



**HAL**  
open science

# L'implication et le rôle de la protéine kinase AKT1 dans le mécanisme de Nonsense-mediated mRNA decay (NMD)

Martine Palma

## ► To cite this version:

Martine Palma. L'implication et le rôle de la protéine kinase AKT1 dans le mécanisme de Nonsense-mediated mRNA decay (NMD). Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2021. Français. NNT : 2021LILUS027 . tel-03591280

**HAL Id: tel-03591280**

**<https://theses.hal.science/tel-03591280>**

Submitted on 28 Feb 2022

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

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

Université de Lille  
Ecole Doctorale Biologie – Santé Lille Nord de France EDBSL  
UMR9020 CNRS -UMR1277 Inserm- CANTHER  
Institut de Biologie de Lille

## **THESE DE DOCTORAT**

En vue de l'obtention du grade de Docteur de l'Université

Discipline : Biologie cellulaire

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée par

**Martine Palma**

Soutenue le 20 octobre 2021

**L'implication et le rôle de la protéine kinase AKT1  
dans le mécanisme de *Nonsense-mediated mRNA decay*  
(NMD)**

Composition du Jury de Thèse :

**Pr Eric Adriaenssens**, Professeur Université de Lille

Président

**Dr Anne-Laure Todeschini**, Maître de conférences

Rapporteur

**Dr Laurent Delpy**, Directeur de Recherche

Rapporteur

**Dr Aurélie Baguet**, Maître de conférences

Examineur

**Dr Fabrice Lejeune**, Directeur de Recherche

Directeur de thèse



*Qui ne doute pas acquiert peu.*

*Léonard de Vinci*

*Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre.*

*Marie Curie*

## Résumé

La protéine AKT1, appelée aussi protéine kinase B ou PKB, est un composant central de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui représente une des voies majoritaires des cellules régulant un nombre varié de processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, l'apoptose, la survie cellulaire ainsi que l'angiogenèse parmi d'autres. Sa nature de serine-thréonine kinase lui confère la capacité de phosphoryler une multitude de substrats, aussi impliqués dans d'autres voies de signalisation et créant ainsi un réseau de connexion très vaste avec comme finalité le bon fonctionnement cellulaire. Une faille dans le système de régulation d'un ou de plusieurs composants de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR provoque l'apparition de cancers. C'est le cas de la protéine AKT1 qui est fréquemment dérégulée dans les cellules cancéreuses, pouvant être mutée, délétée ou surexprimée selon les cas.

Les voies de signalisation ne sont pas les seuls événements assurant l'homéostasie cellulaire. De nombreux systèmes de surveillance sont présents, de la transcription de l'ADN jusqu'à la synthèse en protéine. Un des mécanismes de contrôle-qualité est le *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), qui cible spécifiquement les ARNm porteurs d'un codon stop prématuré (PTC) afin d'empêcher la synthèse de protéines tronquées qui pourraient avoir des effets néfastes pour la cellule, garder une partie ou la totalité de leur activité ou tout simplement être non fonctionnelles. Les PTC sont retrouvés dans les séquences géniques responsables d'un tiers des maladies génétiques ainsi que de nombreuses formes de cancer, mais le NMD est aussi capable de réguler l'expression physiologique de différents ARNm.

Le NMD fait intervenir une vingtaine de facteurs protéiques dont les protéines *up-frameshift*, UPF1, UPF2 et UPF3X. Les facteurs UPF1 et UPF2 sont des phosphoprotéines qui jouent un rôle central dans l'activation du NMD, et en particulier la protéine UPF1 qui doit être phosphorylée et déphosphorylée afin d'induire la dégradation d'un ARNm par le NMD. La seule kinase identifiée aujourd'hui dans le NMD est la protéine SMG1, une *PI3-kinase related kinase* qui phosphoryle le facteur UPF1. La probabilité que d'autres protéines kinases soient impliquées dans le NMD est par conséquent élevée.

Afin d'identifier de nouvelles protéines jouant un rôle dans le NMD, le criblage d'une banque d'inhibiteurs de kinases sur une construction luciférase sujette à une dégradation par le NMD nous a permis de découvrir trois inhibiteurs montrant une très forte capacité à inhiber le NMD. De manière intéressante, ces derniers ont tous les trois pour cible la protéine AKT1.

Nous avons ainsi entrepris d'étudier l'implication et l'éventuelle activité de la protéine AKT1 dans le mécanisme de NMD. La réalisation d'expériences capables de déterminer la possible intervention d'AKT1 dans le NMD a permis la validation des résultats obtenus lors du crible. Les interactions protéiques entre AKT1 et les différents facteurs du NMD ont été examinées et les données obtenues

montrent que la kinase AKT1 est capable d'interagir avec deux facteurs essentiels du NMD, les protéines UPF1 et UPF3X.

L'implication de la protéine AKT1 dans le NMD suggère une régulation de ce dernier par une nouvelle kinase et une efficacité modulée dans les cancers ou dans des situations spécifiques en fonction du niveau d'expression de la protéine AKT1 mais aussi des facteurs du NMD. Cette nouvelle kinase identifiée dans le NMD pourrait ouvrir de nouvelles possibilités de stratégies thérapeutiques dans des pathologies telles que le cancer.

## Abstract

The protein kinase AKT1, also known as protein kinase B or PKB, is one of the main factors involved in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway that plays a key role for the regulation of a variety of biological processes such as cell proliferation, apoptosis, cell survival and angiogenesis among others. This serine-threonine kinase has the ability to phosphorylate a high number of substrates, involved in some cases in multiple cellular signaling pathways with the creation of a complex network that ensure the correct activity of cells. The rupture of the PI3K/AKT/mTOR signaling regulation leads to the development of cancers. In fact, the AKT1 protein is often found overexpressed, overactivated or mutated in cancer cells.

To ensure the cellular homeostasis, the signaling pathways don't represent the only regulation system. From the DNA transcription to the protein synthesis, many quality control mechanisms are present that guard against defects in gene expression. The Nonsense-mediated mRNA decay or NMD represents one of them, which targets mRNA harboring a premature termination codon (PTC) in order to prevent the synthesis of a truncated protein. This protein could have cytotoxic effects, maintain some or all the protein activity or could simply be non-functional. PTC are responsible for a third of genetic diseases as well as many cancers, but the NMD is also able to regulate the physiological expression of many mRNAs.

NMD involves more than a dozen factors, including the up-frameshift proteins UPF1, UPF2 and UPF3X. The UPF1 and UPF2 factors are two phosphoproteins which are necessary for the NMD activation, in a particular way the UPF1 protein that have to be phosphorylated and dephosphorylated to induce the mRNA degradation by NMD. The only kinase identified today in the NMD is the SMG1 protein, a PI3-kinase related kinase that ensure the phosphorylation of UPF1. However, it is strongly expected that additional kinases are involved in the NMD.

In order to identify novel proteins that play a role in NMD, a screening system composed with a kinase inhibitor library allowed us to discover three putative NMD inhibitors targeting the same protein: the AKT1 protein.

After the validation of screening results with the involvement of AKT1 in the NMD, the protein interactions between AKT1 and the NMD factors were examined and the data obtained show that AKT1 kinase is able to interact with two essential NMD factors, the UPF1 and UPF3X proteins. In fact, the kinase AKT1 is able to phosphorylate the UPF1 protein.

