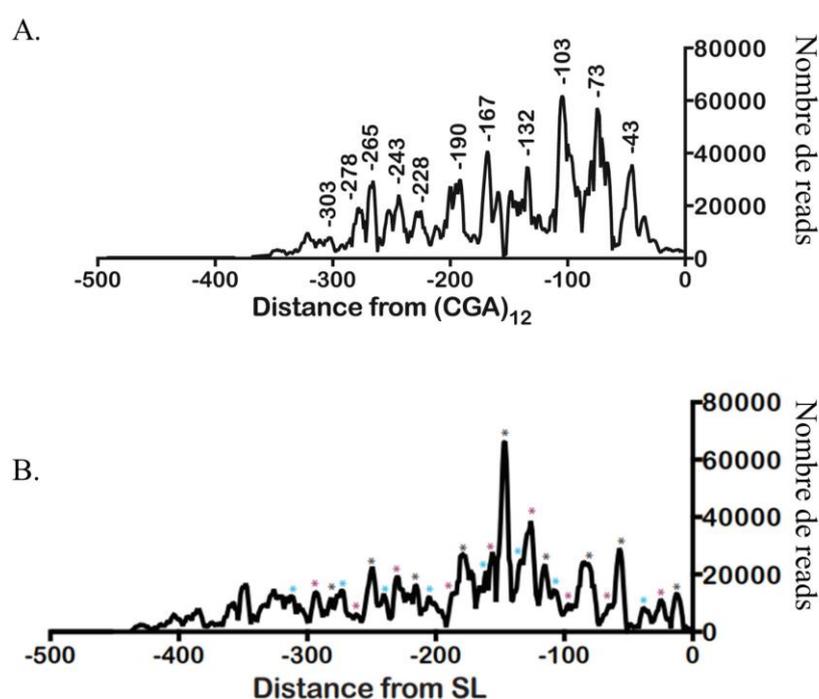


Figure 34 : Diversité des fragments 5'-NGD identifiés dans la littérature par 3'RACE.
(D'après Simms *et al.*, 2017)

Positionnement des clivages endonucléolytiques selon l'étude des fragments 5'-NGD par 3'-RACE menée dans Simms *et al.*, 2017 pour une construction contenant 12 codons rares (A) ou une séquence tige-boucle (B).

La construction ARN tronquée, bien qu'elle soit utilisée dans un contexte *Δdom34* lors de notre étude ou d'études antérieures, nous a permis de caractériser les premiers clivages intervenant lors du déclenchement du NGD sur cet ARN. De surcroît, cette construction nous a aidé à comprendre l'importance de Xrn1 dans leur production et donc d'identifier, sans ambiguïté, de nouveaux facteurs impliqués dans sa dégradation tels que Dxo1 et Trl1. En

aucune façon, ces facteurs de par leurs fonctions connues ne pouvaient jusqu'alors être proposés comme jouant un rôle dans la surveillance cytoplasmique des ARN messagers. L'ARN tronqué a donc été un outil utile, dans un contexte qui nécessite cependant la délétion du facteur de recyclage des ribosomes bloqués *DOM34* (Tsuboi *et al.*, 2012). Bien que cette mutation *Δdom34* n'influerait pas sur la mise en place du clivage endoribonucléolytique du NGD comme l'a confirmé notre approche 3'-RACE, nous savons qu'elle est susceptible de minimiser l'importance de la dégradation 3'-5' au profit de la voie 5'-3' dont l'activation ne semble pas être affectée par la stabilisation des ribosomes bloqués en 3' de l'ARN tronqué (Figure 22).

1.2 ARN tronqué *versus* ARN-CGA

Nous avons dans un deuxième temps confronté les résultats que nous avons obtenus avec la construction exprimant un ARN tronqué avec ceux provenant de l'utilisation d'un ARN contenant des codons rares. Nous avons ainsi confirmé en partie les observations que nous avons faites. De plus, notre approche a permis de mettre en lumière les avantages et les inconvénients inhérents à l'utilisation de l'ARN tronqué ou de l'ARN-CGA.

En effet l'étude de l'ARN-CGA, ne nécessite pas la mutation du facteur Dom34, et elle nous a ainsi permis de vérifier que nos observations effectuées sur l'ARN tronqué, en particulier le rôle prépondérant de Xrn1 dans sa dégradation, ne dépendaient pas de cette délétion. Par ailleurs, nous avons montré que l'étude du NGD menée à partir d'un ARN contenant des codons rares était particulièrement complexe à interpréter. En effet, contrairement à la situation d'un ribosome bloqué en 3' d'un ARN tronqué, les codons rares, placés au sein d'une séquence ARN, offrent toujours la possibilité au ribosome d'effectuer une translocation supplémentaire. Cette capacité moindre qu'ont les codons rares à arrêter la traduction (*a fortiori* de produire une collision de ribosome et d'activer un clivage endonucléolytique) pourrait d'ailleurs expliquer pourquoi seule la sensibilité de l'approche 3'-RACE nous a permis d'identifier les sites de clivage endoribonucléolytique sur l'ARN-CGA (Figures 29 et 30). La variabilité de la position de blocage des ribosomes a été particulièrement critique lors de notre étude car nous avons montré qu'il existait au moins trois positions de blocage des ribosomes sur l'ARN-CGA. D'ailleurs, il est indiqué dans les différentes études utilisant une série de 12 codons rares successifs que certains ribosomes sont positionnés à divers emplacements sur l'ensemble de cette séquence, rendant l'analyse par ribosome profiling plus complexe (Simms *et al.*, 2017 ; D'Orazio *et al.*, 2019). Puisque les études précédentes s'accordaient sur un modèle dans lequel les clivages du NGD étaient étroitement liés au positionnement des ribosomes bloqués, nous

avons constaté, du fait de la variabilité des arrêts des ribosomes sur les codons rares, que les clivages endonucléolytiques du NGD étaient multiples sur l'ARN-CGA mais présentaient une signature assez semblable à celle obtenue avec un ARN tronqué. Effectivement, forts des observations obtenues par l'utilisation de l'ARN tronqué, nous pouvons proposer que ces clivages sont le fruit d'un événement très similaire, c'est-à-dire que l'ARN-CGA est affecté par des clivages endonucléolytiques ayant lieu principalement à 71 nucléotides en amont du site A d'un ribosome placé dans une condition critique pour assurer le décodage (Figure 30).

2 Identification de nouveaux acteurs

2.1 Recrutement et importance de Trl1 dans le NGD chez *S. cerevisiae*

Au cours de notre étude, nous avons montré que la kinase Trl1 assurait la phosphorylation du fragment d'ARN B4 produit par le clivage endoribonucléolytique. Cette dernière, en plus d'être essentielle dans l'épissage des ARNt, joue donc un rôle central dans l'élimination des ARN pris pour cible par le NGD. La caractérisation du mécanisme permettant son intervention au niveau de l'extrémité 5'-OH des fragments 3'-NGD reste cependant une question qu'il faut adresser afin d'obtenir une meilleure compréhension du NGD. Trl1 pourrait ainsi agir de manière passive ou au contraire être recrutée directement au niveau des ARN clivés par le NGD *via*, par exemple, des ubiquitinations qui interviendraient au niveau des ribosomes bloqués.

Nos données ne nous permettent pas de déterminer si Trl1 est capable de phosphoryler l'extrémité 5' de l'ARN B4 lorsque ce dernier est associé à deux ou trois ribosomes. Il existe une corrélation entre l'absence de ce ribosome et la phosphorylation de l'extrémité 5' de l'ARN, ce qui pourrait laisser penser que l'accès de la kinase est rendu difficile lorsqu'un trisome est associé à l'ARN tronqué. Cependant, les ARN B4 sont partiellement phosphorylés dans le contexte (*XRN1/Δdom34*) (Figure 25) alors que nous savons qu'une fois phosphorylés, ceux-ci devraient être activement dégradés par Xrn1 (Figure 26). Il nous est donc difficile de conclure que Trl1 ait besoin que le ribosome soit au préalable dissocié des ARN 3'-NGD, car le cas échéant, Xrn1 éliminerait sans doute immédiatement ces ARN. Un modèle dans lequel Trl1 serait en étroite association avec le ribosome pour assurer la phosphorylation de l'ARN nouvellement clivé ne peut donc être exclu pour l'instant.

Cependant, le modèle le plus probable serait que la kinase Trl1 agisse après la dissociation d'un des ribosomes présents sur B4 suite à sa production par le NGD. L'identité du premier ribosome à être dissocié de l'ARN B4 est un des éléments qui serait intéressant à déterminer. Nous pouvons effectivement supposer que le ribosome le plus en 3' des trois ribosomes en

place sur l'ARN soit celui qui se dissocierait le plus facilement après le clivage, malgré le contexte $\Delta dom34$ (Figure 35-II). Par la suite, le déplacement des deux ribosomes en amont, par le simple fait de la reprise de la traduction, permettrait à l'extrémité 5' de l'ARN d'être découverte et d'être accessible à Trl1 (Figure 35-II). L'autre modèle serait que le ribosome expérimentant le clivage endonucléolytique soit le premier à se dissocier, ce qui découvrirait directement l'extrémité 5' de l'ARN (Figure 35-I).

Nous avons enfin montré que l'ensemble de ces étapes était important dans l'élimination des produits du NGD par la voie 5'-3' de dégradation des ARN dans un contexte où la dissociation des ribosomes est fortement ralentie. Dans ces conditions, en cas de défaillance de *TRL1*, nous avons montré que ces derniers s'accumulaient abondamment dans le cytoplasme, ce qui pourrait potentiellement favoriser des interactions aspécifiques de ces ARN avec d'autres acteurs cellulaires et ainsi perturber l'expression des gènes.

l'activité HDH a permis de montrer que cette dernière était au moins présente dans les protéines Dxo1 de souris et de plante (Doamekpor *et al.*, 2020). Chez la levure *S. pombe*, une telle activité est trouvée pour la protéine Rai1 qui, comme Dxo1, participe à la surveillance des coiffes aberrantes qui peuvent être présentes chez certains messagers.

Lors d'une étude antérieure, ce même laboratoire avait proposé que la protéine Dxo1 de *S. cerevisiae* (ScDxo1) n'était pas à même de dégrader, *in vitro*, des ARN 5'-OH (Chang *et al.*, 2012). Ces données, obtenues avec des ARN dont l'extrémité 5' était riche en guanines sont, selon les auteurs, à relativiser du fait que l'activité HDH est fortement inhibée par la présence de résidus guanine en 5' de l'ARN (Chang *et al.*, 2012 ; Doamekpor *et al.*, 2020). Ainsi, il n'est pas exclu que ScDxo1 puisse posséder une activité capable d'éliminer les groupements hydroxyles en 5' des ARN.

Cet élément soulève la question du rôle joué par Dxo1 dans l'élimination des ARN aberrants. Elle pourrait d'une part, avec son activité 5'-3' exoribonucléolytique, assister Xrn1 dans la dégradation de certaines séquences ou de structures potentiellement inhibitrices de cette dernière. D'autre part, pour certains organismes, Dxo1 pourrait également participer à l'élimination du groupement 5'-OH des fragments 3'-NGD dans le but de produire une nouvelle extrémité 5'-phosphorylée pour faciliter leur élimination par Xrn1.

Nous disposons d'ailleurs avec l'ARN tronqué d'un outil efficace pour analyser, *in vivo*, la présence possible d'une activité HDH dans le cytoplasme. En effet, l'ARN B4 est exclusivement présent sous sa forme 5'-OH dans le mutant $\Delta trl1/\Delta dom34$, et nous estimons que, dans le cadre où une telle activité serait présente sur la protéine ScDxo1, nous pourrions constater l'apparition d'ARN B2 et B3 dans un triple mutant $\Delta dom34/\Delta trl1/\Delta xrn1$. Lors de cette analyse, l'inactivation de Xrn1 serait effectivement nécessaire, car, si Dxo1 est à même d'éliminer le groupement hydroxyle en 5' de l'ARN B4, ce dernier qui serait de nouveau 5'-phosphorylé serait alors immédiatement réduit en ARN B1 par l'action de Xrn1. L'activité HDH de Dxo1 passerait alors inaperçue.

Enfin, au cours de notre étude, nous avons observé que l'activité exoribonucléolytique apparente de Dxo1 semblait thermosensible, puisque nous ne détectons plus d'ARN B2 et B3 produits lorsque les cellules ont été soumises à une élévation de la température (Figure 36). Cette inhibition pourrait être le fait d'une altération réelle du site catalytique de Dxo1 mais il reste possible que l'accès de Dxo1 à ces ARNs soit rendu impossible à 37°C pour une raison

qui nous est inconnue. En considérant le rôle de Dxo1 dans la gestion des coiffes NAD de certains messagers (*Introduction 2.2.1.1*), il serait intéressant de déterminer si cette activité apparaîtrait aussi comme thermosensible. Ce phénomène, s'il était vérifié, impliquerait que ces ARN particuliers s'accumuleraient lors de chocs thermiques. Nous pourrions donc imaginer que cela constitue une régulation de la quantité de ces ARN par inhibition de Dxo1 et que cela pourrait jouer un rôle dans l'expression des gènes correspondants.

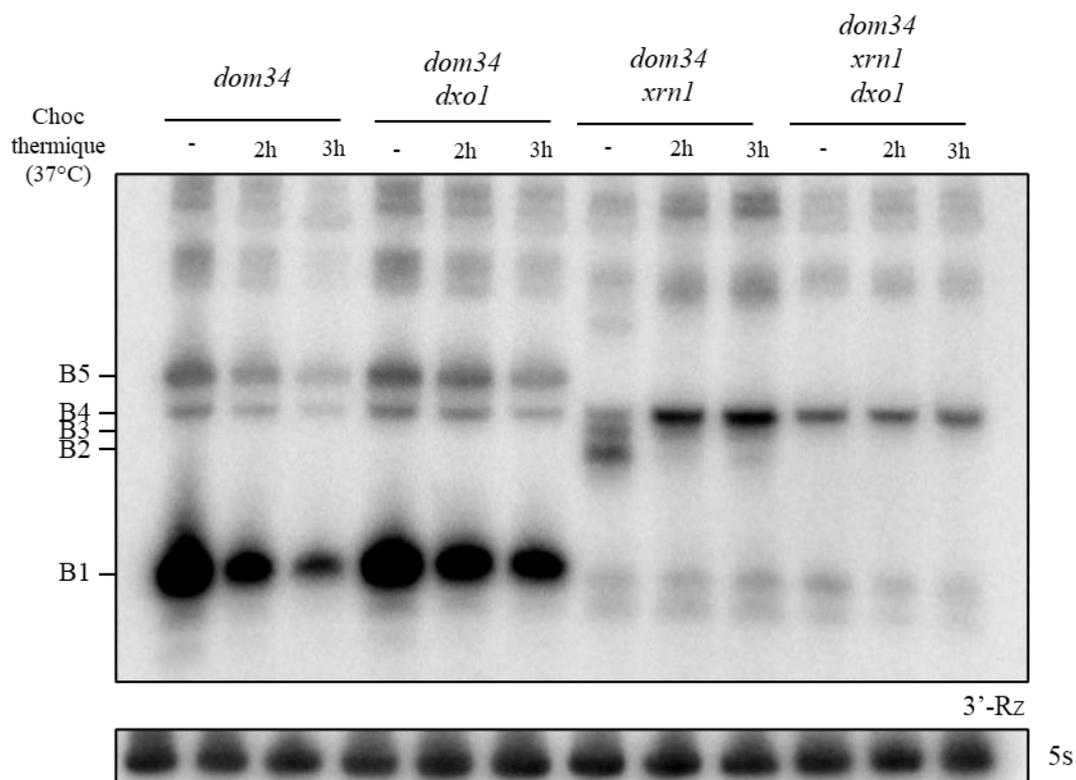


Figure 36 : Etude du comportement de Dxo1 lors d'un choc thermique.