The involvement of AKT1 in the NMD suggests a regulation of the NMD by a new kinase which can modulate the NMD efficiency depending on the AKT1 expression. A better comprehension of the role of AKT1 in NMD offer perspective on potential future directions for new therapeutic interventions on human cancer with AKT alteration.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer le travail que j'ai entrepris le long de ces trois années de thèse. Un remerciement au Professeur Eric Adriaenssens d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie Dr Anne-Laure Todeschini et Dr Laurent Delpy pour le temps consacré à la lecture (un peu longue) de mon manuscrit et à l'évaluation de mon projet de thèse. Je remercie tout autant Dr Aurélie Baguet en tant qu'examinatrice de mon travail.

Un très grand merci à Fabrice Lejeune, mon directeur de thèse, qui m'a tout appris. Je te remercie d'avoir partagé avec moi ta passion pour le monde de la recherche, de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi. J'ai appris à connaître une personne déterminée, qui ne lâche jamais rien et toujours disponible à toute heure de la journée ! J'ai grandi énormément pendant ces trois années de thèse en apprenant avec ton aide de nouvelles techniques, et qui mieux que toi pour savoir les galères avec les cellules !

Je tiens à remercier le directeur de l'équipe David Tulasne qui a toujours été disponible pour moi. Un grand merci va aussi à la directrice d'unité Isabelle Van Seuningen et à l'Unité Canther.

Je remercie la plateforme BICEL, et plus précisément Sophie Salomé et Elisabeth Werkmeister qui m'ont donné une aide précieuse pour toutes les expériences de microscopie.

Un énorme merci à Catherine, un modèle exemplaire à suivre pour moi, toujours à l'écoute, toujours disponible, une maman, une amie, une personne de grand cœur et qui se donne à 300%. Et parfois plus têtue que moi !

Un remerciement au « NMD », Virginie et Rebekah, avec qui j'ai partagé mes journées et les dernières manip aussi ! Virginie, toujours la bonne humeur et l'humour, avec qui j'ai bien parlé de tout, aussi de restaurants à tester et de bons plats ! Rebekah, tu m'as aidée sur cette dernière ligne droite et avec toi, tout était toujours prêt et très bien rangé ! Merci pour votre aide et pour votre écoute.

Un merci à Zoulika Kherrouche, tu es une personne de caractère et qui donne le courage et la force d'avancer dans un projet de thèse. Une personne de grand cœur et toujours disponible. A Marie-José, ta gentillesse et ton calme m'ont toujours transmis de la sérénité. Merci aussi pour les nombreuses plantes que tu m'as fournies !

Je remercie Anne Chotteau pour ses nombreux conseils et avec qui j'ai apprécié les longues discussions !

Je remercie les membres de l'équipe, Anne-Sophie, Audrey et la Dent 3. Merci à Célia avec qui je partage mon bureau, mes journées au labo, ça a été un vrai plaisir de te connaître et ça continuera de l'être. Je te souhaite tout le meilleur pour ces années de thèse, toujours avec force et courage ! Merci aussi de m'avoir nourrie (en me proposant les muffins pour me booster) et d'avoir pensé à moi.



Je tiens à remercier la Dent 2 et la Dent 3, avec qui on a pu organiser des « événements » hyper chouettes, avec les idées géniales et créatives d'Ingrid. Merci à Erwan, à Clémentine, Martha et Anthony avec qui j'ai pu partager les joies de la thèse mais aussi de bons moments en groupe.

Mon remerciement s'adresse aussi aux personnes que je n'ai pas citées mais qui sont dans mes pensées.

Un merci aux « anciens » du laboratoire, Angela, Philippe, Sonia, Camille, que je vois encore quand cela est possible et je vous fais des bisous à vous et à vos merveilleuses familles.

Merci à mes amies Marie, Sarah, Clara, Hana, Mélanie et Leslie, connues sur le lieu de travail et je ne sais pas comment j'aurais fait sans vous. Je vous remercie pour les sorties, les brunchs, les lancés de hache (même si ce n'est pas vraiment mon fort !), les soirées raclette ou les bons restaurants ! Merci à toi Marie, avec qui je n'ai pas pu me séparer, toujours ensemble au travail mais aussi en dehors. Comme des inséparables, avec nos pulls moches de Noël ! Ce serait trop long de raconter nos moments ensemble mais ce que je peux dire est que je suis heureuse d'avoir une amie comme toi. Merci à toi Sarah, « England ! », et à toi Clara (Plapla), vous avez toujours été là pour moi. Merci aussi à mes amies de la danse, Anais et Dorothee, j'ai hâte de vous revoir. Merci à Anita, ma meilleure amie avec qui j'ai pratiquement grandi !

Et maintenant à ma famille.

*Volevo ringraziare la mia famiglia che mi ha dato la vita e che mi ha dato tutto quello di cui potevo aver bisogno e non solo. Non mi avete mai fatto mancare niente, mi avete supportato e sopportato nei momenti alti e bassi e penso che l'amore incondizionato che provo per voi non potrà mai essere abbastanza. Ringrazio mio padre che mi ha insegnato i valori del lavoro e i bisogni che una persona non deve negarsi. Sei un esempio da seguire e nonostante abbiamo caratteri molto simili, sai mantenere il controllo molto più di me, trovando la soluzione ai problemi in un secondo. Ringrazio mia mamma, perché la mamma è sempre la mamma, e nonostante la lontananza, è l'unica persona che non ha bisogno di vederti o di parole per capire come sia andata la giornata. Un grazie a mia sorella, Domenica, sempre lì per me nonostante i nostri ritmi di vita. Vi voglio bene.*

*Sono riuscita a finire questo percorso grazie a voi e per voi. Vi dedico la mia tesi, frutto di un duro lavoro e sacrificio.*

# Sommaire

|  |     |
|--|-----|
| Liste des figures.....   | 1   |
| Liste des abréviations .....   | 3   |
| Introduction .....   | 6   |
| I. L'implication de la protéine kinase AKT dans les voies de signalisation .....   | 8   |
| 1) La protéine kinase AKT et sa voie de signalisation .....  | 8   |
| 2) La protéine kinase AKT .....  | 15  |
| 3) La régulation de l'activité de la kinase AKT.....   | 20  |
| 4) Les différents rôles physiologiques de la protéine AKT .....  | 28  |
| 5) Les pathologies associées à une dérégulation de la voie PI3K/AKT/mTOR et les stratégies thérapeutiques envisagées ..... | 34  |
| II. La maturation des ARN et les mécanismes de contrôle-qualités .....   | 39  |
| 1) De l'ARN pré-messager à l'ARN messager.....   | 39  |
| 2) Dégradation des ARNm .....  | 51  |
| 3) Mécanismes de surveillance des ARNm .....   | 57  |
| III. Le <i>Nonsense-mediated mRNA decay</i> (NMD).....   | 60  |
| 1) Les protéines du NMD : les acteurs du mécanisme de dégradation des ARNm porteurs de codons stop prématurés .....        | 60  |
| 2) Les mécanismes de reconnaissance d'un codon stop prématuré (PTC) et l'activation du NMD .....                           | 72  |
| 3) La localisation du NMD : la dégradation des ARNm dans le cytoplasme et le rôle des <i>P-bodies</i> .....                | 90  |
| 4) Les substrats naturels du NMD : la régulation physiologique des ARNm.....   | 94  |
| 5) Les différents facteurs intervenant dans la régulation du NMD.....  | 97  |
| 6) Les pathologies associées au NMD .....  | 102 |
| 7) Les stratégies proposées pour restaurer l'expression d'un ARNm porteur d'un PTC.....                                    | 112 |
| IV. La traduction de l'ARNm et le mécanisme de translecture.....   | 118 |
| 1) La machinerie ribosomique .....   | 118 |
| 2) Les étapes de la traduction .....   | 119 |

|   |     |
|---|-----|
| 3) Le mécanisme de la translecture.....   | 125 |
| Projet de thèse .....   | 127 |
| Résultats .....   | 128 |
| Résultats complémentaires .....   | 157 |
| Impact de l'absence d'AKT1 sur la dégradation des substrats naturels du NMD.....    | 157 |
| La phosphorylation in vitro des facteurs du NMD par les isoformes d'AKT .....       | 158 |
| Identification de la région pouvant être phosphorylée par AKT1 .....                | 159 |
| Impact de la mutation R253G d'UPF1 sur l'efficacité du NMD.....                     | 161 |
| Localisation des facteurs du NMD .....  | 163 |
| La dégradation des ARNm par NMD est située dans le cytoplasme.....                  | 165 |
| Matériels et Méthodes .....   | 166 |
| Discussion et perspectives.....   | 169 |
| Un lien entre la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et le mécanisme du NMD.....    | 171 |
| Un modèle d'activation du NMD : des cibles spécifiques .....                        | 172 |
| Activation possible de la protéine kinase AKT1 .....                                | 175 |
| Les deux kinases du NMD : action synergique ou compétitive ? .....                  | 176 |
| Le rôle exclusif de l'isoforme AKT1 sur le NMD.....                                 | 177 |
| L'activation du NMD par AKT1 uniquement dans certaines conditions ? .....           | 178 |
| Le rôle du NMD activé par AKT1 dans la tumorigenèse.....                            | 179 |
| Vers des perspectives cliniques : des stratégies thérapeutiques envisageables ..... | 180 |
| Références bibliographiques .....   | 181 |

## Liste des figures

- Figure 1 : Représentation des récepteurs RTKs ou d'un récepteur couplé à une protéine G (GPCR)
- Figure 2 : Fonctionnement des PI3K de classe IA et leur voie de signalisation
- Figure 3 : Composition des complexes mTORC1 et mTORC2
- Figure 4 : Mécanisme d'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR
- Figure 5 : Représentation de la structure des trois isoformes d'AKT
- Figure 6 : Effet contraire des isoformes AKT1 et AKT2 dans le cancer du sein
- Figure 7 : Translocation membranaire d'AKT
- Figure 8 : La réponse à un stress et le rôle des protéines Hsp dans la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR
- Figure 9 : Représentation des sites phosphorylés et des modifications post-traductionnelles d'AKT1
- Figure 10 : Les boucles de rétrocontrôle de la voie de signalisation PI3K
- Figure 11 : Les différents effets que peut avoir l'activation de la protéine AKT
- Figure 12 : Développement d'inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR
- Figure 13 : L'ajout de la coiffe en 5' sur l'ARN
- Figure 14 : L'événement de polyadénylation de l'ARN
- Figure 15 : Une des réactions de maturation de l'ARN est l'épissage constitutif
- Figure 16 : Représentation de l'épissage alternatif
- Figure 17 : Les étapes de maturation de l'ARN pré-messager en ARN messager et l'export vers le cytoplasme
- Figure 18 : Les différentes enzymes dans la dégradation des ARNm
- Figure 19 : Représentation de la protéine UPF1
- Figure 20 : Schéma de la structure d'UPF2
- Figure 21 : Structure des protéines UPF3/UPF3X et interactions protéiques
- Figure 22 : Domaines présents dans la protéine kinase SMG1 et interactions protéiques
- Figure 23 : Structure des protéines SMG5, SMG6 et SMG7 et interactions protéiques
- Figure 24 : Structure des protéines SMG8 et SMG9
- Figure 25 : Composition du complexe EJC
- Figure 26 : Assemblage des différentes protéines qui composent l'EJC sur l'ARN
- Figure 27 : Les caractéristiques des ARNm soumis au NMD
- Figure 28 : Activation du NMD dépendant de l'EJC
- Figure 29 : L'activation du NMD indépendant de l'EJC
- Figure 30 : La régulation de l'expression de la sélénoprotéine

- Figure 31* : Les ARNm qui possèdent deux phases ouvertes de lecture
- Figure 32* : L'autorégulation de certains ARNm
- Figure 33* : Le positionnement du PTC sur l'ARNm de la  $\beta$ -globine conduit à une forme de  $\beta$ -thalassémie
- Figure 34* : Complexe des protéines associées à la dystrophine
- Figure 35* : Représentation du canal CFTR.
- Figure 36* : Induire le saut de l'exon comme stratégie pour l'expression de l'ARNm
- Figure 37* : L'inhibition du NMD conduit à la synthèse d'une protéine tronquée
- Figure 38* : La machinerie ribosomique
- Figure 39* : L'initiation de la traduction
- Figure 40* : Représentation de l'élongation de la traduction
- Figure 41* : La terminaison de la traduction et le recyclage des protéines impliquées dans la traduction
- Figure 42* : L'impact de l'absence d'AKT1 sur la dégradation de substrats naturels du NMD
- Figure 43* : Phosphorylation *in vitro* des protéines UPF par les isoformes d'AKT
- Figure 44* : Phosphorylation *in vitro* de différents fragments de la protéine UPF1 par AKT1
- Figure 45* : Impact de la mutation R253G sur l'efficacité du NMD
- Figure 46* : Localisation des facteurs du NMD dans les deux lignées cellulaires
- Figure 47* : Interactions entre les protéines AKT1, UPF1 et UPF3X dans le cytoplasme
- Figure 48* : Représentation des interactions protéiques entre les facteurs du NMD et la kinase AKT1

## Liste des abréviations

|                |   |
|----------------|---|
| AGC            | <i>cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C</i>  |
| AGO2           | <i>Argonaute Protein-2</i>                                  |
| AKT            | <i>protéine kinase B</i>                                    |
| AMPK           | <i>AMP-activated protein kinase</i>                         |
| BAD            | <i>BCL2 associated death promoter</i>                       |
| BPS            | <i>branch point sequence</i>                                |
| CBC            | <i>Cap-Binding Complex</i>                                  |
| CBP20 et CBP80 | <i>Cap-binding protein</i>                                  |
| CFI et CFII    | <i>cleavage factor I and II</i>                             |
| CFTR           | <i>Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Regulator</i> |
| CNOT8          | <i>CCR4-NOT transcription Complex Subunit 8</i>             |
| CPSF           | <i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>      |
| CStF           | <i>Cleavage Stimulation factor</i>                          |
| CTD            | <i>domaine carboxy-terminal</i>                             |
| CTMP           | <i>carboxyl-terminal modulator protein</i>                  |
| CWC22          | <i>complexed with CEF1 22</i>                               |
| DCP1a          | <i>decapping mRNA enzyme 1a</i>                             |
| DCP2           | <i>decapping enzyme 2</i>                                   |
| DCPS           | <i>Scavenger Decapping enzyme</i>                           |
| DECID          | <i>Decay inducing complex</i>                               |
| Deptor         | <i>DEP domain containing mTOR-interacting protein</i>       |
| DUB            | <i>enzymes de déubiquitination</i>                          |
| EBM            | <i>EJC-binding motif</i>                                    |
| Edc            | <i>Enhancer of Decapping</i>                                |
| EGF            | <i>Epidermal growth factor</i>                              |
| EGFR           | <i>récepteurs du facteur de croissance épidermique</i>      |
| eIF            | <i>eukaryotic translation initiation factor</i>             |
| eIF4A3         | <i>eukaryotic initiation factor A3</i>                      |
| EJC            | <i>Exon Junction Complex</i>                                |
| eNOS           | <i>endothelial nitric oxide synthase</i>                    |
| eRF            | <i>facteur de terminaison</i>                               |
| ESE            | <i>exonic splicing enhancer</i>                             |
| ESS            | <i>exonic splicing silencer</i>                             |
| Fbw8           | <i>F-box and WD Repeat Domain Containing 8</i>              |
| FHIT           | <i>Fragile histidine triad</i>                              |
| FKBP12         | <i>FK-binding protein</i>                                   |
| FoxO           | <i>forkhead box</i>   |
| FRB            | <i>FKBP12- rapamycin binding domain</i>                     |
| GAB            | <i>Grb2-associated protein</i>                              |
| GPCR           | <i>récepteur couplé à une protéine G</i>                    |
| Grb2           | <i>Growth factor receptor bound protein 2</i>               |
| GSK3 $\alpha$  | <i>glycogen synthase kinase 3<math>\alpha</math></i>        |
| HAT            | <i>histone acetyltransferase</i>                            |
| HDAC           | <i>histone deacetylase</i>                                  |