Des ARN totaux provenant de différents mutants soumis (2 ou 3 heures) ou non (-) à un choc thermique ont été séparés par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide 8% avant d'être révélés par northern blot avec la sonde 3'-Rz.

3 Clivage endonucléolytique : positionnement et mode d'action

3.1 Clivage endoribonucléolytique, disome et nouveaux acteurs

Dans la littérature, le modèle actuel de l'activation du NGD est basé sur la présence de ribosomes en collision sur l'ARN aberrant. A partir de cet événement, et ce chez l'ensemble des eucaryotes, l'ubiquitine ligase Hel2 est alors recrutée pour poly-ubiquitiner la protéine ribosomale uS10 des deux premiers ribosomes bloqués (Simms *et al.*, 2017 ; Ikeuchi *et al.*, 2019 ; Glover *et al.*, 2020). Il est proposé qu'un clivage endonucléolytique appelé NGD^{RQC+} intervienne alors pour cliver l'ARN aberrant au niveau du disome bloqué (Ikeuchi *et al.*, 2019). Etonnamment, nous n'avons pas détecté de tels événements de clivage à partir des approches que nous avons menées à l'aide de l'ARN tronqué ou contenant des codons rares (Figures 19 et 22). En effet, nous observons que les espèces ARN associées au disome dans le contexte d'une dégradation de l'ARN-CGA auraient uniquement une origine de type 5'-3' exoribonucléolytique, nécessitant l'action conjointe des nucléases Xrn1 et Dxo1 (Figure 32). Ces observations permettraient de proposer une fois de plus que le disome ne serait pas compétent pour déclencher le clivage endoribonucléolytique du NGD, et qu'un seul clivage endoribonucléolytique serait seulement détectable à partir du troisième ribosome bloqué sur l'ARN aberrant.

Nous avons par ailleurs montré que, sur l'ARN tronqué, le disome formait une conformation assez stable (dans un contexte *Δdom34*) qui résistait quelque peu à un passage sur gradient de sucrose, à une collecte de fractions ainsi qu'à nos expériences visant à mesurer l'association des ribosomes aux différents fragments d'ARN comme le traitement *in vitro* des extraits par Xrn1 (Figures 17 et 26). Selon notre modèle, la constitution d'un disome serait le premier vrai « macro-signal » donné à la cellule d'un problème de décodage. De par sa conformation, il pourrait être détecté par différents facteurs tout en n'étant pas la cible d'un clivage direct de l'ARN. Ce disome pourrait aussi aider à conformer les ribosomes entrant en collision dans la configuration la plus propice à l'activation de la coupure endoribonucléolytique. Une étude récente menée sur l'ARN SDD1, une cible naturelle du NGD qui contient une succession de codons rares, appuie d'ailleurs notre modèle puisqu'elle indique que Hel2 ubiquitinerait préférentiellement, *in vivo*, le troisième ribosome bloqué sur cet ARN, alors que l'équipe faisait précédemment du disome la cible privilégiée pour cette modification par Hel2 (Ikeuchi *et al.*, 2019). De manière très intéressante, le trisome formerait une structure originale et divergente de celle observée lors de la reconnaissance du disome par Hel2 (Figures

37 et 11) (Matsuo *et al.*, 2020). L'existence d'une telle conformation et sa propension à être reconnue par Hel2 expliquerait plus aisément pourquoi nous détectons par nos approches le clivage endoribonucléolytique au troisième ribosome bloqué sur l'ARN. Plus précisément, en combinant nos différentes informations, nous ne pouvons que conclure à l'existence d'un clivage endoribonucléolytique aux abords du tunnel de sortie de l'ARN, exactement à 8 nucléotides en amont de son site P de ce troisième ribosome, certes loin du disome et du clivage NGD^{RQC+} décrit plus haut.

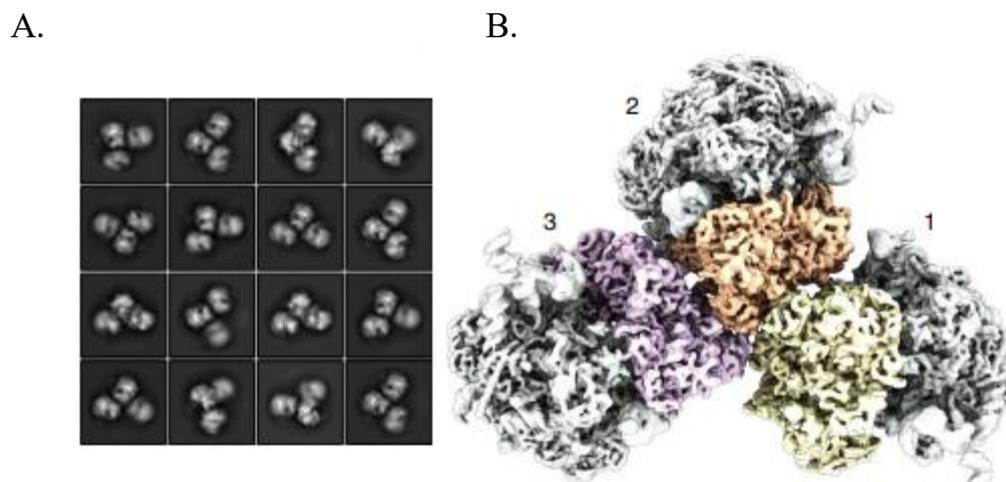


Figure 37 : Structure du trisome bloqué lors de la traduction d'un messenger aberrant.
(D'après Matsuo *et al.*, 2020)

(A) Représentation 2D du trisome détecté par microscopie et (B) sa structure déterminée par Cryo-EM. La numérotation des ribosomes est effectuée selon l'ordre 3'-5'.

3.2 Importance du clivage endonucléolytique dans la dégradation des ARN aberrants

Les récentes données présentes dans la littérature et les résultats que nous avons obtenus à partir des mutants *Δhel2* et *Δcue2* indiquent cependant que la coupure endonucléolytique n'est pas essentielle pour la cellule dans des conditions optimales de culture. Une petite mise en garde pourrait être que nous ne savons pas si les facteurs impliqués dans ce processus seraient essentiels lorsque les conditions environnementales sont modifiées. De la même manière, et à l'instar du système tmRNA/ArfA/ArfB chez les bactéries, des mécanismes redondants au clivage endonucléolytique pourraient permettre d'assurer la viabilité cellulaire en absence de celui-ci.

Ce qui est cependant clair est que le clivage endonucléolytique ne représente qu'une fraction des signaux que nous avons détectés par northern blot en comparaison à ceux produits

par l'exoribonucléase Xrn1. Ces observations, qui laisseraient supposer que le clivage endonucléolytique est un événement mineur, sont néanmoins à relativiser compte tenu des expériences que nous avons menées avec le double mutant $\Delta trl1/\Delta dom34$. En effet, dans ces conditions, nous avons constaté que le fragment ARN B4, qui est issu du clivage endonucléolytique, était significativement plus abondant que ce même fragment dans un contexte mutant $\Delta dom34$. Chose remarquable dans le mutant $\Delta trl1$, ce fragment est aussi nettement le plus abondant de tous les fragments ARN produits. De ce fait, il paraît simple de conclure que la phosphorylation de ces ARN est capitale pour leur dégradation. Par ricochet, il apparaîtrait assez logique d'en déduire que la production d'ARN 5'-hydroxylés est aussi une des plus importantes en comparaison, notamment, à la dégradation effectuée par Xrn1 à l'issue du décoiffage de l'ARN. En définitive, l'importance du clivage endonucléolytique se trouverait habituellement masqué par l'efficacité avec laquelle la cellule phosphoryle et élimine ces ARN.

Si nous acceptons donc que Trl1 a un rôle essentiel dans l'élimination de l'ARN B4 et que nous postulons que les fragments ARN B4 5'-phosphorylés ne peuvent être éliminés que par l'action de Xrn1 (+/-Dxo1) par la suite, nous devrions observer une quantité aussi importante de ces ARN B4 dans les contextes $\Delta trl1/\Delta dom34$ et $\Delta xrn1/\Delta dxo1/\Delta dom34$, or il n'en est rien puisque l'ARN B4 est de loin le plus abondant en l'absence de Trl1.

Il est donc possible que, dans un contexte génétique dans lequel la coupure endonucléolytique a lieu (contexte *CUE2 HEL2*, tout en gardant à l'esprit que nous étudions un mutant $\Delta dom34$), l'absence d'activité de Trl1 soit une réelle impasse pour assurer la dégradation de ces ARN de type B4 une fois produits. *A contrario*, dans un contexte génétique où la coupure endonucléolytique est rendue impossible (mutant $\Delta cue2$ ou mutant $\Delta hel2$), il apparaît que les exoribonucléases 5'-3' semblent très efficaces pour prendre en charge la dégradation des ARN. Nous pourrions ainsi convenir que les ribosomes en collision constituent différentes populations (optant des conformations différentes, et cela même peut être sur un même ARNm) qui seraient propices à l'activation de l'une ou l'autre de ces différentes voies de dégradation de l'ARN. A cet égard, nous avons constaté une augmentation de la quantité d'ARN B5 lorsque la reconnaissance des collisions de ribosomes par le facteur Hel2 était rendue impossible (mutation $\Delta hel2$, Figure 24). Il est donc tout à fait plausible que le train de ribosomes en collision favorise dans ce contexte $\Delta hel2$ des interactions permettant l'activation du décoiffage de l'ARN tronqué, et sa dégradation par Xrn1.

Il faut enfin noter que nous avons peu commenté la production de l'ARN B1b, qui correspondrait à une espèce clivée à la lisière du disome. Si nous appliquons un raisonnement similaire au précédent, c'est-à-dire que ce type d'ARN serait fortement produit mais rapidement dégradé, le fait que celui-ci ne soit en rien affecté en quantité dans tous les mutants de RNases testés, laisserait à penser que d'autres acteurs de la surveillance des messagers dans le cytoplasme restent à découvrir.

3.3 Le clivage endonucléolytique : la règle des 71 nucléotides ?

Depuis la découverte du NGD en 2006, l'identité de l'endoribonucléase impliquée dans cette voie restait jusqu'à très récemment inconnue. Il a ainsi été proposé que Cue2, une protéine possédant un domaine endonucléolytique très conservé, était responsable du clivage des ARN aberrants ciblés par le NGD (D'Orazio *et al.*, 2019 ; Glover *et al.*, 2020). Selon l'étude menée par le laboratoire de Rachel Green, Cue2 serait responsable d'un clivage endonucléolytique qui interviendrait entre le premier et le second nucléotide présents dans le site A du deuxième ribosome bloqué (Figure 38A).

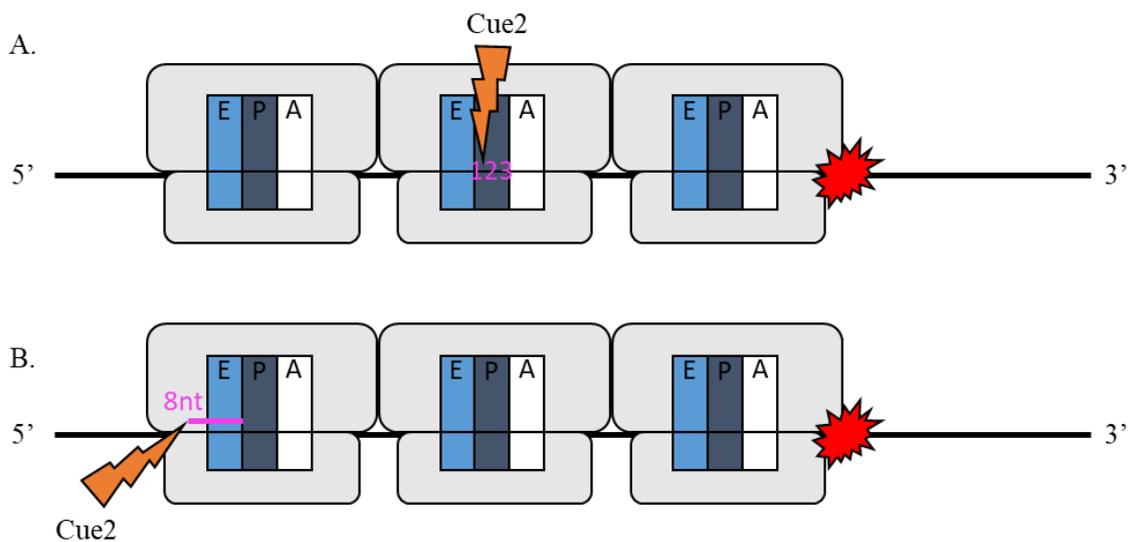


Figure 38 : Modèles d'action de Cue2 au niveau des ribosomes bloqués en cours d'élongation.

(A) Modèle proposé par D'Orazio *et al.*, 2019. Cue2 (en orange) est responsable d'un clivage intervenant entre le premier et le second nucléotide (en rose) d'un codon présent dans le site A. (B) Modèle établi à partir des données de notre étude. Cue2 cliverait à 8 nucléotides en amont du site P du ribosome.

Ce modèle conteste nos observations selon lesquelles le clivage endoribonucléolytique interviendrait au niveau du tunnel de sortie de l'ARN au troisième ribosome bloqué (Figure 38B).

Sans pouvoir expliquer toutes nos divergences, certaines données que nous avons obtenues pourraient permettre de comprendre pourquoi il est proposé que le clivage interviendrait à l'intérieur du site A du ribosome (D'Orazio *et al.*, 2019). Nous avons effectivement montré que le clivage avait lieu à 71 nucléotides en amont de l'élément de blocage de la traduction, soit à 8 nucléotides en amont du site P du troisième ribosome bloqué, créant ainsi une coupure de l'ARN dans la phase +1 de la traduction (Figures 39A et 39B). Nous avons aussi constaté que, après le clivage, les ribosomes présents sur le fragment 5'-NGD redémarreraient la traduction pour bloquer sur cette nouvelle extrémité 3' (Figure 21). De ce fait, les ribosomes possèdent alors un nucléotide dans leur site A. L'utilisation du ribosome profiling sur ces ARN générerait donc comme le décrit le groupe de R. Green plusieurs types de fragments d'ARN. Il serait produit par cette technique, d'une part, des fragments de 28 nucléotides qui correspondraient à des ARN qui seraient, par exemple, intégralement couverts par le second ribosome bloqué sur l'ARN 5'-NGD (Figure 39C). D'autre part, le ribosome nouvellement placé en 3' du fragment 5'-NGD protégerait alors 16 nucléotides dont le nucléotide le plus en 3' serait positionné dans le site A (Figure 39C). L'ensemble de ces éléments ne permet donc pas pour l'instant d'écarter notre modèle selon lequel le clivage endonucléolytique du NGD, est certes dépendant de Cue2 et Hel2 mais interviendrait en amont du site P et non directement au site A du ribosome.

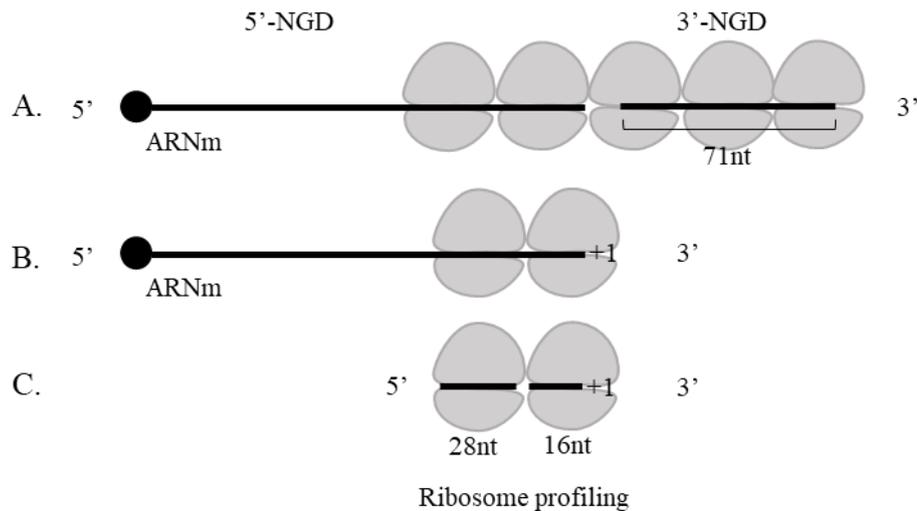


Figure 39 : Effet du ribosome profiling sur l'ARN 5'-NGD.

(A) Intervention du clivage endonucléolytique à 71 nucléotides de l'évènement de blocage des ribosomes, créant un nouvel ARN 5'-NGD tronqué et un ARN 3'-NGD (B) Les ribosomes présents sur l'ARN 5'-NGD reprennent alors la traduction pour se bloquer avec un nucléotide dans leur site A. (C) Représentation schématique de l'effet qu'aurait la RNase utilisée au cours d'un ribosome profiling sur les fragments 5'-NGD décrits en B. La taille des fragments produits est indiquée en nucléotides (nt).

4 Importance du NGD dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et conservation phylogénétique

Nous avons montré que le clivage endoribonucléolytique assuré par le NGD était à l'origine de la production d'un grand nombre d'ARN 5'-OH dans le cytoplasme. Ce phénomène fait écho à certaines observations qui ont déjà été rapportées.

En effet, une étude a permis de proposer qu'il existerait des coupures endoribonucléolytiques, appelées ribothrypsis, capables de cliver les ARN messagers canoniques lors de ralentissements de la traduction. La nucléase responsable de cette activité est inconnue mais les clivages qui lui sont associés semblent intervenir au niveau de la sortie de l'ARN hors du ribosome, ce qui laisse entrevoir que ce mécanisme pourrait s'apparenter au NGD (Ibrahim *et al.*, 2018). A cet égard, le clivage responsable de la production de l'ARN B1b mentionné ci-dessus pourrait être apparenté à ce phénomène. En parallèle de cette étude, une analyse globale a été réalisée par l'équipe de Jay Hesselberth qui propose que des ARN 5'-OH pourraient être produits par l'intermédiaire de clivages endonucléolytiques qui interviendraient également sur des ARN messagers canoniques (Peach *et al.*, 2015). Une corrélation entre ce phénomène et la présence de codons polybasiques a d'ailleurs été constatée, ce qui suggère

fortement que des ralentissements des ribosomes seraient à l'origine d'une partie de la production de ces fragments d'ARN 5'-OH.

Il est tout à fait envisageable que le phénomène de ribothrypsis soit à l'origine des clivages qui ont été caractérisés par l'étude de Jay Hesselberth. De par les similarités que présentent ce mécanisme et le NGD, il est possible que ces deux phénomènes ne se distinguent, en réalité, que par la nature des substrats ciblés. Il n'est donc pas exclu que le NGD/ribothrypsis puisse participer à la régulation de l'expression de nombreux messagers canoniques dans le cytoplasme. Un des avantages qu'apporterait ce système à la cellule serait de permettre de cibler de manière spécifique certains ARN afin de pouvoir faire varier leur abondance rapidement en cas de variations des conditions environnementales.

A ce titre, il est pertinent de s'intéresser à la conservation du NGD et de Cue2 au sein des eucaryotes. Des études phylogénétiques ont permis de montrer que les domaines nucléases de type SMR étaient présents dans l'embranchement des eucaryotes et des procaryotes (Liu *et al.*, 2013). Des analyses *in silico* proposent d'ailleurs que Cue2 posséderait un domaine SMR avec une structure proche de celui présent à l'extrémité C-terminale du facteur de traduction bactérien IF3. Du fait de l'existence d'homologues de Cue2 dans la majorité des clades existants chez les eucaryotes, il est proposé que ce facteur protéique puisse avoir été hérité de l'ancêtre commun à tous les eucaryotes (Glover *et al.*, 2020).

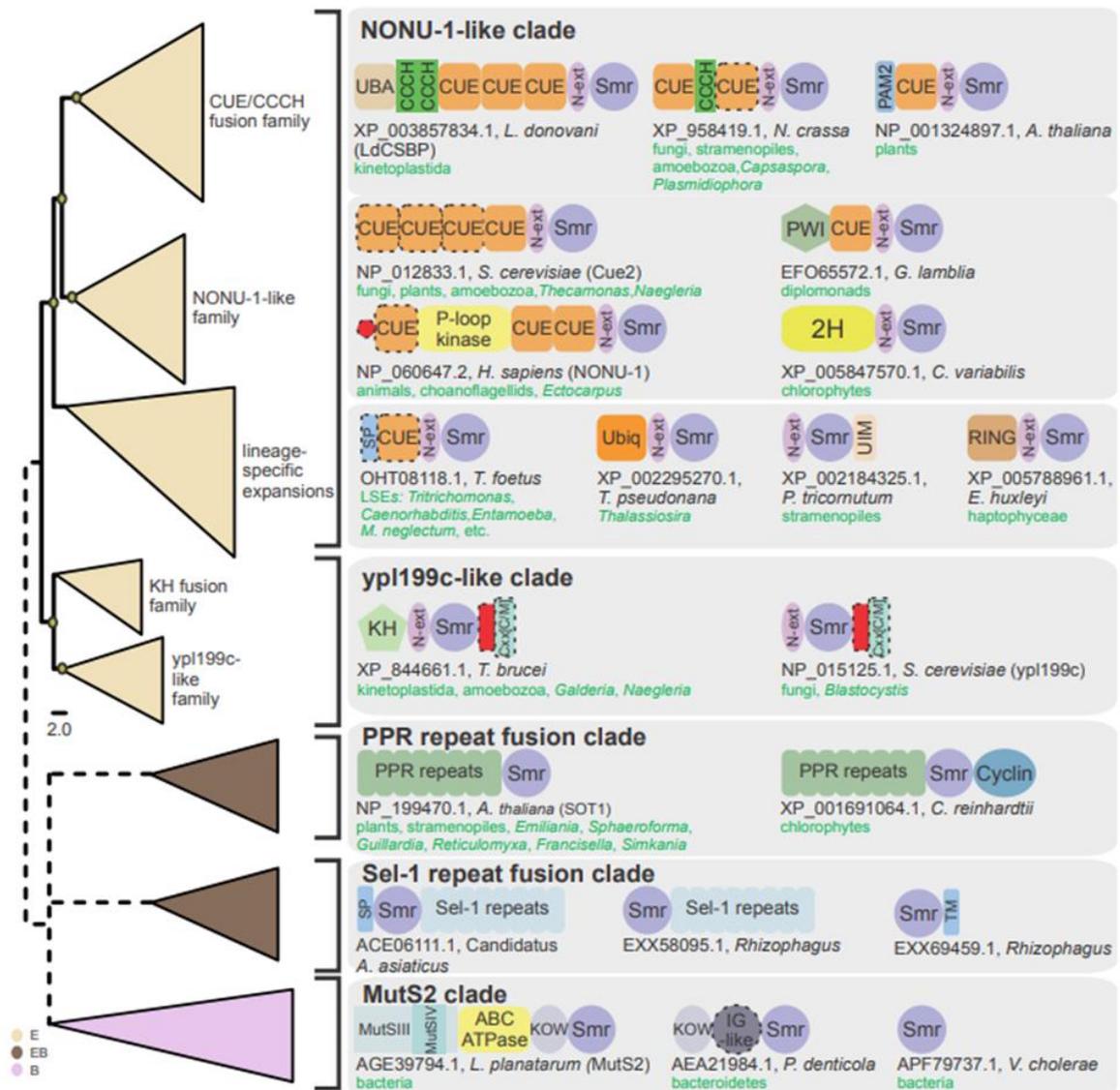


Figure 40 : Conservation du domaine SMR et de ses domaines associés. (D'après Glover et al., 2020)

Les pointillés représentent des incertitudes du placement phylogénétique. Le nom des différentes formes de Cue2 est indiqué en noir (gras) et leur répartition phylogénétique est indiquée en rose (Bactérie), marron (Bactérie et Eucaryotes) et en beige (Eucaryotes).

Etonnamment, il existe une forte variabilité des domaines non-SMR que l'on peut trouver chez les homologues de Cue2, ce qui suggère que le domaine SMR serait l'élément central de cette protéine. On trouve notamment chez les métazoaires et choanoflagellés des domaines de kinase ARN (domaine P-Loop) qui sont directement associés au domaine SMR de Cue2 (Figure 40). Ce fait est particulièrement intéressant puisqu'il est montré que Trl1 n'est pas conservée dans ces embranchements (Burroughs and Aravind, 2016 ; Glover et al., 2020). Il est donc envisageable que le mécanisme du NGD ait pu être conservé en dépit de la perte de

Trl1 dans certains organismes. Chez ces derniers, Cue2 posséderait une double fonction de clivage et de phosphorylation des ARN qui permettrait de favoriser l'élimination des produits du NGD par l'intermédiaire des voies générales de la dégradation 5'-3' des ARN messagers.

5 Etude en cours : les ARN aberrants insensibles au NGD

Au cours de notre étude, nous nous sommes concentrés sur le déclenchement du NGD par l'intermédiaire d'évènements tardifs de blocage des ribosomes au sein de la séquence codante.

Cependant, compte tenu des divers éléments possibles à l'origine du blocage de ribosomes (*Introduction 1.1*), il est tout à fait envisageable qu'un ribosome puisse s'immobiliser de manière précoce sur une séquence codante. Il est d'ailleurs concevable que, dans ces conditions, l'absence de collision entre les ribosomes bloqués puisse limiter l'intervention de Hel2, et donc du NGD sur de tels ARN. En plus de l'accumulation d'ARN aberrants dans le cytoplasme, les effets sur la cellule de la non-activation du NGD pourraient être aussi aggravés du fait que les peptides naissants seraient alors trop courts, en partie protégés par le ribosome et donc difficilement accessibles pour activer le RQC. Il est donc certainement crucial pour la cellule de parvenir à éliminer ces messagers et ces micropeptides naissants qui pourraient à terme être toxiques.

Nous avons ainsi récemment initié un projet visant à comprendre les mécanismes qui ont pu être mis en place par la levure pour dégrader cette classe particulière de messagers aberrants. Nous avons ainsi adopté une approche similaire à celle que nous avons menée sur l'ARN1 et l'ARN-CGA.

Dans un premier temps, nous avons utilisé des ARN courts comportant une série de 4 codons rares placés aux 36^{ème} ou 75^{ème} nucléotide en aval de l'ATG (ARN-CGA³⁶ ou ARN-CGA⁷⁵) qui limiterait leur association à deux et trois ribosomes respectivement. L'utilisation de ces constructions nous a permis de révéler l'importance de la voie de dégradation 5'-3' dans l'élimination des ARN présentant des blocages précoces de la traduction. En effet, nous avons constaté que le fragment d'ARN résultant de la dégradation des ARN-CGA^{36/75}, détecté dans une souche sauvage, était totalement absent dès lors que Xrn1 était inactivée. Il semblerait donc, que, conformément à ce que nous avons imaginé, les blocages précoces de la traduction limitent fortement le déclenchement du clivage endonucléolytique du NGD.

Pour aller plus loin et pour conforter cette hypothèse, nous avons utilisé la capacité de l'ARN tronqué à déclencher des clivages NGD très localisés afin de pouvoir les étudier avec précision. Pour ce faire, nous avons construit plusieurs plasmides capables d'exprimer des ARN tronqués par des ribozymes « *hammerhead* » positionnés en aval de l'ATG (Figure 41B). Conformément à nos précédentes approches, nous avons analysé ces ARN dans un contexte de mutation du gène *DOM34* (*Résultats 2.1*). Par northern blot, avec une sonde s'hybridant en 3' des ARN tronqués, nous avons constaté que la taille de l'ARN influait fortement sur sa capacité à être clivé en ARN de type B4 (B4-like), associés au déclenchement du clivage endoribonucléolytique du NGD. En effet, alors qu'avec un ARN de 168 nucléotides nous détectons aisément un fragment B4-like, nous constatons que son abondance décroît progressivement avec le raccourcissement de la séquence codante de l'ARN tronqué (RNA-138nt et RNA-111nt) (Figure 41B). Par ailleurs, il faut noter que, contrairement à ce que nous avons observé pour l'ARN1, les ARN tronqués courts sont particulièrement sensibles à l'exosome cytoplasmique. De ce fait, il est très difficile d'étudier le rôle que joue Xrn1 dans l'élimination de tels ARN. Cependant, l'ensemble de observations que nous avons effectué sur les ARN tronqués courts permettent de conforter notre hypothèse selon laquelle le clivage endoribonucléolytique du NGD n'est pas efficacement déclenché dès lors que des blocages des ribosome interviennent de manière précoce sur l'ARN.

Il se pose alors la question du mécanisme pouvant être impliqué dans la dégradation des ARN porteurs de ribosomes bloqués à proximité du codon initiateur de la traduction. En effet, les ribosomes associés à ces ARN, majoritairement dégradés par Xrn1, ne semble pas compétents au clivage endonucléolytique, probablement du fait qu'ils ne sont pas reconnus par l'ubiquitine ligase Hel2. Il est possible que, à l'image du phénomène que nous avons constaté avec l'ARN1 dans un mutant $\Delta hel2$ (Figure 24), il puisse exister un autre mécanisme capable de favoriser le décoiffage des ARN associés à des blocages précoces de la traduction, ce qui expliquerait leur sensibilité particulière à la ribonucléase Xrn1. Ce mécanisme, s'il existe, pourrait faire intervenir des protéines impliquées dans le décoiffage des ARN par l'intermédiaire, de la séquence poly(A) de ces messagers, où, directement *via* de interactions avec les ribosomes bloqués. A ce titre, nous avons obtenu des données préliminaires encourageantes suggérant que le recrutement de facteurs comme Pat1 ou Lsm1 pourrait être favoriser sur les ARN-CGA^{36/75} en comparaison à un ARN contrôle dépourvu de codons rares.