|                      |   |
|----------------------|---|
| HEAT                 | <i>Huntington, EF3, A subunit of PP2A, TOR</i>                                  |
| hnRNP                | <i>heterogenous nuclear ribonucleoproteins</i>                                  |
| Hsp                  | <i>heat shock protein</i>   |
| IGF1R                | <i>récepteurs à insuline-like Growth Factor</i>                                 |
| IKK                  | <i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>   |
| IRS                  | <i>Insulin receptor substrate</i>   |
| ISE                  | <i>intronic splicing enhancer</i>   |
| ISS                  | <i>intronic splicing silencer</i>   |
| LSM1-LSM7            | <i>Sm-like protein 1- 7</i>   |
| MAGOH                | <i>mago-nashi homolog</i>   |
| Mdm2                 | <i>murine double minute 2</i>   |
| MIF4G                | <i>Middle portion of eIF4G</i>  |
| MLN51                | <i>metastatic lymph node 51</i>   |
| mLST8                | <i>mammalian lethal with sec-13 protein 8 ou G<math>\beta</math>L</i>           |
| mTORC1 et mTORC2     | <i>mammalian target of rapamycin complexes 1 and 2</i>                          |
| NES                  | <i>Nuclear Export Sequence</i>  |
| NF- $\kappa$ $\beta$ | <i>activator of the proinflammatory nuclear factor-kappa <math>\beta</math></i> |
| NGD                  | <i>No-Go decay</i>  |
| NLS                  | <i>Nuclear Localisation Sequence</i>  |
| NMD                  | <i>Nonsense-mediated mRNA decay</i>   |
| NPC                  | <i>nuclar pore complexes</i>  |
| NRD                  | <i>negative regulatory domain</i>   |
| NSD                  | <i>Non-Stop decay</i>   |
| Nudix                | <i>Nucleoside Diphosphate linked to a variable moiety X</i>                     |
| NXF1                 | <i>nuclear export factor 1</i>  |
| NXT1                 | <i>NTF2-related export protein</i>  |
| PABPC1               | <i>poly-A binding protein</i>   |
| PABPN1               | <i>poly-A binding protein</i>   |
| PAP                  | <i>poly(A) polymérase</i>   |
| PARN                 | <i>poly-A specific ribonuclease</i>   |
| PAS                  | <i>polyadenylation signal</i>   |
| <i>P-bodies</i>      | <i>processing bodies</i>  |
| PDGF                 | <i>Platelet-derived growth factor</i>   |
| PKD1                 | <i>phosphatidylinositol-3-dependent kinase 1</i>                                |
| PHLDA3               | <i>pleckstrin homology-like domain, family A, member 3</i>                      |
| PHLPP                | <i>PH-domain leucin-rich repeat protein phosphatases</i>                        |
| PI3K                 | <i>protéine phosphoinositide-3 kinase</i>                                       |
| PIKK                 | <i>phosphatidyl-Inositol (PI) 3-kinase-related kinase</i>                       |
| PIN                  | <i>PilT N-terminus domain</i>   |
| PIP2                 | <i>phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate</i>                                   |
| PIP3                 | <i>phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate</i>                                |
| PNCR2                | <i>Proline-Rich Nuclear Receptor Coactivator 2</i>                              |
| PP2A                 | <i>protein phosphatase 2A</i>   |
| PRAS40               | <i>proline-rich Akt substrate 40 kDa</i>  |
| Protor1/2            | <i>protein observed with rictor 1 and 2</i>                                     |
| PTC                  | <i>premature termination codon</i>  |
| PTEN                 | <i>phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>                 |
| PYM                  | <i>Partner of Y14 and MAGOH</i>   |
| Raptor               | <i>regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin</i>           |

|         |  |
|---------|--|
| RENT1   | <i>regulator of nonsense transcript 1</i>                        |
| Rheb    | <i>Ras holomog enriched in brain</i>                             |
| Rictor  | <i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>                   |
| RISC    | <i>RNA-induced silencing complexe</i>                            |
| RNPS1   | <i>RNA-binding protein with Ser-rich domain 1</i>                |
| RRM     | <i>RNA Recognition Motif</i>                                     |
| RTK     | récepteurs tyrosine kinases                                      |
| RUST    | <i>Regulated Unproductive Splicing and Translation mechanism</i> |
| SBP2    | <i>SECIS binding protein 2</i>                                   |
| SELOR   | <i>Speckle Localizer and RNA-binding module</i>                  |
| SHIP    | <i>SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase</i>             |
| Sin-1   | <i>stress-activated map kinase-interacting protein 1</i>         |
| siRNA   | <i>small interfering RNA</i>                                     |
| site A  | site Aminoacyl   |
| site E  | site Exit  |
| site P  | site Peptidyl  |
| SKI2    | <i>Superkiller-2</i>   |
| SMG     | <i>suppressor with morphological effect on genitalia</i>         |
| snoRNA  | ARN nucléolaires   |
| snRNA   | ARN nucléaires   |
| SURF    | <i>SMG1/8/9-UPF1- eRF1 and eRF3 complex</i>                      |
| TCR-β   | récepteur β des lymphocytes T                                    |
| TFIIH   | facteur de transcription II H                                    |
| TPI     | triosephosphate isomérase  |
| TSC1    | <i>Tuberous Sclerosis 1</i>                                      |
| TSC2    | <i>Tuberin</i>   |
| U snRNP | <i>small nuclear RNPs</i>  |
| U1BD    | <i>UPF1 binding domain</i>                                       |
| uORF    | <i>upstream open reading frame</i>                               |
| UPF     | <i>up-frameshift</i>   |
| USP43   | <i>ubiquitin-specific protease</i>                               |
| XRN     | exoribonucléases   |
| Y14     | <i>RNA binding motif protein 8A</i>                              |
| YAP     | <i>Yes-associated protein</i>                                    |
| 4E-BP1  | <i>eIF4E-binding protein 1</i>                                   |
| 5-HT    | récepteurs sérotoninergiques                                     |



## **Introduction**

Chaque cellule de l'organisme reçoit des messages et des indications pour la production de protéines à partir d'un ARNm qui est transcrit de l'ADN, ou pour permettre l'action de différentes protéines, afin de déterminer le bon fonctionnement des cellules. Ces messages peuvent être extra ou intracellulaires, et déclenchent l'activation de voies de signalisation avec le but de véhiculer l'information jusqu'à la destination finale. Une multitude de protéines se donne le « relais », et active la cascade de phosphorylation qui représente l'événement le plus fréquent pour la transmission du signal.