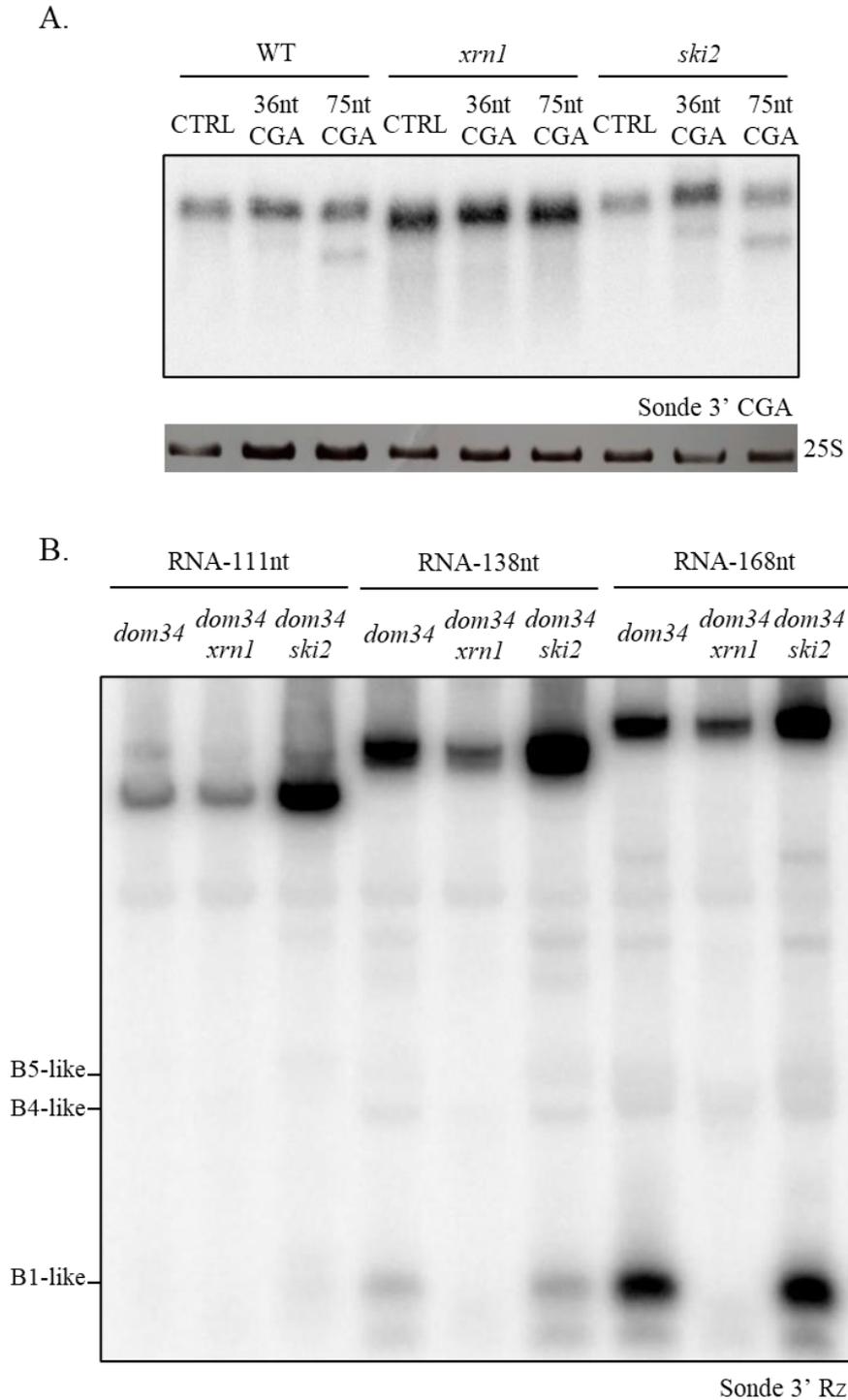


Figure 41 : Déclenchement du NGD et importance de *Xrn1* lors de l'élimination d'ARN comportant des blocages précoces de la traduction.

(A) Des ARN totaux provenant de souches transformées avec les constructions ARN-CGA^{36/75} ont été séparés sur gel d'agarose 1.8% avant d'être révélés avec une sonde s'hybridant en 3' des codons rares. (B) Issus d'une construction plasmidique, des ARN tronqués possédant de courtes séquences codantes (111, 138 ou 168 nt) ont été séparés par gel d'acrylamide 8% avant d'être sondés, par northern blot, au niveau de leur extrémité 3'.

6 Conclusion

La stratégie que nous avons adoptée dans le but d'étudier le NGD nous a permis de d'apporter de nouvelles informations sur les facteurs et les mécanismes mis en jeu. Grâce à l'utilisation d'un ARN tronqué, nous avons établi une cartographie précise des clivages intervenant sur cette cible du NGD. Ainsi, nous démontrons que Xrn1, en butant sur les ribosomes bloqués, est responsable de la production de fragments ARN NGD particulièrement abondants. Cette production de fragments résulte d'ailleurs de la prise en charge par Xrn1 soit des ARN pleine longueur après la perte de leur coiffe, ou bien soit par l'attaque directe des extrémités produites lors du clivage endoribonucléolytique. De la même manière, nous avons démontré que l'exoribonucléase 5'-3' Dxo1 est impliquée dans l'élimination des ARN aberrants. Cependant, son rôle dans ce phénomène n'est pour l'instant observé que dans un contexte d'inactivation de Xrn1.

Nous avons donc obtenu une cartographie précise des attaques exoribonucléolytiques et des sites de clivage produits par l'endoribonucléase du NGD. Nous avons montré que l'activité endoribonucléolytique dépend de l'accumulation d'au moins trois ribosomes en cours de collision sur l'ARN tronqué. Le clivage qui en résulte s'effectue de manière interne au troisième ribosome dès la sortie de l'ARN hors de ce dernier, soit à 8 nucléotides en amont de son site P. A la suite de ce clivage dépendant de Hel2 et Cue2, le fragment 5'-NGD, qui possède une extrémité 5'-hydroxylée, est alors phosphorylé par Trl1, ce qui permet son élimination rapide par Xrn1 ou alternativement son attaque par Dxo1. A l'aide d'une construction exprimant un ARN contenant des codons rares, nous avons ensuite démontré que le modèle d'action du NGD que nous avons établis à l'aide de l'ARN tronqué était transposable aux autres substrats de cette voie de surveillance.

Malgré l'abondance d'études qui ont été publiées sur le sujet ces dernières années, de nombreuses zones d'ombre persistent concernant le recrutement et la mise en place du NGD au niveau des ribosomes bloqués sur les messagers aberrants. Notre étude a permis d'élaborer un modèle précis de l'intervention du NGD, ce qui nous a permis d'identifier deux nouveaux acteurs du système. Néanmoins, nos observations montrent que cette voie de surveillance est complexe et que de nombreux acteurs annexes au clivage endonucléolytique sont nécessaires au bon déroulement des événements dans le cytoplasme. Compte tenu des évolutions rapides des modèles d'action du NGD dans la littérature, il est fort probable que de nouveaux acteurs de ce système soient mis en évidence dans les années à venir.

MATERIELS ET METHODES

1 Culture des cellules

Les levures sont ensemencées dans un milieu minimum SD-leucine et incubées sous agitation la nuit à 28°C (milieu liquide composé de 1,7 g/L YNB (Yeast Nitrogen Base), 5 g/L de sulfate d'ammonium et 20 g/L de glucose et complété des acides aminés à l'exception de la leucine afin de maintenir le plasmide p415 et ses dérivés. Le lendemain, les cellules issues de cette pré-culture sont ensemencées à une DO (densité optique) de 0,2 et mises sous agitation à 28°C pour atteindre la phase de croissance exponentielle. Les cellules seront prélevées à DO 0,8 et culottées par centrifugation. La prise des cellules est effectuée selon un volume défini par le type d'analyse désirée (voir préparation d'ARN totaux ou préparation d'extraits pour l'analyse des polysomes).

2 Extraction des ARN totaux

Les culots de levures (culot correspondant à 10 OD_{600nm}/ml) sont resuspendues dans 500 µL de tampon AE (50 mM Acétate de sodium (AcNa), pH 5,3 et 10 mM EDTA) puis 1% de SDS est ajouté. La première étape de l'extraction consiste à lyser les cellules au vortex après addition de 500 µL de phénol à 4°C. La lyse des levures est poursuivie à 65°C pendant 10 minutes. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés avec la phase organique après centrifugation durant 20 minutes à 13 000 rpm. Une nouvelle purification de la phase aqueuse est effectuée dans 400 µL de phénol chloroforme (1 :1) après centrifugation à 13 000 rpm durant 10 minutes. Les ARN présents dans le surnageant sont alors récupérés puis mis à précipiter à -20°C durant la nuit dans 1mL d'éthanol 100% + 6% à 12% µL AcNa et 20 µg/mL de glycogène. Après précipitation des ARN, les sels et l'éthanol sont éliminés et le culot est repris dans 40 µL H₂O. Le dosage des ARN s'effectue ensuite au Nanodrop® à une longueur d'onde de 260nm.

3 Préparation des extraits cellulaires pour l'analyse des polysomes

Les cellules (culot correspondant à 160 OD_{600nm}/ml) sont resuspendues dans 500 uL de tampon de lyse (10 mM Tris HCL pH7,4, 100 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 1 mM DTT + 0,5 mg.L⁻¹ Héparine). Un volume de bille est ajouté et les échantillons sont vortexés pendant trois séries de 5 minutes à 4°C, espacées de 2 minutes dans la glace. La clarification des lysats est réalisée trois fois par l'élimination du culot après centrifugation des échantillons à 13000 rpm durant 5 minutes à 4°C.

4 Traitement des ARN *in vitro*

4.1 Traitement des extraits cellulaires par Xrn1

L'équivalent de 20 OD₂₆₀ d'extraits cellulaires sont repris dans un tampon NEBuffer 3 biolabs® (100 mM, NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂ et 1 mM DTT). La digestion des ARN par 1U de Xrn1 (produite par biolabs®) est effectuée à 30°C pour 20µg d'ARN. Durant la cinétique, 5µg d'ARN

sont prélevés à chaque temps et la réaction est arrêtée par le traitement des ARN au phénol (*Matériels et méthodes (2)*).

4.2 Discrimination de l'extrémité 5' d'un ARN par traitement T4 polynucléotide kinase

Le traitement de 7 µg d'ARN totaux est effectué par l'ajout de 1U de T4 polynucléotide kinase (biolabs) et/ou 1U de Xrn1 dans un tampon de réaction T4 polynucléotide kinase NEB (70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT à pH 7.6) pendant 30 minutes à 25°C. La réaction est ensuite arrêtée avec de la formamide avant un traitement thermique des ARN à 85°C pendant 5 minutes.

5 Réalisation des gradients de saccharose

Les gradients sont composés de cinq couches de tampon 1X (50 mM Tris HCl pH 7,4, 50 mM NH₄Cl, 1 mM DTT et 12 mM ou 30 mM MgCl₂) différant chacune par leur composition en saccharose. Le coussin 50% de saccharose est d'abord coulé dans des tubes pour ultracentrifugation puis congelé à -80°C. Les solutions tampon 1X avec saccharose 40%, 30%, 20% ou 10% sont ensuite coulées selon le même protocole les unes à la suite des autres.

6 Ultracentrifugation des extraits cellulaires et purification des polysomes

Les extraits cellulaires, composés entre autres d'ARNm associés aux ribosomes, sont déposés sur le haut des tubes contenant les gradients de saccharose. Ces tubes sont ensuite déposés dans le rotor SW-41 pour être centrifugés durant trois heures à 39 000 rpm, à 4°C.

Après centrifugation, les ARN séparés dans les gradients selon le nombre de ribosomes qui leur sont associés sont poussés vers un collecteur par l'injection d'une solution de saccharose 70%. La récupération des fractions contenant un, deux, trois, quatre ou cinq ribosomes est déterminée selon un profil obtenu par une mesure d'absorbance à 254 nm.

7 Marquage d'une sonde ADN au P₃₂

Le marquage de la sonde ADN est effectué dans une solution contenant 3,3 µM de sonde ADN à marquer, 1X de PNK buffer (70 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, pH 7.6), 10U de PNK et 3 µL de γATP₃₂. La sonde est marquée à son extrémité 5' durant 30 minutes d'incubation à 37°C. La radioactivité libre est ensuite éliminée après chromatographie d'exclusion sur une colonne séphadex G25 et la sonde radioactive est récupérée de l'éluat.

8 Northern blot sur gel d'acrylamide 8%

Un gel dénaturant de polyacrylamide est coulé (7M urée, 6% ou 8% acrylamide 19:1, 89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, 0,1% APS et 1/1000 du volume final de Temed. La migration des ARN mélangés à de la formamide se fait durant 3h30 avec un voltage constant de 50V dans un tampon de migration

Tris-borate EDTA 1X (TBE) (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.3). Les ARN sont transférés à 4°C sur membrane de nylon dans un tampon de transfert TBE 0,5X pendant 1h30 avec un ampérage limitant de 200A avant d'être liés à la membrane par un traitement aux UV (120 mJ/cm²).

La membrane est ensuite pré-hybridée à 42°C pendant une heure dans une solution d'hybridation Roti[®]-Hybri-Quick puis la sonde radioactive (II-d) est ajoutée durant la nuit à une concentration finale de 3,3 nM à la même température. La membrane est lavée dans une solution SSC 5X (0,75 M NaCl, 75mM citrate trisodium, 0,1% SDS à pH 7.0), puis deux fois consécutives dans une solution de SSC 1X. Un écran est exposé à la membrane, la révélation du signal est effectuée au « phosphoimager » typhoon.

8.1 Variante de migration : séparation d'un ARN selon la nature de son extrémité 5'

Un gel de TBE+polyacrylamide 12% est utilisé pour séparer les ARN mélangés à de la formamide. La migration s'effectue dans un tampon de migration Tris-borate EDTA 1X (TBE) (89 mM Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8.3) puis les ARN sont transférés à 4°C sur membrane de nylon dans un tampon de transfert TBE 0,5X durant la nuit avec un voltage limitant de 12V avant d'être liés par un traitement aux UV (120 mJ/cm²).

9 Northern blot sur gel d'agarose

La séparation des ARN sur un gel d'agarose 1,8% (TBE 1X, BET 0,5µg/ml) s'effectue durant 2h à 80V constants. Après migration, les ARN sont transférés durant 1h30 à 12V constants sur une membrane de nylon puis fixés sous illumination aux UV (120 mJ/cm²). Les protocoles d'hybridation et de révélation sont identiques aux conditions utilisées pour les gels d'acrylamide (*Matériels et méthodes* (8)).

10 Transcription inverse

5 µg d'ARN totaux (*Matériels et Méthodes* (2)) sont mis en présence de 15 pmol d'un oligonucléotide radiomarqué au P₃₂ (*Matériels et méthodes* (7)) dans une solution contenant 0.5Mm de dNTP. Les ARN sont dénaturés 5 minutes à 65°C puis 4U de transcriptase inverse Invitrogen[™] sont ajoutées. Seuls les ARN capables de s'hybrider avec l'oligonucléotide sont rétrotranscrits en ADN complémentaire pendant 30 min à 50°C. La réaction est arrêtée par un traitement de 5 minutes à 85°C.

En parallèle, un séquençage de l'ARN ciblé est effectué par une variante de la méthode Sanger (USB Thermo© Sequenase Cycle Sequencing Kit). Le séquençage de l'ARN s'effectue par une transcription inverse initiée par un oligonucléotide radiomarqué au P₃₂. L'élongation de la Thermostenase est bloquée aléatoirement par 1,5 µM de didésoxyribonucléotides (ddGTP ou ddATP ou ddCTP ou ddTTP) dans le milieu réactionnel (50 mM TrisHCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT,

0,5% tween-20 et 150 μ M dNTP). Soixante cycles de PCR assurent la dénaturation (95°C, 30 sec) et l'élongation des ADN (60°C, 1min).

L'analyse des produits se fait sur un gel dénaturant d'acrylamide (7M urée, 6% acrylamide (19 :1) et TBE 1X). Après avoir préchauffé le gel, les ADN sont migrés à une puissance constante de 60 W. Le gel est ensuite pelé sur un papier Wattman puis mis à sécher sous vide pendant une heure. L'exposition et la révélation du gel s'effectuent selon le protocole (*Matériels et méthodes (8)*).

11 Identification des fragments 3' NGD par 3'-RACE

Le protocole suivant est dérivé des travaux de Adkar-Purushothama *et al.*, 2017. 5 μ g d'ARN totaux sont d'abord déphosphorylés durant 1h à 37°C par l'utilisation de 10U de T4 polynucléotide kinase dans le tampon kinase biolabs[®] dépourvu d'ATP. La ligation de l'ARN-linker contenant une séquence universelle (Universal miRNA cloning linker, NEB) est ensuite réalisée durant 4h à 22°C par l'ajout de 10U de T4 RNA Ligase 2 « truncated » (biolabs[®]). Une étape de transcription inverse est ensuite effectuée avec l'oligonucléotide 3'-univ spécifique à la séquence du linker utilisée selon le protocole décrit (Adkar-Purushothama *et al.*, 2017). A la suite de l'élimination des ARN par l'action de la RNase 1 durant 30min à 37°C, une PCR destinée à amplifier le fragment potentiel 5'-NGD est réalisée avec les amorces 3'-univ et 5'-3' RACE. Le produit de la réaction est ensuite migré sur un gel d'agarose 2% puis purifié à l'aide du kit Qiagen « for DNA extraction ». Les ADN obtenus sont ensuite clonés dans un plasmide Zero Blunt TOPO PCR Cloning vector (Invitrogen) afin d'être amplifiés puis séquencés.

12 Liste des souches

N°	Alias	Génotype	Origine
BY4741	<i>WT</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	Euroscarf
Y05329	<i>Δdom34</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dom34::kanMX4	Euroscarf
BY1175 6	<i>Δmet22</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 met22::kanMX4	Euroscarf
Y04540	<i>Δxrn1</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 xrn1::kanMX4	Euroscarf
Y05307	<i>Δski2</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 ski2::kanMX4	Euroscarf
YLB152	<i>Δdxo1</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dxo1::kanMX4	Euroscarf
YLB082	<i>Δski2/Δdom34</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ski2::kanMX4 dom34::natMX6	Notre étude
YLB083	<i>Δxrn1/Δdom34</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 xrn1::kanMX4 dom34::natMX6	Notre étude
YLB178	<i>Δdxo1/Δdom34</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dxo1::kanMX4 dom34::natMX6	Notre étude
YLB179	<i>Δxrn1/Δdxo1/Δdom34</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dxo1::kanMX4 xrn1::hphMX4 dom34::natMX6	Notre étude
YLB303	<i>Δhel2/Δdom34</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hel2::kanMX4 dom34::natMX6	Notre étude
YJC432	<i>Δdcp2</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dcp2::neoMX	Jeff Coller
YLB156	<i>Δdcp2/Δdom34</i>	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dcp2::neoMX dom34::natMX6	Notre étude
YJH682	<i>WT</i>	MATa leu2-3 112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2- 1 his3-11,15	Jay Hesselberth
YJH835	<i>Δtrl1</i>	MATa leu2-3 112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2- 1 his3-11,15 trl1::KanMX (pAG424-10x-tRNA)	Jay Hesselberth
YLB313	<i>Δdom34</i>	MATa leu2-3 112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2- 1 his3-11,15 dom34::NatMX	Notre étude
YLB317	<i>Δtrl1/Δdom34</i>	MATa leu2-3 112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2- 1 his3-11,15 trl1::KanMX (pAG424-10x-tRNA) dom34::NatMX	Notre étude

13 Liste des oligonucléotides

Nom	Alias	Séquence (5'-3')
olb917	3'-Rz	ACGGTGGATCCGGATCCTGCTC
olb622	3'-rare	CCGGGCATATGTCAACCACCTC
olb621	5'-Rz	GGCGTAATCTGGAACATCGTATG
olb994	5'-B4	CGTTTTGCTGGCCGCATCTTCTC
olb937	3'-univ	ATTGATGGTGCCTACAG
olb1101	5'-3' RACE	GCTAAGGTAGAGGGTGAAC
olb1058	New-3'	AATATGCTTCCCAGCCTG
olb1117	7Int-CGA	GCTGGCCGCATCTTCTC
olb933	reverse-CGA	GTTGTTCGATGGTATCGGAAGATTC
olb1104	5'-3' RACE-CGA	GCAGGCTGGGAAGCATAT
olb378	SCR1	GTCTAGCCGCGAGGAAGG
olb25S	25S	ATCCGCTAAGGAGTGTGTAACAACCTCACC
olb18S	18S	AGCCATTCGCAGTTTCACTG
olb959	5S	CTACTCGGTCAGGCTCTTAC
olb1112	5,8S	CCAAGAGATCCGTTGTTGAAAG

BIBLIOGRAPHIE

Adham, I.M., Sallam, M.A., Steding, G., Korabiowska, M., Brinck, U., Hoyer-Fender, S., Oh, C., Engel, W., (2003) Disruption of the pelota gene causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1470–1476.

Adkar-Purushothama, C.R., Bru, P., Perreault, J.-P., (2017) 3' RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends for validating viroid induced cleavage at the 3' extremity of the host mRNA. *J. Virol. Methods* 250, 29–33.

Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., Tollervey, D., (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.* 18, 5399–5410.

Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajiho, H., Hoshino, S., Katada, T., (2001) Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 20, 4684–4693.

Arigo, J.T., Eyler, D.E., Carroll, K.L., Corden, J.L., (2006) Termination of cryptic unstable transcripts is directed by yeast RNA-binding proteins Nrd1 and Nab3. *Mol. Cell* 23, 841–851.

Asano, K., Clayton, J., Shalev, A., Hinnebusch, A.G., (2000) A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* 14, 2534–2546.

Atkinson, G.C., Baldauf, S.L., Hauryliuk, V., (2008) Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. *BMC Evol. Biol.* 8, 290.

Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y. C., Collart, M. A., Liu, H. Y., & Denis, C. L. (1999) The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Molecular and cellular biology*, 19(10), 6642–6651. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.10.6642>

Balistreri, G., Horvath, P., Schweingruber, C., Zünd, D., McInerney, G., Merits, A., Mühlemann, O., Azzalin, C., Helenius, A., (2014) The host nonsense-mediated mRNA decay pathway restricts Mammalian RNA virus replication. *Cell Host Microbe* 16, 403–411.

Barciszewski, J., Barciszewska, M.Z., Siboska, G., Rattan, S.I., Clark, B.F., (1999) Some unusual nucleic acid bases are products of hydroxyl radical oxidation of DNA and RNA. *Mol. Biol. Rep.* 26, 231–238.

Barends, S., Wower, J., Kraal, B., (2000) Kinetic parameters for tmRNA binding to alanyl-tRNA synthetase and elongation factor Tu from Escherichia coli. *Biochemistry* 39, 2652–2658.

Barthelme, D., Dinkelaker, S., Albers, S.-V., Londei, P., Ermler, U., Tampé, R., (2011) Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 3228–3233.

Bellacosa, A., Moss, E.G., (2003) RNA repair: damage control. *Curr. Biol.* 13, R482-484.

- Bengtson, M.H., Joazeiro, C.A.P., (2010) Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* 467, 470–473.
- Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., Yusupov, M., (2010) Crystal structure of the eukaryotic ribosome. *Science* 330, 1203–1209.
- Bessho, Y., Shibata, R., Sekine, S., Murayama, K., Higashijima, K., Hori-Takemoto, C., Shirouzu, M., Kuramitsu, S., Yokoyama, S., (2007) Structural basis for functional mimicry of long-variable-arm tRNA by transfer-messenger RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8293–8298.
- Bird, J.G., Zhang, Y., Tian, Y., Panova, N., Barvík, I., Greene, L., Liu, M., Buckley, B., Krásný, L., Lee, J.K., Kaplan, C.D., Ebright, R.H., Nickels, B.E., (2016) The mechanism of RNA 5' capping with NAD⁺, NADH and desphospho-CoA. *Nature* 535, 444–447.
- Boeck, R., Tarun, S., Rieger, M., Deardorff, J.A., Müller-Auer, S., Sachs, A.B., (1996) The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J. Biol. Chem.* 271, 432–438.
- Boehm, V., Haberman, N., Ottens, F., Ule, J., Gehring, N.H., (2014) 3' UTR length and messenger ribonucleoprotein composition determine endocleavage efficiencies at termination codons. *Cell Rep* 9, 555–568.
- Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., Conti, E., (2009) The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell* 139, 547–559.
- Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., Tollervey, D., (2000) Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. *Cell* 102, 765–775.
- Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M., Séraphin, B., (2000) A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* 19, 1661–1671.
- Brandman, O., Hegde, R.S., 2016. Ribosome-associated protein quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 7–15.
- Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.-W., Zhou, S., King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., Dunn, J.G., Rouskin, S., Inada, T., Frost, A., Weissman, J.S., (2012) A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 151, 1042–1054.
- Braun, J.E., Tritschler, F., Haas, G., Igreja, C., Truffault, V., Weichenrieder, O., Izaurralde, E., (2010) The C-terminal alpha-alpha superhelix of Pat is required for mRNA decapping in metazoa. *EMBO J.* 29, 2368–2380.
- Bresson, S., Tollervey, D., (2018) Tailing Off: PABP and CNOT Generate Cycles of mRNA Deadenylation. *Mol. Cell* 70, 987–988.
- Bresson, S., & Tollervey, D. (2018). Surveillance-ready transcription: nuclear RNA decay as a default fate. *Open biology*, 8(3), 170270.

- Briggs, M.W., Burkard, K.T., Butler, J.S., (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.* 273, 13255–13263.
- Brown, C.E., Sachs, A.B., (1998) Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6548–6559.
- Brown, C.E., Tarun, S.Z., Boeck, R., Sachs, A.B., (1996) PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5744–5753.
- Burroughs, A.M., Aravind, L., (2016) RNA damage in biological conflicts and the diversity of responding RNA repair systems. *Nucleic Acids Res.* 44, 8525–8555.
- Callahan, K.P., Butler, J.S., (2008) Evidence for core exosome independent function of the nuclear exoribonuclease Rrp6p. *Nucleic Acids Res.* 36, 6645–6655.
- Chadani, Y., Ito, K., Kutsukake, K., Abo, T., (2012) ArfA recruits release factor 2 to rescue stalled ribosomes by peptidyl-tRNA hydrolysis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 86, 37–50.
- Chadani, Y., Matsumoto, E., Aso, H., Wada, T., Kutsukake, K., Sutou, S., Abo, T., (2011) trans-translation-mediated tight regulation of the expression of the alternative ribosome-rescue factor ArfA in *Escherichia coli*. *Genes Genet. Syst.* 86, 151–163.
- Chadani, Y., Ono, K., Ozawa, S.-I., Takahashi, Y., Takai, K., Nanamiya, H., Tozawa, Y., Kutsukake, K., Abo, T., (2010) Ribosome rescue by *Escherichia coli* ArfA (YhdL) in the absence of trans-translation system. *Mol. Microbiol.* 78, 796–808.
- Chandrasekaran, V., Juszkievicz, S., Choi, J., Puglisi, J.D., Brown, A., Shao, S., Ramakrishnan, V., Hegde, R.S., (2019) Mechanism of ribosome stalling during translation of a poly(A) tail. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 26, 1132–1140.
- Chang, J.H., Jiao, X., Chiba, K., Oh, C., Martin, C.E., Kiledjian, M., Tong, L., (2012a) Dxo1 is a new type of eukaryotic enzyme with both decapping and 5'-3' exoribonuclease activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1011–1017.
- Chang, J.H., Jiao, X., Chiba, K., Oh, C., Martin, C.E., Kiledjian, M., Tong, L., (2012b) Dxo1 is a new type of eukaryotic enzyme with both decapping and 5'-3' exoribonuclease activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1011–1017.
- Chavatte, L., Frolova, L., Laugâa, P., Kisselev, L., Favre, A., (2003) Stop codons and UGG promote efficient binding of the polypeptide release factor eRF1 to the ribosomal A site. *J. Mol. Biol.* 331, 745–758.
- Chavatte, L., Seit-Nebi, A., Dubovaya, V., Favre, A., (2002) The invariant uridine of stop codons contacts the conserved NIKSR loop of human eRF1 in the ribosome. *EMBO J.* 21, 5302–5311.

- Chen, L., Muhlrud, D., Hauryliuk, V., Cheng, Z., Lim, M.K., Shyp, V., Parker, R., Song, H., (2010) Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1233–1240.
- Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M., Nakamura, Y., Svergun, D.I., Ito, K., Song, H., (2009) Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev.* 23, 1106–1118.
- Cherry PD, Peach SE, Hesselberth JR. (2019) Multiple decay events target HAC1 mRNA during splicing to regulate the unfolded protein response. *Elife.* 2019;8:e42262.
- Chowdhury, A., Mukhopadhyay, J., Tharun, S., (2007) The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *RNA* 13, 998–1016.
- Collart, M.A., Panasenko, O.O., (2012) The Ccr4--not complex. *Gene* 492, 42–53.
- Collart, M.A., Weiss, B., (2020) Ribosome pausing, a dangerous necessity for co-translational events. *Nucleic Acids Res.* 48, 1043–1055.
- Coller, J.M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Parker, R., (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* 7, 1717–1727.
- Cramer, P., (2019) Organization and regulation of gene transcription. *Nature* 573, 45–54.
- Creamer, T.J., Darby, M.M., Jamonnak, N., Schaughency, P., Hao, H., Wheelan, S.J., Corden, J.L., (2011) Transcriptome-wide binding sites for components of the *Saccharomyces cerevisiae* non-poly(A) termination pathway: Nrd1, Nab3, and Sen1. *PLoS Genet.* 7, e1002329.
- Czernilofsky, A.P., Collatz, E.E., Stöffler, G., Kuechler, E., (1974) Proteins at the tRNA Binding Sites of *Escherichia coli* Ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 230–234.
- de Almeida, S.F., García-Sacristán, A., Custódio, N., Carmo-Fonseca, M., (2010) A link between nuclear RNA surveillance, the human exosome and RNA polymerase II transcriptional termination. *Nucleic Acids Res* 38, 8015–8026.
- Defenouillère, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., Fromont-Racine, M., (2013) Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 5046–5051.
- Dehecq, M., Decourty, L., Namane, A., Proux, C., Kanaan, J., Le Hir, H., Jacquier, A., Saveanu, C., (2018) Nonsense-mediated mRNA decay involves two distinct Upf1-bound complexes. *EMBO J* 37.
- Dever, T.E., Green, R., (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a013706.

Dimitrova L.N., Kurocha K., Tatematsu T., Inada T., (2009) Nascent Peptide-dependent Translation Arrest Leads to Not4p-mediated Protein Degradation by the Proteasome. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 10343-10352.

Doamekpor, S. K., Gozdek, A., Kwasnik, A., Kufel, J., & Tong, L. (2020) A novel 5'-hydroxyl dinucleotide hydrolase activity for the DXO/Rai1 family of enzymes. *Nucleic acids research*, 48(1), 349–358. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1107>

Doma, M.K., Parker, R., (2006) Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561–564.

D'Orazio, K. N., Wu, C. C., Sinha, N., Loll-Kripplbeber, R., Brown, G. W., & Green, R. (2019) The endonuclease Cue2 cleaves mRNAs at stalled ribosomes during No Go Decay. *eLife*, 8, e49117.

Dunckley, T., Parker, R., (1999) The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* 18, 5411–5422.

Eberle, A.B., Hesse, V., Helbig, R., Dantoft, W., Gimber, N., Visa, N., (2010) Splice-site mutations cause Rrp6-mediated nuclear retention of the unspliced RNAs and transcriptional down-regulation of the splicing-defective genes. *PLoS ONE* 5, e11540.

Felden, B., Himeno, H., Muto, A., Atkins, J.F., Gesteland, R.F., (1996) Structural organization of *Escherichia coli* tmRNA. *Biochimie* 78, 979–983.

Frank, D.N., St Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R., (2007) Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13780–13785.

Frank, J., Gao, H., Sengupta, J., Gao, N., Taylor, D.J., (2007) The process of mRNA-tRNA translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19671–19678.

Franks, T.M., Singh, G., Lykke-Andersen, J., (2010) Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* 143, 938–950.

Frenk, S., Oxley, D., & Houseley, J. (2014). The nuclear exosome is active and important during budding yeast meiosis. *PLoS one*, 9(9), e107648.

Fringer, J.M., Acker, M.G., Fekete, C.A., Lorsch, J.R., Dever, T.E., (2007) Coupled release of eukaryotic translation initiation factors 5B and 1A from 80S ribosomes following subunit joining. *Mol. Cell. Biol.* 27, 2384–2397.

Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerio, A.L., Parker, R., Dietz, H.C., (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295, 2258–2261.

Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., Kisselev, L., (1996) Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* 2, 334–341.