Les voies de signalisation sont nombreuses et sont généralement interconnectées entre elles, avec certaines protéines qui jouent le rôle de carrefour pour la transmission du signal d'une voie à une autre ou tout simplement jusqu'à l'activité finale d'une protéine. Une des voies de signalisation phare dans la régulation d'événements cellulaires est la voie PI3K/AKT/mTOR, qui gouverne des processus tels que la prolifération et la survie cellulaire, la régulation de l'apoptose, la synthèse protéique, le métabolisme, et d'autres encore. Aujourd'hui, elle représente une voie de signalisation étudiée sous tous ses aspects puisqu'une dérégulation de celle-ci est la cause d'un nombre élevé de pathologies telles que les cancers, dont le cancer du sein, des ovaires, des poumons ou de la prostate (Cohen, 2013; Toker and Marmiroli, 2014).

Les trois acteurs principaux de cette voie de signalisation, et qui représentent trois kinases, sont la protéine phosphoinositide-3 kinase (PI3K), la protéine AKT (protéine kinase B ou PKB) et la protéine *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR). Ces trois kinases forment des nœuds où le signal pourra suivre un certain chemin par rapport à un autre.

Les voies de signalisation ne sont pas les seules à établir un bon fonctionnement cellulaire, mais d'autres mécanismes interviennent dans des conditions particulières. Un exemple est celui du *Nonsense-mediated mRNA decay* (ou NMD) qui représente un système de contrôle-qualité après la transcription de l'ADN en ARN, puis sa maturation et son export dans le cytoplasme, afin de vérifier la conformité de l'ARNm avant sa traduction en protéine. En effet, si la séquence d'ARNm présente un codon stop prématuré (ou PTC), il va être reconnu comme tel par le NMD et dégradé afin de prévenir la synthèse d'une protéine tronquée qui pourrait être néfaste pour la cellule. Ce mécanisme de surveillance ne joue pas uniquement un rôle dans la dégradation des ARNm porteurs d'un PTC, mais semblerait intervenir dans d'autres processus cellulaires, par exemple dans la régulation de la longueur des télomères (Conti and Izaurralde, 2005; Reichenbach et al., 2003).

La cellule utilise ainsi différentes voies afin de garantir l'activité correcte de l'organisme, en interconnectant par exemple plusieurs mécanismes cellulaires entre eux tels que la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et le mécanisme du NMD (J. Park et al., 2016).

# I. L'implication de la protéine kinase AKT dans les voies de signalisation

## 1) La protéine kinase AKT et sa voie de signalisation

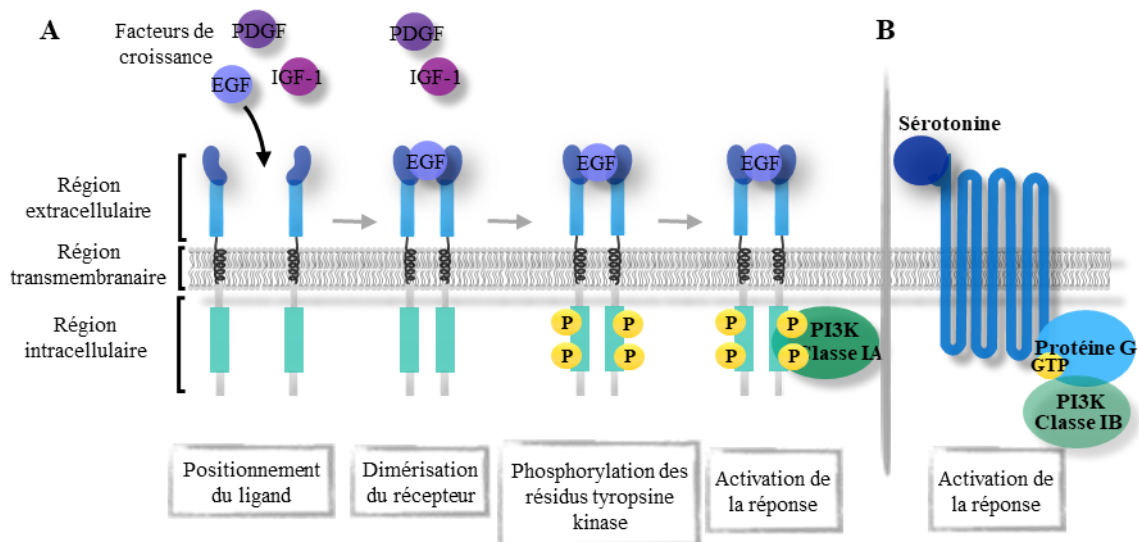
La protéine AKT est une sérine-thréonine kinase faisant partie de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Cette voie de signalisation représente un carrefour entre différents chemins, chacun d'entre eux régulant une activité précise et nécessaire au bon développement de la cellule. La protéine AKT se trouve ainsi au centre, interconnectant différentes voies qui peuvent communiquer entre elles. Une altération dans la régulation de cette voie de signalisation, telle qu'une mutation d'un des facteurs impliqués dans la transmission du signal, peut entraîner l'apparition de pathologies telles que le diabète ou le cancer (Toker and Marmiroli, 2014).

- La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

L'identification de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR commença dans les années 1980 lors de la caractérisation de la signalisation du récepteur à insuline, et ainsi lors de la découverte des récepteurs tyrosine kinases (RTKs). Cette voie régule finement de nombreux processus cellulaires tels que la survie, la prolifération cellulaire, la migration, le métabolisme, l'angiogenèse, la synthèse protéique et des événements liés à la transmission du signal synaptique au niveau du système nerveux (Brazil and Hemmings, 2001; Hemmings and Restuccia, 2012).

La voie PI3K/AKT/mTOR peut être activée de différentes manières, notamment par la fixation de ligands spécifiques tels que des facteurs de croissance comme IGF-1, PDGF, EGF ou des interleukines comme IL-2 sur les récepteurs RTKs. Parmi les membres de cette famille, on trouve les récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR), les récepteurs à insuline-like *Growth Factor* (IGF1R), les récepteurs hormonaux HER2, les récepteurs de cytokines entre autres. Les RTKs possèdent trois domaines, et plus précisément une région extracellulaire, une région transmembranaire et une région intracellulaire. Le positionnement du ligand sur le domaine extracellulaire du récepteur aboutit à des changements conformationnels induisant et stabilisant la dimérisation du récepteur en question. Une fois la dimérisation conclue, un événement de transphosphorylation des résidus tyrosine kinase de la région intracellulaire du récepteur (dans le domaine tyrosine kinase), conduit à l'activation de celui-ci et à la cascade de transduction du signal, avec les effecteurs en aval qui transmettent le signal jusqu'au noyau cellulaire. La région intracellulaire a la capacité de servir comme site d'ancrage de protéines intracellulaires ou tout simplement de sous-unités, telles que p85 qui représente une sous-unité

régulatrice de la protéine PI3K (Brazil and Hemmings, 2001; Toker and Marmiroli, 2014; Toulany et al., 2007) (*Figure 1*).



*Figure 1* : Représentation des récepteurs RTK ou d'un récepteur couplé à une protéine G (GPCR).