Frolova, L., Seit-Nebi, A., Kisselev, L., (2002) Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1. *RNA* 8, 129–136.

Frolova, L.Y., Tsivkovskii, R.Y., Sivolobova, G.F., Oparina, N.Y., Serpinsky, O.I., Blinov, V.M., Tatkov, S.I., Kisselev, L.L., (1999) Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA* 5, 1014–1020.

Gaba, A., Jacobson, A., Sachs, M.S., (2005) Ribosome occupancy of the yeast CPA1 upstream open reading frame termination codon modulates nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell* 20, 449–460.

Garza-Sánchez, F., Schaub, R.E., Janssen, B.D., Hayes, C.S., (2011) tmRNA regulates synthesis of the ArfA ribosome rescue factor. *Mol. Microbiol.* 80, 1204–1219.

Garzia, A., Jafarnejad, S.M., Meyer, C., Chapat, C., Gogakos, T., Morozov, P., Amiri, M., Shapiro, M., Molina, H., Tuschl, T., Sonenberg, N., (2017) The E3 ubiquitin ligase and RNA-binding protein ZNF598 orchestrates ribosome quality control of premature polyadenylated mRNAs. *Nat Commun* 8, 16056.

Gatfield, D., Izaurralde, E., (2004) Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* 429, 575–578.

Ghosh, S., Ganesan, R., Amrani, N., Jacobson, A., (2010) Translational competence of ribosomes released from a premature termination codon is modulated by NMD factors. *RNA* 16, 1832–1847.

Glover, M. L., Burroughs, A. M., Monem, P. C., Egelhofer, T. A., Pule, M. N., Aravind, L., & Arribere, J. A. (2020) NONU-1 Encodes a Conserved Endonuclease Required for mRNA Translation Surveillance. *Cell reports*, 30(13), 4321–4331.e4.

Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., Hook, B.A., Wickens, M., (2007) PUF protein-mediated deadenylation is catalyzed by Ccr4p. *J. Biol. Chem.* 282, 109–114.

Graille, M., Chaillet, M., van Tilbeurgh, H., (2008) Structure of yeast Dom34: a protein related to translation termination factor Erf1 and involved in No-Go decay. *J. Biol. Chem.* 283, 7145–7154.

Guydosh, N.R., Green, R., (2017) Translation of poly(A) tails leads to precise mRNA cleavage. *RNA* 23, 749–761.

Guydosh, N.R., Green, R., (2014) Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. *Cell* 156, 950–962.

Haas, G., Braun, J.E., Igreja, C., Tritschler, F., Nishihara, T., Izaurralde, E., (2010) HPat provides a link between deadenylation and decapping in metazoa. *J. Cell Biol.* 189, 289–302.

Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M., Conti, E., (2013) The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell* 154, 814–826.

- Handa, Y., Inaho, N., Nameki, N., (2011) YaeJ is a novel ribosome-associated protein in *Escherichia coli* that can hydrolyze peptidyl-tRNA on stalled ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 39, 1739–1748.
- He, F., Jacobson, A., (2015a) Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu. Rev. Genet.* 49, 339–366.
- He, F., Jacobson, A., (2015b) Control of mRNA decapping by positive and negative regulatory elements in the Dcp2 C-terminal domain. *RNA* 21, 1633–1647.
- He, F., Jacobson, A., (2001) Upf1p, Nmd2p, and Upf3p regulate the decapping and exonucleolytic degradation of both nonsense-containing mRNAs and wild-type mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 21, 1515–1530.
- He, F., Li, X., Spatrick, P., Casillo, R., Dong, S., Jacobson, A., (2003) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol. Cell* 12, 1439–1452.
- He, F., Peltz, S.W., Donahue, J.L., Rosbash, M., Jacobson, A., (1993) Stabilization and ribosome association of unspliced pre-mRNAs in a yeast upf1- mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 7034–7038.
- Hilal, T., Yamamoto, H., Loerke, J., Bürger, J., Mielke, T., & Spahn, C. M. (2016) Structural insights into ribosomal rescue by Dom34 and Hbs1 at near-atomic resolution. *Nature communications*, 7, 13521.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., Jensen, T.H., (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413, 538–542.
- Himeno, H., Nameki, N., Kurita, D., Muto, A., Abo, T., (2015) Ribosome rescue systems in bacteria. *Biochimie* 114, 102–112.
- Hinnebusch, A.G., (2011) Molecular Mechanism of Scanning and Start Codon Selection in Eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75, 434.
- Hofer, T., Badouard, C., Bajak, E., Ravanat, J.-L., Mattsson, A., Cotgreave, I.A., (2005) Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. *Biol. Chem.* 386, 333–337.
- Holmes, W.M., Klaips, C.L., Serio, T.R., (2014) Defining the limits: Protein aggregation and toxicity in vivo. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 294–303.
- Hook, B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., Wickens, M., (2007) Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.* 282, 15430–15438.
- Hung, Y.P., Albeck, J.G., Tantama, M., Yellen, G., (2011) Imaging cytosolic NADH-NAD⁺ redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. *Cell Metab* 14, 545–554.

- Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Saulière, J., Izaurralde, E., (2008) SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. *RNA* 14, 2609–2617.
- Ibrahim, F., Maragkakis, M., Alexiou, P., Mourelatos, Z., (2018) Ribothrypsis, a novel process of canonical mRNA decay, mediates ribosome-phased mRNA endonucleolysis. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25, 302–310.
- Ikeuchi, K., Tesina, P., Matsuo, Y., Sugiyama, T., Cheng, J., Saeki, Y., Tanaka, K., Becker, T., Beckmann, R., Inada, T., (2019) Collided ribosomes form a unique structural interface to induce Hel2-driven quality control pathways. *EMBO J.* 38.
- Imai, H., Abe, T., Miyoshi, T., Nishikawa, S., Ito, K., Uchiumi, T., (2018) The ribosomal stalk protein is crucial for the action of the conserved ATPase ABCE1. *Nucleic Acids Res* 46, 7820–7830.
- Inada, T., (2020) Quality controls induced by aberrant translation. *Nucleic Acids Res.* 48, 1084–1096.
- Inada, T., (2017) The Ribosome as a Platform for mRNA and Nascent Polypeptide Quality Control. *Trends Biochem. Sci.* 42, 5–15.
- Ivanova, N., Pavlov, M.Y., Felden, B., Ehrenberg, M., (2004) Ribosome rescue by tmRNA requires truncated mRNAs. *J. Mol. Biol.* 338, 33–41.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127.
- Jacobson, A., Peltz, S.W., (1996) Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 693–739.
- Jaillon, O., Bouhouche, K., Gout, J.-F., Aury, J.-M., Noel, B., Saudemont, B., Nowacki, M., Serrano, V., Porcel, B.M., Ségurens, B., Le Mouël, A., Lepère, G., Schächter, V., Bétermier, M., Cohen, J., Wincker, P., Sperling, L., Duret, L., Meyer, E., (2008) Translational control of intron splicing in eukaryotes. *Nature* 451, 359–362.
- Jamar, N.H., Kritsiligkou, P., Grant, C.M., (2017) The non-stop decay mRNA surveillance pathway is required for oxidative stress tolerance. *Nucleic Acids Res.* 45, 6881–6893.
- Jiao, X., Doamekpor, S.K., Bird, J.G., Nickels, B.E., Tong, L., Hart, R.P., Kiledjian, M., (2017) 5' End Nicotinamide Adenine Dinucleotide Cap in Human Cells Promotes RNA Decay through DXO-Mediated deNADding. *Cell* 168, 1015-1027.e10.
- Jinek, M., Coyle, S.M., Doudna, J.A., 2011. Coupled 5' nucleotide recognition and processivity in Xrn1-mediated mRNA decay. *Mol. Cell* 41, 600–608.
- Juzskiewicz, S., Chandrasekaran, V., Lin, Z., Kraatz, S., Ramakrishnan, V., Hegde, R.S., 2018. ZNF598 Is a Quality Control Sensor of Collided Ribosomes. *Mol. Cell* 72, 469-481.e7.

- Juszkiewicz, S., Hegde, R.S., 2017. Initiation of Quality Control during Poly(A) Translation Requires Site-Specific Ribosome Ubiquitination. *Mol. Cell* 65, 743-750.e4.
- Kamath, A., Chakraburty, K., 1989. Role of yeast elongation factor 3 in the elongation cycle. *J. Biol. Chem.* 264, 15423–15428.
- Kasari, V., Margus, T., Atkinson, G.C., Johansson, M.J.O., Hauryliuk, V., 2019. Ribosome profiling analysis of eEF3-depleted *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 9.
- Kebaara, B.W., Atkin, A.L., 2009. Long 3'-UTRs target wild-type mRNAs for nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 37, 2771–2778.
- Keiler, K.C., 2015. Mechanisms of ribosome rescue in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 285–297.
- Keiler, K.C., Waller, P.R., Sauer, R.T., 1996. Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science* 271, 990–993.
- Kervestin, S., Jacobson, A., 2012. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 700–712.
- Kilchert, C., Wittmann, S., Vasiljeva, L., 2016. The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 227–239.
- Kiledjian, M., 2018. Eukaryotic RNA 5'-End NAD⁺ Capping and DeNADding. *Trends Cell Biol.* 28, 454–464.
- Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedeia, E., Greenblatt, J.F., Buratowski, S., 2004. The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* 432, 517–522.
- Kogure, H., Handa, Y., Nagata, M., Kanai, N., Güntert, P., Kubota, K., Nameki, N., 2014. Identification of residues required for stalled-ribosome rescue in the codon-independent release factor YaeJ. *Nucleic Acids Res.* 42, 3152–3163.
- Kolitz, S.E., Takacs, J.E., Lorsch, J.R., 2009. Kinetic and thermodynamic analysis of the role of start codon/anticodon base pairing during eukaryotic translation initiation. *RNA* 15, 138–152.
- Kononenko, A.V., Mitkevich, V.A., Dubovaya, V.I., Kolosov, P.M., Makarov, A.A., Kisselev, L.L., 2008. Role of the individual domains of translation termination factor eRF1 in GTP binding to eRF3. *Proteins* 70, 388–393.
- Kostova, K.K., Hickey, K.L., Osuna, B.A., Hussmann, J.A., Frost, A., Weinberg, D.E., Weissman, J.S., (2017) CAT-tailing as a fail-safe mechanism for efficient degradation of stalled nascent polypeptides. *Science* 357, 414–417.
- Kozak, M., (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 9, 5233–5252.

- Kurihara, Y., Matsui, A., Hanada, K., Kawashima, M., Ishida, J., Morosawa, T., Tanaka, M., Kaminuma, E., Mochizuki, Y., Matsushima, A., Toyoda, T., Shinozaki, K., Seki, M., (2009) Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 2453–2458.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., Tollervey, D., (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell* 121, 713–724.
- Larimer, F.W., Stevens, A., (1990) Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'----3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. *Gene* 95, 85–90.
- Laurberg, M., Asahara, H., Korostelev, A., Zhu, J., Trakhanov, S., Noller, H.F., (2008) Structural basis for translation termination on the 70S ribosome. *Nature* 454, 852–857.
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., Séraphin, B., (2008) Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* 456, 993–996.
- Lee, H.H., Kim, Y.-S., Kim, K.H., Heo, I., Kim, S.K., Kim, O., Kim, H.K., Yoon, J.Y., Kim, H.S., Kim, D.J., Lee, S.J., Yoon, H.J., Kim, S.J., Lee, B.G., Song, H.K., Kim, V.N., Park, C.-M., Suh, S.W., 2007. Structural and functional insights into Dom34, a key component of no-go mRNA decay. *Mol. Cell* 27, 938–950.
- Leeds, P., Peltz, S.W., Jacobson, A., Culbertson, M.R., (1991) The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 5, 2303–2314.
- Li, Z., Wu, J., Deleo, C.J., (2006) RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life* 58, 581–588.
- Liu, S., Melonek, J., Boykin, L.M., Small, I., Howell, K.A., (2013) PPR-SMRs: ancient proteins with enigmatic functions. *RNA Biol* 10, 1501–1510.
- Lu, J., Deutsch, C., (2008) Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. *J. Mol. Biol.* 384, 73–86.
- Lykke-Andersen, J., (2002) Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8114–8121.
- Lyumkis, D., Julien, J.-P., de Val, N., Cupo, A., Potter, C.S., Klasse, P.-J., Burton, D.R., Sanders, R.W., Moore, J.P., Carragher, B., Wilson, I.A., Ward, A.B., (2013) Cryo-EM structure of a fully glycosylated soluble cleaved HIV-1 envelope trimer. *Science* 342, 1484–1490.
- Maag, D., Fekete, C.A., Gryczynski, Z., Lorsch, J.R., (2005) A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol. Cell* 17, 265–275.
- Matsuda, H., Putzel, G.G., Backman, V., Szleifer, I., (2014) Macromolecular crowding as a regulator of gene transcription. *Biophys. J.* 106, 1801–1810.

- Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., Ingolia, N.T., Beckmann, R., Inada, T., (2017) Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nat Commun* 8, 159.
- Matsuo, Y., Tesina, P., Nakajima, S., Mizuno, M., Endo, A., Buschauer, R., Cheng, J., Shounai, O., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Becker, T., Beckmann, R., Inada, T., (2020) RQT complex dissociates ribosomes collided on endogenous RQC substrate SDD1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 323–332.
- Meaux, S., Van Hoof, A., (2006) Yeast transcripts cleaved by an internal ribozyme provide new insight into the role of the cap and poly(A) tail in translation and mRNA decay. *RNA* 12, 1323–1337.
- Medghalchi, S.M., Frischmeyer, P.A., Mendell, J.T., Kelly, A.G., Lawler, A.M., Dietz, H.C., (2001) Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.* 10, 99–105.
- Mehta, P., Richards, J., Karzai, A.W., (2006) tmRNA determinants required for facilitating nonstop mRNA decay. *RNA* 12, 2187–2198.
- Menzel, S., Jiang, J., Silver, N., Gallagher, J., Cunningham, J., Surdulescu, G., Lathrop, M., Farrall, M., Spector, T.D., Thein, S.L., (2007) The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet, and monocyte counts in humans. *Blood* 110, 3624–3626.
- Merkulova, T.I., Frolova, L.Y., Lazar, M., Camonis, J., Kisselev, L.L., (1999) C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their in vivo interaction. *FEBS Lett.* 443, 41–47.
- Milac, A.L., Bojarska, E., Wypijewska del Nogal, A., (2014) Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1839, 452–462.
- Mitchell, S.F., Jain, S., She, M., Parker, R., (2013) Global analysis of yeast mRNPs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 127–133.
- Moore, S.D., Sauer, R.T., (2007) The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 101–124.
- Mugridge, J.S., Tibble, R.W., Ziemniak, M., Jemielity, J., Gross, J.D., (2018) Structure of the activated Edc1-Dcp1-Dcp2-Edc3 mRNA decapping complex with substrate analog poised for catalysis. *Nat Commun* 9, 1152.
- Mugridge, J.S., Ziemniak, M., Jemielity, J., Gross, J.D., (2016) Structural basis of mRNA-cap recognition by Dcp1-Dcp2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 987–994.
- Muhrad, D., Decker, C.J., Parker, R., (1994) Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* 8, 855–866.

- Navickas, A., Chamois, S., Saint-Fort, R., Henri, J., Torchet, C., Benard, L., (2020) No-Go Decay mRNA cleavage in the ribosome exit tunnel produces 5'-OH ends phosphorylated by Trl1. *Nat Commun* 11, 122.
- Neil, H., Malabat, C., d'Aubenton-Carafa, Y., Xu, Z., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., (2009) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* 457, 1038–1042.
- Ni, J.Z., Grate, L., Donohue, J.P., Preston, C., Nobida, N., O'Brien, G., Shiue, L., Clark, T.A., Blume, J.E., Ares, M., (2007) Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev.* 21, 708–718.
- Nicholson, P., Josi, C., Kurosawa, H., Yamashita, A., Mühlemann, O., (2014) A novel phosphorylation-independent interaction between SMG6 and UPF1 is essential for human NMD. *Nucleic Acids Res.* 42, 9217–9235.
- Nierhaus, K.H., (1990) The allosteric three-site model for the ribosomal elongation cycle: features and future. *Biochemistry* 29, 4997–5008.
- Nissan, T., Rajyaguru, P., She, M., Song, H., Parker, R., (2010) Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Mol. Cell* 39, 773–783.
- Nürenberg-Goloub, E., Heinemann, H., Gerovac, M., Tampé, R., (2018) Ribosome recycling is coordinated by processive events in two asymmetric ATP sites of ABCE1. *Life Sci Alliance* 1.
- Okada-Katsuhata, Y., Yamashita, A., Kutsuzawa, K., Izumi, N., Hirahara, F., Ohno, S., (2012) N- and C-terminal Upf1 phosphorylations create binding platforms for SMG-6 and SMG-5:SMG-7 during NMD. *Nucleic Acids Res.* 40, 1251–1266.
- Olivas, W., Parker, R., (2000) The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J* 19, 6602–6611.
- Ozgur, S., Chekulaeva, M., Stoecklin, G., (2010) Human Pat1b connects deadenylation with mRNA decapping and controls the assembly of processing bodies. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4308–4323.
- Ozsolak, F., Kapranov, P., Foissac, S., Kim, S.W., Fishilevich, E., Monaghan, A.P., John, B., Milos, P.M., (2010) Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. *Cell* 143, 1018–1029.
- Panasenko, O.O., (2014) The role of the E3 ligase Not4 in cotranslational quality control. *Front Genet* 5, 141.
- Passos, D.O., Doma, M.K., Shoemaker, C.J., Muhlrud, D., Green, R., Weissman, J., Hollien, J., Parker, R., (2009) Analysis of Dom34 and its function in no-go decay. *Mol. Biol. Cell* 20, 3025–3032.

- Peach, S.E., York, K., Hesselberth, J.R., (2015) Global analysis of RNA cleavage by 5'-hydroxyl RNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 43, e108.
- Pelechano, V., Alepuz, P., (2017) eIF5A facilitates translation termination globally and promotes the elongation of many non polyproline-specific tripeptide sequences. *Nucleic Acids Res.* 45, 7326–7338.
- Pelechano, V., Wei, W., Steinmetz, L.M., (2015) Widespread Co-translational RNA Decay Reveals Ribosome Dynamics. *Cell* 161, 1400–1412.
- Pelechano, V., Wei, W., Steinmetz, L.M., (2013) Extensive transcriptional heterogeneity revealed by isoform profiling. *Nature* 497, 127–131.
- Phizicky, E.M., Consaul, S.A., Nehrke, K.W., Abelson, J., (1992) Yeast tRNA ligase mutants are nonviable and accumulate tRNA splicing intermediates. *J. Biol. Chem.* 267, 4577–4582.
- Pisarev, A.V., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., (2007) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* 131, 286–299.
- Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., (2010) The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* 37, 196–210.
- Pisareva, V.P., Skabkin, M.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., Pisarev, A.V., (2011) Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. *EMBO J.* 30, 1804–1817.
- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.-H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K.E., Graveley, B.R., Collier, J., (2015) Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 160, 1111–1124.
- Proudfoot, N.J., (1989) How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 14, 105–110.
- Pulak, R., Anderson, P., 1993. mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes Dev.* 7, 1885–1897.
- Ramadoss, N.S., Zhou, X., Keiler, K.C., (2013) tmRNA is essential in *Shigella flexneri*. *PLoS ONE* 8, e57537.
- Ramanathan, A., Robb, G.B., Chan, S.-H., (2016) mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* 44, 7511–7526.
- Richards, J., Mehta, P., Karzai, A.W., (2006) RNase R degrades non-stop mRNAs selectively in an SmpB-tmRNA-dependent manner. *Mol. Microbiol.* 62, 1700–1712.
- Richter, K., Haslbeck, M., Buchner, J., (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell* 40, 253–266.

- Ross-Smith, N., Tan, P., Belfield, G., Tuite, M.F., (1995) Translational elongation factor 3 (EF-3): a study of its structural and functional divergence in fungi. *Biochem. Soc. Trans.* 23, 132S.
- Rougemaille, M., Gudipati, R.K., Olesen, J.R., Thomsen, R., Seraphin, B., Libri, D., Jensen, T.H., (2007) Dissecting mechanisms of nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 complex mutants. *EMBO J.* 26, 2317–2326.
- Rudinger-Thirion, J., Giegé, R., Felden, B., (1999) Aminoacylated tmRNA from *Escherichia coli* interacts with prokaryotic elongation factor Tu. *RNA* 5, 989–992.
- Saito, S., Hosoda, N., & Hoshino, S. (2013) The Hbs1-Dom34 protein complex functions in non-stop mRNA decay in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 288(24), 17832–17843.
- Saito, K., Horikawa, W., Ito, K., (2015) Inhibiting K63 polyubiquitination abolishes no-go type stalled translation surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet.* 11, e1005197.
- Sakaki, K., Yoshina, S., Shen, X., Han, J., DeSantis, M.R., Xiong, M., Mitani, S., Kaufman, R.J., (2012) RNA surveillance is required for endoplasmic reticulum homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 8079–8084.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M., van Hoof, A., (2009) The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 56–62.
- Schaeffer, D., van Hoof, A., (2011) Different nuclease requirements for exosome-mediated degradation of normal and nonstop mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 2366–2371.
- Schäfer, I.B., Yamashita, M., Schuller, J.M., Schüssler, S., Reichelt, P., Strauss, M., Conti, E., (2019) Molecular Basis for poly(A) RNP Architecture and Recognition by the Pan2-Pan3 Deadenylase. *Cell* 177, 1619-1631.e21.
- Schaub, R.E., Poole, S.J., Garza-Sánchez, F., Benbow, S., Hayes, C.S., (2012) Proteobacterial ArfA peptides are synthesized from non-stop messenger RNAs. *J. Biol. Chem.* 287, 29765–29775.
- Schmeing, T.M., Voorhees, R.M., Kelley, A.C., Gao, Y.-G., Murphy, F.V., Weir, J.R., Ramakrishnan, V., (2009) The crystal structure of the ribosome bound to EF-Tu and aminoacyl-tRNA. *Science* 326, 688–694.
- Schmidt, K., Butler, J.S., (2013) Nuclear RNA surveillance: role of TRAMP in controlling exosome specificity. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 217–231.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., Tollervey, D., (2009) The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res.* 37, 1127–1140.

Schulz, D., Schwalb, B., Kiesel, A., Baejen, C., Torkler, P., Gagneur, J., Soeding, J., Cramer, P., (2013) Transcriptome surveillance by selective termination of noncoding RNA synthesis. *Cell* 155, 1075–1087.

Shan, X., Chang, Y., Lin, C.G., (2007) Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression. *FASEB J.* 21, 2753–2764.

Shan, X., Lin, C.-L.G., (2006) Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 27, 657–662.

Shan, X., Tashiro, H., Lin, C.G., (2003) The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 23, 4913–4921.

Shao, S., Brown, A., Santhanam, B., Hegde, R.S., (2015) Structure and Assembly Pathway of the Ribosome Quality Control Complex. *Mol Cell* 57, 433–444.

Shao, S., Hegde, R.S., (2014) Reconstitution of a minimal ribosome-associated ubiquitination pathway with purified factors. *Mol. Cell* 55, 880–890.

Shao, S., Murray, J., Brown, A., Taunton, J., Ramakrishnan, V., Hegde, R.S., (2016) Decoding Mammalian Ribosome-mRNA States by Translational GTPase Complexes. *Cell* 167, 1229–1240.e15.

Shao, S., von der Malsburg, K., Hegde, R.S., (2013) Listerin-dependent nascent protein ubiquitination relies on ribosome subunit dissociation. *Mol. Cell* 50, 637–648.

Sharif, H., Ozgur, S., Sharma, K., Basquin, C., Urlaub, H., Conti, E., (2013) Structural analysis of the yeast Dhh1-Pat1 complex reveals how Dhh1 engages Pat1, Edc3 and RNA in mutually exclusive interactions. *Nucleic Acids Res.* 41, 8377–8390.

Shen, P.S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., Larson, M.H., Cox, J., Cheng, Y., Lambowitz, A.M., Weissman, J.S., Brandman, O., Frost, A., (2015) Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* 347, 75–78.

Shen, Z., Wu, W., Hazen, S.L., (2000) Activated leukocytes oxidatively damage DNA, RNA, and the nucleotide pool through halide-dependent formation of hydroxyl radical. *Biochemistry* 39, 5474–5482.

Shi, Z., Fujii, K., Kovary, K.M., Genuth, N.R., Röst, H.L., Teruel, M.N., Barna, M., (2017) Heterogeneous Ribosomes Preferentially Translate Distinct Subpools of mRNAs Genome-wide. *Mol. Cell* 67, 71–83.e7.

Shimizu, Y., (2012) ArfA recruits RF2 into stalled ribosomes. *J. Mol. Biol.* 423, 624–631.

Shoemaker, C.J., Eyler, D.E., Green, R., (2010) Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* 330, 369–372.

Shoemaker, C.J., Green, R., (2012) Translation drives mRNA quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 594–601.

Shoemaker, C.J., Green, R., (2011a) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, E1392-1398.

Shoemaker, C.J., Green, R., (2011b) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, E1392-1398.

Siddiqui, N., Mangus, D.A., Chang, T.-C., Palermino, J.-M., Shyu, A.-B., Gehring, K., (2007) Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 282, 25067–25075.

Simms, C.L., Hudson, B.H., Mosior, J.W., Rangwala, A.S., Zaher, H.S., (2014) An active role for the ribosome in determining the fate of oxidized mRNA. *Cell Rep* 9, 1256–1264.

Simms, C.L., Yan, L.L., Zaher, H.S., (2017) Ribosome Collision Is Critical for Quality Control during No-Go Decay. *Mol. Cell* 68, 361-373.e5.

Sinturel, F., Navickas, A., Wery, M., Descrimes, M., Morillon, A., Torchet, C., Benard, L., (2015) Cytoplasmic Control of Sense-Antisense mRNA Pairs. *Cell Rep* 12, 1853–1864.

Skabkin, M.A., Skabkina, O.V., Dhote, V., Komar, A.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., (2010) Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes Dev.* 24, 1787–1801.

Smith, T.F., Lee, J.C., Gutell, R.R., Hartman, H., (2008) The origin and evolution of the ribosome. *Biol. Direct* 3, 16.

Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G., (2009) Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731–745.

Song, J., Perreault, J.-P., Topisirovic, I., Richard, S., (2016) RNA G-quadruplexes and their potential regulatory roles in translation. *Translation (Austin)* 4.

Spahn, C.M., Beckmann, R., Eswar, N., Penczek, P.A., Sali, A., Blobel, G., Frank, J., (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*--tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* 107, 373–386.

Spahn, C.M., Gomez-Lorenzo, M.G., Grassucci, R.A., Jørgensen, R., Andersen, G.R., Beckmann, R., Penczek, P.A., Ballesta, J.P., Frank, J., (2004) Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation. *EMBO J* 23, 1008–1019.

Stansfield, I., Jones, K.M., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Poznyakovski, A.I., Paushkin, S.V., Nierras, C.R., Cox, B.S., Ter-Avanesyan, M.D., Tuite, M.F., (1995) The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 4365–4373.

Steinmetz, E.J., Conrad, N.K., Brow, D.A., Corden, J.L., (2001) RNA-binding protein Nrd1 directs poly(A)-independent 3'-end formation of RNA polymerase II transcripts. *Nature* 413, 327–331.

Stevens, A., (2001) 5'-exoribonuclease 1: Xrn1. *Meth. Enzymol.* 342, 251–259.

Stevens, A., (1978) An exoribonuclease from *Saccharomyces cerevisiae*: effect of modifications of 5' end groups on the hydrolysis of substrates to 5' mononucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 656–661.

Su, T., Izawa, T., Thoms, M., Yamashita, Y., Cheng, J., Berninghausen, O., Hartl, F.U., Inada, T., Neupert, W., Beckmann, R., (2019) Structure and function of Vms1 and Arb1 in RQC and mitochondrial proteome homeostasis. *Nature* 570, 538–542.

Sundaramoorthy, E., Leonard, M., Mak, R., Liao, J., Fulzele, A., Bennett, E.J., (2017) ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation. *Mol. Cell* 65, 751-760.e4.

Tadauchi, T., Matsumoto, K., Herskowitz, I., Irie, K., (2001) Post-transcriptional regulation through the HO 3'-UTR by Mpt5, a yeast homolog of Pumilio and FBF. *EMBO J.* 20, 552–561.

Tanaka, M., Chock, P.B., Stadtman, E.R., (2007) Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 66–71.

Tani, H., Torimura, M., Akimitsu, N., (2013) The RNA degradation pathway regulates the function of GAS5 a non-coding RNA in mammalian cells. *PLoS ONE* 8, e55684.

Ter-Avanesyan, M.D., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Didichenko, S.A., Chernoff, Y.O., Inge-Vechtomov, S.G., Smirnov, V.N., (1993) Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Mol. Microbiol.* 7, 683–692.

Tharun, S., He, W., Mayes, A.E., Lennertz, P., Beggs, J.D., Parker, R., (2000) Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* 404, 515–518.

Thiebaut, M., Kisseleva-Romanova, E., Rougemaille, M., Boulay, J., Libri, D., (2006) Transcription termination and nuclear degradation of cryptic unstable transcripts: a role for the nrd1-nab3 pathway in genome surveillance. *Mol. Cell* 23, 853–864.

Torchet, C., Bousquet-Antonelli, C., Milligan, L., Thompson, E., Kufel, J., Tollervey, D., (2002) Processing of 3'-extended read-through transcripts by the exosome can generate functional mRNAs. *Mol. Cell* 9, 1285–1296.

Torres-Torronteras, J., Rodriguez-Palmero, A., Pinós, T., Accarino, A., Andreu, A.L., Pintos-Morell, G., Martí, R., (2011) A novel nonstop mutation in TYMP does not induce nonstop mRNA decay in a MNGIE patient with severe neuropathy. *Hum. Mutat.* 32, E2061-2068.

Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., Inada, T., (2012) Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* 46, 518–529.

- Tsurugi, K., Collatz, E., Todokoro, K., Ulbrich, N., Lightfoot, H.N., Wool, I.G., (1978) Isolation of eukaryotic ribosomal proteins. Purification and characterization of the 60 S ribosomal subunit proteins La, Lb, Lf, P1, P2, L13', L14, L18', L20, and L38. *J. Biol. Chem.* 253, 946–955.
- Tu, G.F., Reid, G.E., Zhang, J.G., Moritz, R.L., Simpson, R.J., (1995) C-terminal extension of truncated recombinant proteins in *Escherichia coli* with a 10Sa RNA decapeptide. *J. Biol. Chem.* 270, 9322–9326.
- Tucker, M., Parker, R., (2000) Mechanisms and control of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 571–595.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhrad, D., Parker, R., (2002) Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 21, 1427–1436.
- Tudek, A., Porrua, O., Kabzinski, T., Lidschreiber, M., Kubicek, K., Fortova, A., Lacroute, F., Vanacova, S., Cramer, P., Stefl, R., Libri, D., (2014) Molecular basis for coordinating transcription termination with noncoding RNA degradation. *Mol. Cell* 55, 467–481.
- Ulbricht, R.J., Olivas, W.M., (2008) Puf1p acts in combination with other yeast Puf proteins to control mRNA stability. *RNA* 14, 246–262.
- Uritani, M., Miyazaki, M., (1988) Role of yeast peptide elongation factor 3 (EF-3) at the AA-tRNA binding step. *J. Biochem.* 104, 118–126.
- Valkov, E., Jonas, S., Weichenrieder, O., (2017) Mille viae in eukaryotic mRNA decapping. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 47, 40–51.
- Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., Frank, J., (2003) Locking and unlocking of ribosomal motions. *Cell* 114, 123–134.
- van den Elzen, A.M.G., Henri, J., Lazar, N., Gas, M.E., Durand, D., Lacroute, F., Nicaise, M., van Tilbeurgh, H., Séraphin, B., Graille, M., (2010) Dissection of Dom34-Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1446–1452.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., Parker, R., (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295, 2262–2264.
- Venkataraman, K., Guja, K.E., Garcia-Diaz, M., Karzai, A.W., (2014) Non-stop mRNA decay: a special attribute of trans-translation mediated ribosome rescue. *Front Microbiol* 5.
- Verma R, Oania RS, Kolawa NJ, Deshaies RJ. (2013) Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *Elife.* 2013;2:e00308.
- Viswanathan, P., Ohn, T., Chiang, Y.-C., Chen, J., Denis, C.L., (2004) Mouse CAF1 can function as a processive deadenylase/3'-5'-exonuclease in vitro but in yeast the deadenylase function of CAF1 is not required for mRNA poly(A) removal. *J. Biol. Chem.* 279, 23988–23995.