**A.** Après la reconnaissance du ligand par son récepteur, un événement de dimérisation a lieu qui permet de conduire à la transphosphorylation de celui-ci. Les résidus tyrosine kinase phosphorylés interagissent et activent la protéine phosphoinositide-3 kinase (PI3K) appartenant à la classe IA. **B.** Les kinases PI3K de classe IB sont en revanche activées par les récepteurs GPCR tels que le récepteur 5-HT reconnaissant la sérotonine. Ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaires dont la troisième boucle intracellulaire interagit avec une ou plusieurs protéines G. La protéine G assure l'échange de GDP en GTP, nécessaire à l'activation de la PI3K.

La transmission du signal au sein de cette voie de signalisation se fait par l'intermédiaire de trois protéines centrales, et plus précisément la protéine phosphoinositide-3 kinase (PI3K), la protéine AKT (ou protein kinase B (PKB)) et la protéine *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR).

- Le premier acteur : la protéine PI3K

La protéine phosphoinositide-3 kinase ou PI3K fait partie d'une famille de protéines présentant une activité de phosphorylation des lipides. La particularité de cette protéine est de phosphoryler les phosphoinositides (ou PI) membranaires, appelés aussi lipides à inositol, en position 3 du noyau inositol (Krasilnikov, 2000; Thorpe et al., 2015).

Il existe trois classes de protéines PI3K nommées classes I, II et III, et possèdent des caractéristiques distinctes telles que l'interaction avec des substrats différents. La première classe de PI3K est celle majoritairement étudiée et se subdivise en deux sous-groupes appelés IA et IB (*Figure 1*). Tout d'abord, la protéine PI3K est une enzyme hétérodimérique présentant deux sous-unités de fonction différente. La première sous-unité est appelée p110 et possède une activité catalytique. La deuxième, appelée p85, est

une sous-unité régulatrice. La protéine PI3K peut être activée directement après la liaison du ligand à son récepteur à activité tyrosine kinase en activant initialement la sous-unité régulatrice p85 ou par l'intermédiaire de la protéine Ras par sa liaison avec la sous-unité p110. Dans la classe IA des protéines PI3K, la sous-unité p110 présente trois isoformes appelées p110 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$ , qui sont exprimées de façon différente, notamment les isoformes  $\alpha$  et  $\beta$  sont ubiquitaires alors que la  $\delta$  est exprimée dans les leucocytes (Vanhaesebroeck et al., 2012). La sous-unité p85 quant à elle, présente cinq isoformes nommées p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$  et p55 $\gamma$  (Figure 2). Cette classe de PI3K est activée par les récepteurs RTKs alors que les PI3K de classe IB ont une activation par des récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) tels que les récepteurs à adénosine ou les récepteurs sérotoninergiques (5-HT) activés par la sérotonine (New et al., 2007) (Figure 1). Les kinases de classe IB ne présentent qu'une seule isoforme de p110, appelée p110 $\gamma$ , et la sous-unité régulatrice peut être de deux isoformes, soit p101 ou p87 (Thorpe et al., 2015; Vanhaesebroeck et al., 2012).

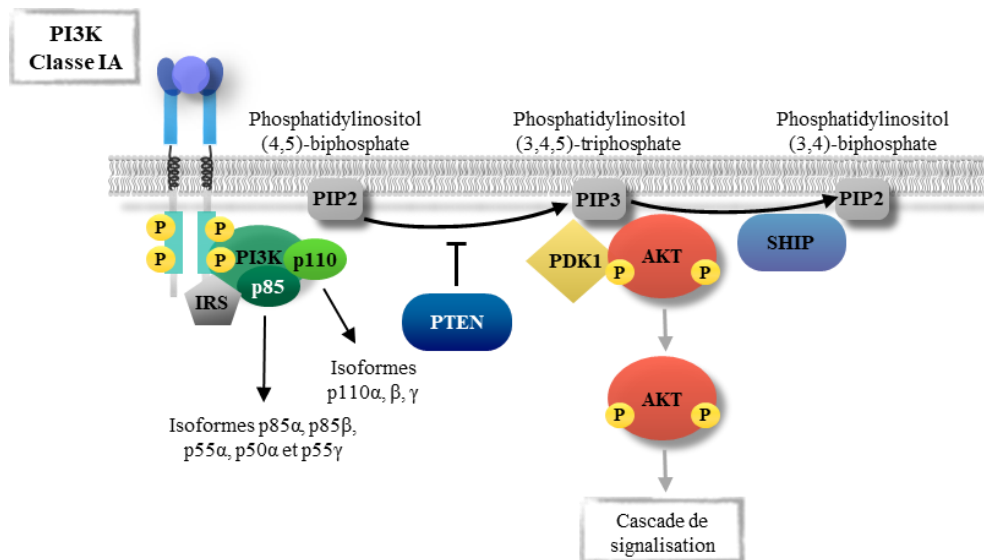


Figure 2 : Fonctionnement des PI3K de classe IA et leur voie de signalisation. Après l'activation du récepteur RTK, la phosphorylation de la PI3K peut être effectuée par le récepteur ou bien par une protéine adaptatrice appelée IRS. La PI3K activée transforme le PIP2 en PIP3 qui sera reconnu par les protéines AKT et PDK1. La kinase PDK1 phosphoryle AKT et entrainera la cascade de phosphorylation. Les deux phosphatases PTEN et SHIP permettent la conversion du PIP3 en PIP2.

Nous allons nous intéresser majoritairement à la première classe de PI3K et mettre de côté les PI3K de classe II et de classe III (Liu et al., 2009).

La kinase PI3K a la particularité de transformer le phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3), qui représente le principal lipide produit, fondamental pour le recrutement membranaire de la protéine AKT. En effet, nous pouvons parler de translocation membranaire d'AKT, étape cruciale pour la phosphorylation de la protéine AKT par une sérine-thréonine kinase puisqu'AKT aura la conformation adéquate au niveau membranaire pour accepter un groupe phosphate. La kinase en question, permettant la phosphorylation d'AKT, est la

*phosphatidylinositol-3-dependent kinase 1* (PDK1) (Andjelkovic et al., 1997; Lemmon and Ferguson, 2000; Song et al., 2005).

Deux phosphatases régulant l'activation de PI3K sont connues, notamment la *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten* (PTEN) et la *SH2 domain-containing inositol 5'-phosphatase* (SHIP). La protéine PTEN représente un gène suppresseur de tumeurs, souvent retrouvé muté dans certaines anomalies génétiques telles que des syndromes congénitaux comme la maladie de Cowden, mais aussi dans de nombreuses formes de cancers, notamment le cancer de la prostate, du rein, de l'ovaire et d'autres encore. La protéine PTEN catalyse la conversion du phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) en phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP2) par déphosphorylation et la protéine SHIP du PIP3 en phosphatidylinositol (3,4)-biphosphate (PIP2). Le PIP2 ne sera ainsi plus reconnu par la protéine AKT, avec comme conséquence l'inactivation de la voie de signalisation (Aman et al., 1998; Carracedo and Pandolfi, 2008).

- Les deux complexes composés de mTOR

mTOR est une sérine-thréonine kinase qui fait partie de la famille des kinases PIKK (*phosphatidylinositol 3-kinase related kinase protein*). Cette kinase intracellulaire de 289 kDa a été découverte chez les mammifères en 1994 avec l'étude du mécanisme d'action de la rapamycine, antibiotique macrolide qui lui a donné son nom (Brown et al., 1994; Chen et al., 1994). La protéine mTOR appartient au complexe mTORC1, sensible à la rapamycine, et au complexe mTORC2, insensible au macrolide en question (Laplante and Sabatini, 2012).

La protéine mTOR est composée à son extrémité N-terminale d'une répétition en tandem d'environ 20 séquences appelées HEAT (*Huntington, EF3, A subunit of PP2A, TOR*). mTOR est aussi composée de deux domaines FAT, appelés FAT et FATC, qui ont la capacité de maintenir la conformation optimale du site actif. Le premier domaine FAT est suivi d'un domaine de liaison pour une protéine, appelé *FKBP12- rapamycin binding domain* (FRB), qui interagit avec la protéine FKBP12 (*FK-binding protein*). Cette dernière permet le transport de la rapamycine. Pour finir, à son extrémité C-terminale, mTOR possède un domaine appelé NRD (*negative regulatory domain*) comprenant deux sites de régulation de mTOR, notamment la Ser2446 et la Thr2448, et le deuxième domaine FATC (Hay, 2004) (*Figure 3A*).

Comme énoncé précédemment, mTORC1 et mTORC2 sont formés par la même protéine centrale, la protéine mTOR et des protéines communes telles que Deptor (*DEP domain containing mTOR-interacting protein*) ayant une activité inhibitrice sur mTOR, mLST8 (*mammalian lethal with sec-13 protein 8 ou GβL*) ayant un rôle de protéine adaptatrice, ainsi que de Tti1/Tel2 ayant un rôle dans l'assemblage et la stabilité des deux complexes (Kaizuka et al., 2010; Peterson et al., 2009). Cependant,

ces deux complexes sont constitués de facteurs spécifiques à l'un ou à l'autre complexe. Le rôle de ces facteurs est de conférer la capacité à interagir avec des substrats différents et à les réguler de façon indépendante. Le complexe mTORC1 est constitué par exemple de la protéine Raptor (*regulatory-associated protein of mammalian target of rapamycin*), importante pour la régulation du complexe, de PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40 kDa*) possédant une activité inhibitrice de mTORC1 et de la protéine Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) permettant l'activation du complexe. En revanche, mTORC2 est composé des protéines Rictor (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) et Sin-1 (*stress-activated map kinase-interacting protein 1*) qui sont deux protéines de régulation permettant l'assemblage du complexe mTORC2 mais aussi le lien et l'interaction avec les substrats ou protéines telles que SGK1. La dernière protéine composant mTORC2 est Protor1/2 (*protein observed with rictor 1 and 2*) ayant elle aussi une activité régulatrice sur le complexe (Dos D. Sarbassov et al., 2004; Hara et al., 2002; Jacinto et al., 2006; Pearce et al., 2007; Sancak et al., 2007) (Figure 3B).

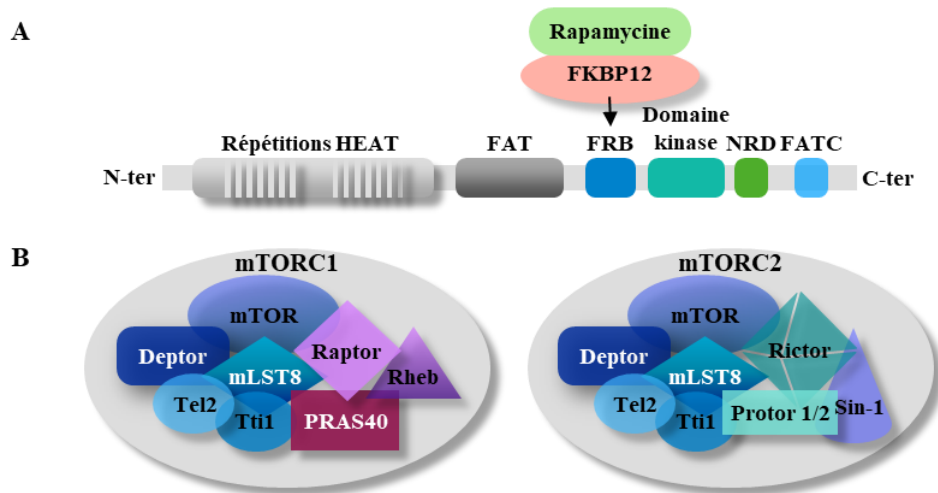


Figure 3 : Composition des complexes mTORC1 et mTORC2. **A.** Structure de la protéine mTOR qui forme le noyau des deux complexes. **B.** Les protéines composants mTORC1 et mTORC2.

Selon le mode d'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR, un complexe s'imposera sur l'autre. C'est le cas de mTORC1 qui répond à de nombreux facteurs intra et extracellulaires tels que les facteurs de croissances, les acides aminés, le stress, le niveau énergétique (niveau d'ATP), l'oxygène, mais aussi la rapamycine. Le but final est celui de réguler par exemple la synthèse de macromolécules, le métabolisme, l'autophagie, la croissance et la progression du cycle cellulaire notamment. En revanche, mTORC2 intervient dans la voie de signalisation dans la régulation de la survie cellulaire, du métabolisme, de la réorganisation du cytosquelette mais aussi dans la phosphorylation de la protéine AKT. Le complexe mTORC1 peut être activé via différents ligands sur les récepteurs correspondants ou en réponse à un stress tel qu'un déficit énergétique. En effet, lorsque le ratio AMP/ATP est élevé, les niveaux énergétiques sont très bas et la protéine *AMP-activated protein kinase* (AMPK) conduit à une inhibition de Raptor par phosphorylation qui conduit à son tour à une activation de mTORC1. De même,

une diminution d'un acide aminé en particulier, tel que la leucine, conduit à une déphosphorylation des effecteurs de mTORC1, dont S6K1 (Laplane and Sabatini, 2012; Ma and Blenis, 2009).

Comme indiqué auparavant, les deux complexes ne partagent pas les mêmes cibles. Les principaux substrats de mTORC1 sont la protéine 4E-BP1 (*eIF4E-binding protein 1*) et la protéine S6K1 ou p70S6K. La protéine 4E-BP1 est phosphorylée sur les sites Thr37 et Thr46 par mTORC1 et permettra le détachement de celle-ci du facteur de traduction eIF4E. La protéine eIF4E libre sera donc capable d'activer la traduction dépendante de la coiffe. La protéine S6K1 est impliquée dans la biogenèse ribosomale et sa phosphorylation permet la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S, mais aussi la régulation de l'apoptose. Un autre rôle important de la protéine mTORC1 est celui de permettre un rétrocontrôle négatif sur la protéine PI3K à l'aide de la kinase S6K1 phosphorylant IRS1 qui va induire à son tour une régulation sur la protéine PI3K. En revanche, une cible d'importance majeure de mTORC2 est la protéine AKT puisqu'il a été démontré qu'elle est capable de phosphoryler la Ser473 d'AKT1 afin de conduire à une activation complète de celle-ci (Laplane and Sabatini, 2012; Sarbassov, 2005).

- L'activation de la voie de signalisation

Les premières étapes de l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR sont gouvernées par le positionnement de ligands spécifiques sur leur récepteur RTK au niveau extracellulaire, ou bien par l'activation de la protéine Ras au niveau intracellulaire. Les récepteurs activés peuvent stimuler de façon directe la protéine PI3K ou bien peuvent stimuler de façon indirecte avec l'utilisation de protéines adaptatrices telles que le substrat du récepteur à insuline IRS (*Insulin receptor substrate*), la protéine Grb2 (*Growth factor receptor bound protein 2*) ou GAB (*Grb2-associated protein*). En effet, la protéine PI3K interagit avec les récepteurs activés présentant les motifs phosphotyrosines par interaction avec le domaine SH2 de la sous-unité p85. L'activation par Ras, qui représente une GTPase fondamentale à la voie de signalisation MAPK/ERK, se produit via une interaction avec PI3K par son domaine RDB (*Ras-binding domain*) de la sous-unité p110 (Krasilnikov, 2000; Thorpe et al., 2015; Vanhaesebroeck et al., 2012) (*Figure 4*).