- Wahle, E., Winkler, G.S., (2013) RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 561–570.
- Walters, R.W., Matheny, T., Mizoue, L.S., Rao, B.S., Muhlrads, D., Parker, R., (2017) Identification of NAD⁺ capped mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 480–485.
- Wang, L., Lewis, M.S., Johnson, A.W., (2005) Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA* 11, 1291–1302.
- Webster, M.W., Chen, Y.-H., Stowell, J.A.W., Alhusaini, N., Sweet, T., Graveley, B.R., Coller, J., Passmore, L.A., (2018) mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases. *Mol. Cell* 70, 1089-1100.e8.
- Weischenfeldt, J., Waage, J., Tian, G., Zhao, J., Damgaard, I., Jakobsen, J.S., Kristiansen, K., Krogh, A., Wang, J., Porse, B.T., (2012) Mammalian tissues defective in nonsense-mediated mRNA decay display highly aberrant splicing patterns. *Genome Biol.* 13, R35.
- Welch, E.M., Jacobson, A., (1999) An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast SPT10 mRNA. *EMBO J.* 18, 6134–6145.
- Wilkins, S., (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Rep* 7.
- Wilson, D.N., Doudna Cate, J.H., (2012) The structure and function of the eukaryotic ribosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Wilson, M.A., Meaux, S., van Hoof, A., (2008) Diverse aberrancies target yeast mRNAs to cytoplasmic mRNA surveillance pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1779, 550–557.
- Wittkopp, P.J., Stewart, E.E., Arnold, L.L., Neidert, A.H., Haerum, B.K., Thompson, E.M., Akhras, S., Smith-Winberry, G., Shefner, L., (2009) Intraspecific polymorphism to interspecific divergence: genetics of pigmentation in *Drosophila*. *Science* 326, 540–544.
- Wlotzka, W., Kudla, G., Granneman, S., Tollervey, D., (2011) The nuclear RNA polymerase II surveillance system targets polymerase III transcripts. *EMBO J.* 30, 1790–1803.
- Wolf, J., Passmore, L.A., (2014) mRNA deadenylation by Pan2-Pan3. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 184–187.
- Wu, J., Hopper, A.K., (2014) Healing for destruction: tRNA intron degradation in yeast is a two-step cytoplasmic process catalyzed by tRNA ligase Rlg1 and 5'-to-3' exonuclease Xrn1. *Genes Dev* 28, 1556–1561.
- Wurtmann, E.J., Wolin, S.L., (2009) RNA under attack: cellular handling of RNA damage. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 34–49.
- Xiang, S., Cooper-Morgan, A., Jiao, X., Kiledjian, M., Manley, J.L., Tong, L., (2009) Structure and function of the 5'→3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature* 458, 784–788.

- Yang, W., (2011) Nucleases: diversity of structure, function and mechanism. *Q. Rev. Biophys.* 44, 1–93.
- Young, D.J., Guydosh, N.R., Zhang, F., Hinnebusch, A.G., Green, R., (2015) Rli1/ABCE1 Recycles Terminating Ribosomes and Controls Translation Reinitiation in 3'UTRs In Vivo. *Cell* 162, 872–884.
- Zaborske, J.M., Zeitler, B., Culbertson, M.R., (2013) Multiple Transcripts from a 3'-UTR Reporter Vary in Sensitivity to Nonsense-Mediated mRNA Decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 8.
- Zhao, Z., (2019) Iron and oxidizing species in oxidative stress and Alzheimer's disease. *Aging Med (Milton)* 2, 82–87.
- Zheng, D., Chen, C.-Y.A., Shyu, A.-B., (2011) Unraveling regulation and new components of human P-bodies through a protein interaction framework and experimental validation. *RNA* 17, 1619–1634.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L., Philippe, M., (1995) Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* 14, 4065–4072.
- Zinder, J.C., Lima, C.D., (2017) Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev.* 31, 88–100.
- Zurita Rendón, O., Fredrickson, E.K., Howard, C.J., Van Vranken, J., Fogarty, S., Tolley, N.D., Kalia, R., Osuna, B.A., Shen, P.S., Hill, C.P., Frost, A., Rutter, J., (2018) Vms1p is a release factor for the ribosome-associated quality control complex. *Nat Commun* 9, 2197.

ANNEXES

Table des illustrations.

FIGURE 1 : ÉTAPES DU DEMARRAGE DE LA TRADUCTION CHEZ LES EUCARYOTES. (D'APRES JACKSON ET AL., 2010).	14
FIGURE 2 : ÉTAPES DE LA TRANSLOCATION DES RIBOSOMES AU COURS DE L'ÉLONGATION DE LA TRADUCTION.	16
FIGURE 3 TERMINAISON CANONIQUE DE LA TRADUCTION PAR ERF1, ERF3 ET RLI1. (D'APRES DEVER AND GREEN, 2012).	18
FIGURE 4 : MECANISMES PERMETTANT LA DEADENYLATION DES ARN MESSAGERS. (ADAPTEE DE WEBSTER ET AL., 2018).	21
FIGURE 5 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ASSOCIATION ENTRE L'EXOSOME CYTOPLASMIQUE ET LE COMPLEXE SKI CHEZ LA LEVURE. (D'APRES HALBACH ET AL., 2013).	22
FIGURE 6 : VOIES DE DEGRADATION 3'-5' ET 5'-3' DANS LE CYTOPLASME.	23
FIGURE 7 : SYSTEMES DE SURVEILLANCE CHARGES DE L'ÉLIMINATION DES COMPLEXES NON-STOP CHEZ LES BACTERIES. (D'APRES KELLER AND FAEGA, 2014)	28
FIGURE 8 : ASSOCIATION DE L'EXOSOME NUCLEAIRE ET DE DU COMPLEXE TRAMP. (D'APRES ZINDER ET AL., 2017).	32
FIGURE 9 : RECRUTEMENT DU COMPLEXE TRAMP PAR LE COMPLEXE NNS. (D'APRES TUDEK ET AL., 2014)	33
FIGURE 10 : PRINCIPAUX ACTEURS DES VOIES DE DEGRADATION DES ARN ABERRANTS DANS LE CYTOPLASME. (ADAPTEE DE INADA, 2016).	36
FIGURE 11 : STRUCTURE DE DISOME EN COLLISION SUR UN ARN ABERRANT PAR CRYO-EM (D'APRES IKEUCHI ET AL., 2019).	41
FIGURE 12 : RECYCLAGE DES RIBOSOMES BLOQUES PAR LE COMPLEXE DOM34:HBS1.	43
FIGURE 13 : ÉLIMINATION DU PEPTIDE TRONQUE PAR LE RQC APRES RECYCLAGE DES RIBOSOMES BLOQUES. (ADAPTEE DE INADA, 2020).	45
FIGURE 14 : MODELE DE RECRUTEMENT DU NGD DEPENDANT DE LA POLYUBIQUITINATION DE PROTEINES RIBOSOMALES US10 OU ES7 PAR HEL2 ET D'ÉLIMINATION DES FRAGMENTS NGD. (SELON IKEUCHI ET AL., 2019).	49
FIGURE 15 : SCHEMA DE LA CONSTRUCTION RIBOZYME UTILISEE POUR L'ÉTUDE DU NO-GO DECAY CHEZ LA LEVURE.	55
FIGURE 16 : ANALYSE DE LA DEGRADATION DES ARN1 PAR NORTHERN BLOT.	57
FIGURE 17 : ANALYSE DE L'ASSOCIATION DES ARN B1/4/5 AUX RIBOSOMES DANS UN MUTANT ΔDOM34.	60
FIGURE 18 : SCHEMA DE LA CARTOGRAPHIE DES CLIVAGES ET DE L'ASSOCIATION DES ARN AUX RIBOSOMES BLOQUES DANS UN MUTANT ΔDOM34 OU ΔDOM34/ΔXRN1.	61
FIGURE 19 : DXO1 EST RESPONSABLE DE LA PRODUCTION DES ARN B2 ET B3 DANS LE MUTANT ΔDOM34/ΔXRN1.	62
FIGURE 20 : DXO1 EST SENSIBLE A LA SEQUENCE DE L'ARN MESSAGER.	63
FIGURE 21 : PRINCIPE DE LA TECHNIQUE DE 3'-RACE.	65
FIGURE 22 : UTILISATION DE LA TECHNIQUE DE 3'RACE POUR IDENTIFIER L'ARN B4-5'NGD.	66
FIGURE 23 : L'ARN TRONQUE PROVOQUE L'APPARITION DE NOUVELLES CIBLES DE LA DEGRADATION NGD.	68
FIGURE 24 : LE CLIVAGE ENDONUCLEOLYTIQUE DU NGD DEPEND DE L'UBIQUITINE LIGASE HEL2.	70
FIGURE 25 : ÉTUDE DE LA PHOSPHORYLATION DE L'ARN B4 DANS UN MUTANT ΔDOM34.	71
FIGURE 26 : ÉTUDE DE LA PHOSPHORYLATION DE L'ARN B4 DANS DES EXTRAITS POLYSOMAX DE MUTANTS ΔDOM34 OU ΔXRN1/ΔDOM34/ΔDXO1.	73
FIGURE 27 : IMPORTANCE DE TRL1 DANS LA PHOSPHORYLATION DE L'ARN B4.	74
FIGURE 28 : LE CLIVAGE ENDORIBONUCLEOLYTIQUE EST DEPENDANT DE CUE2.	76
FIGURE 29 : XRN1 JOUE UN ROLE IMPORTANT DANS LA DEGRADATION DE L'ARN-CGA.	78
FIGURE 30 : ÉTUDE DE L'ARN-CGA PAR UNE APPROCHE DE 3'-RACE	80
FIGURE 31 : DES ARN TRONQUES SONT PRODUITS PAR LE NGD A PARTIR DE L'ARN-CGA.	82
FIGURE 32 : ANALYSE D'UN ARN CONTENANT DES CODONS RARES PAR TRANSCRIPTION INVERSE.	84
FIGURE 33 : DIFFERENCES ENTRE NOTRE APPROCHE ET CELLE MENEÉ PAR TSUBOI ET AL., 2012	108
FIGURE 34 : DIVERSITE DES FRAGMENTS 5'-NGD IDENTIFIÉ DANS LA LITTÉRATURE PAR 3'RACE. (D'APRES SIMMS ET AL., 2017)	109

FIGURE 35 : MODELES DE L'INTERVENTION DE TRL1 EN ABSENCE DE RIBOSOME EN 5' DE L'ARN B4.	113
FIGURE 36 : ETUDE DU COMPORTEMENT DE DXO1 LORS D'UN CHOC THERMIQUE.	115
FIGURE 37 : STRUCTURE DU TRISOME BLOQUE LORS DE LA TRADUCTION D'UN MESSAGER ABERRANT. (D'APRES MATSUO ET AL., 2020).	117
FIGURE 38 : MODELES D'ACTION DE CUE2 AU NIVEAU DES RIBOSOMES BLOQUES EN COURS D'ELONGATION.	119
FIGURE 39 : EFFET DU RIBOSOME PROFILING SUR L'ARN 5'-NGD.	121
FIGURE 40 : CONSERVATION DU DOMAINE SMR ET DE SES DOMAINES ASSOCIES. (D'APRES GLOVER ET AL., 2020).	123
FIGURE 41 : DECLENCHEMENT DU NGD ET IMPORTANCE DE XRN1 LORS DE L'ELIMINATION D'ARN COMPORTANT DES BLOCAGES PRECOCS DE LA TRADUCTION.	126

Résumé

L'expression des gènes est un mécanisme complexe qui peut conduire à la synthèse d'ARN messagers aberrants, susceptibles de perturber l'homéostasie cellulaire. Il existe ainsi chez les eucaryotes des voies de surveillance chargées d'éliminer de tels ARN, en particulier dans le cytoplasme. Le No-Go Decay (NGD) est l'une d'entre-elles et assure l'élimination des messagers responsables de blocages des ribosomes au cours de l'élongation de la traduction. Ce mécanisme met en jeu des clivages endoribonucléolytiques qui se produisent aux abords des ribosomes bloqués sur l'ARN. La localisation précise de ces clivages, toujours débattue dans la littérature, est un élément essentiel à la compréhension du rôle joué par le NGD dans le cytoplasme. Au cours de ma thèse, j'ai étudié cette voie de surveillance à l'aide d'une construction plasmidique capable d'exprimer un ARN tronqué ciblé par le NGD. Grâce à cette approche, j'ai montré qu'une attaque endoribonucléolytique unique dépendante de Hel2 et Cue2 était responsable d'un clivage de l'ARN au niveau du troisième ribosome bloqué durant l'élongation de la traduction. Nous avons également mis en évidence que cet événement, qui intervient à 8 nucléotides en amont du site P du ribosome, produit un fragment 3'-NGD possédant une extrémité 5'-hydroxylée. Cette extrémité est par la suite phosphorylée par la kinase Trl1. Nous proposons enfin que l'élimination de cet ARN est majoritairement assurée par la voie 5'-3' de dégradation avec l'action de Xrn1 et alternativement de Dxo1.

MOTS-CLES: No-Go Decay – dégradation 5'-3' – Trl1 – Ribosomes

Abstract

Gene expression is a complex mechanism that can lead to the production of aberrant messenger RNA that may in turn disrupt cell homeostasis. In eukaryotes, it exists several surveillance pathways in charge of degrading such RNA in the cytoplasm. The No-Go Decay (NGD) is one of those and degrades mRNA containing stacks of stalled ribosomes. This mechanism is characterized by an endoribonuclease that initiates cleavages upstream of the stall sequence. Their precise location, still under debate in the literature, has proven crucial in the understanding of the exact role of the NGD in the cytoplasm. During my thesis, we studied this surveillance pathway, using mRNAs expressing a 3'-ribozyme to produce truncated transcripts *in vivo* to mimic naturally occurring truncated mRNAs known to trigger NGD. Thanks to this technique, we were able to show that a unique endonucleolytic cleavage, which we find to be Hel2 and Cue2-dependent, occurs eight nucleotides upstream of the first P-site nucleotide within the third stacked ribosome. We demonstrate that this event produces a 3'-NGD RNA, which has a hydroxylated 5'-extremity that is then 5'-phosphorylated by the Trl1 kinase. Ultimately, we suggest that 5'-3' degradation pathway is then involved in the degradation of this RNA with the action of Xrn1 and Dxo1.

KEYWORDS: No-Go Decay – 5'-3' degradation – Trl1 – Ribosomes