Au niveau membranaire, l'activation de PI3K conduit à la conversion du phosphatidylinositol (3,4)-biphosphate (PIP2) en phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3). En effet, la kinase PI3K phosphoryle les phosphoinositides en position 3'-OH (D3) du cycle inositol afin de créer des produits lipidiques phosphorylés, fondamentaux pour le recrutement membranaire de la protéine AKT qui est capable d'interagir uniquement avec ces phospholipides, c'est-à-dire PIP3. Le recrutement membranaire d'AKT est nécessaire à l'activité de la protéine kinase PDK1, puisqu'elle peut accéder au site de phosphorylation d'AKT et le phosphoryler grâce à une modification conformationnelle de celle-ci. Le site en question est la Thr308 qui n'est pas le seul site permettant l'activation d'AKT. Le complexe



mTORC2 est connu pour phosphoryler un deuxième site, notamment la Ser473. La régulation de la protéine AKT ainsi que les sites de phosphorylation présents sur la protéine vont être décrits dans ce chapitre dans la partie « la régulation de l'activité de la kinase AKT » (Fu and Hall, 2020; Song et al., 2005; Stephens et al., 1998).

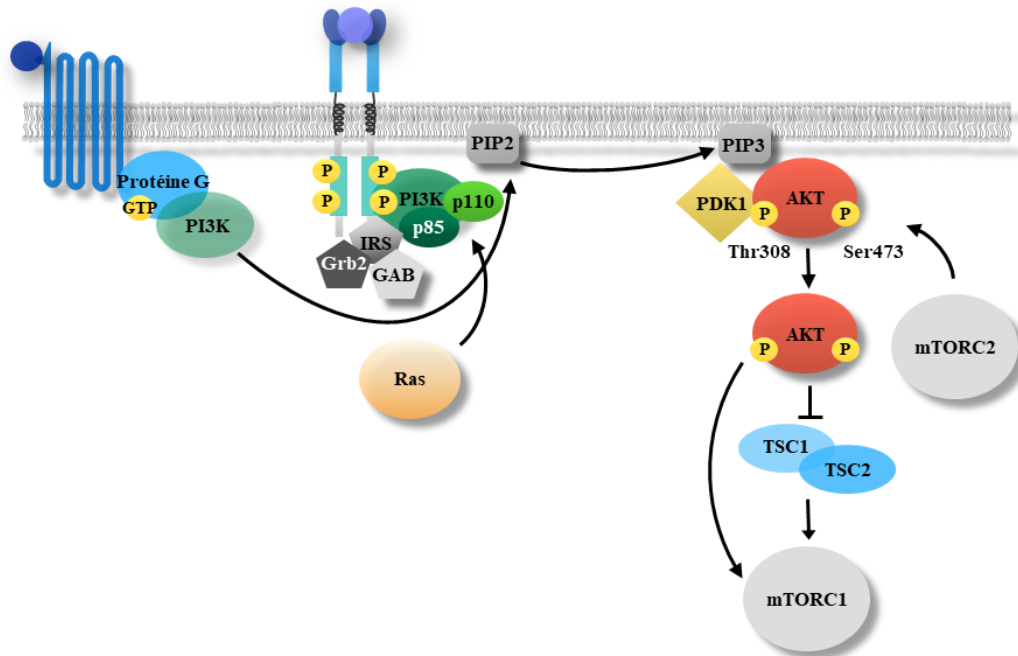


Figure 4 : Mécanisme d'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Selon le ligand, l'activation de la voie de signalisation pourra être différente. En effet, dans certains cas, les protéines adaptatrices telles que IRS, Grb2 ou GAB interviennent sur la PI3K, alors que dans d'autres cas la PI3K peut être activée par la protéine Ras ou bien par les GPCR. Une fois la conversion faite de PIP2 en PIP3 et la translocation membranaire d'AKT, les protéines kinases PDK1 et mTORC2 phosphorylent AKT, avec comme conséquence la phosphorylation directe de mTORC1 ou bien l'activation de mTORC1 via l'inhibition des protéines TSC1 et TSC2.

Une protéine qui inhibe la translocation membranaire d'AKT est la protéine PHLDA3 (*pleckstrin homology-like domain, family A, member 3*) qui interagit avec les lipides PIP3 en dépit de la protéine AKT qui ne peut se lier (Takikawa and Ohki, 2017).

Une fois la phosphorylation faite, l'activation d'AKT entraîne la continuation de la cascade de signalisation avec le complexe mTORC1 mais pas uniquement. La cible mTORC1 est activée par AKT par inhibition de l'hétérodimère composé de TSC1 et TSC2 qui régule mTORC1 (TSC1 pour *Tuberous Sclerosis 1* ou *hamartin* et TSC2 pour *tuberin*). D'autres cibles sont présentes selon le signal initial déclenché, telles que BAD, Mdm2 et d'autres encore, régulant des processus biologiques comme l'activation de l'apoptose et la progression du cycle cellulaire (Manning and Toker, 2017).

## 2) La protéine kinase AKT

Les premières recherches sur la protéine AKT remontent à une quarantaine d'années, avec la découverte en 1977 par Staal et ses collègues d'une transformation par le virus murin de la leucémie de cellules issues du thymus de souris ayant une incidence élevée de lymphomes spontanés (Staal et al., 1977). C'est seulement vers le début des années 90 que différentes équipes de recherche comme Tsichlis et al. identifièrent le gène *AKT* comme un homologue cellulaire de l'oncogène *v-Akt* transduit par le rétrovirus murin appelé AKT8, déjà décrit auparavant par Staal (Bellacosa et al., 1991).

Une autre dénomination de la protéine AKT est celle de protéine kinase B (PKB) puisque dans les mêmes années, deux autres groupes reconnurent des séquences apparentées aux protéines kinases A et C dans les ADNc codant AKT (Coffer and Woodgett, 1991; Jones et al., 1991).

Ainsi, au fil des années, AKT a été décrite comme un des effecteurs majeurs de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Cette protéine, faisant partie de la famille des protéines kinases AGC (*cAMP-dependent, cGMP-dependent and protein kinase C*), est une sérine/thréonine kinase contrôlant des processus cellulaires nécessaires au bon fonctionnement des cellules comme le métabolisme, la prolifération, la survie, la croissance cellulaire, mais aussi l'apoptose. Une dérégulation d'un des membres de cette voie de signalisation entraîne l'apparition non seulement de dysfonctionnements métaboliques ou neuronaux, mais aussi d'autres pathologies comme le cancer (Toker and Marmiroli, 2014).

- La structure et les trois isoformes de AKT : AKT1, AKT2 et AKT3

Trois paralogues pour la protéine AKT sont décrits : les protéines AKT1 (appelée aussi PKB $\alpha$ ), AKT2 (PKB $\beta$ ) et AKT3 (PKB $\gamma$ ). La protéine AKT1 est codée par le gène *AKT1* localisé sur le chromosome 14q32, la protéine AKT2 par le gène *AKT2* sur le chromosome 19q13 et la protéine AKT3 par le gène *AKT3* sur le chromosome 1q44 (Toker and Marmiroli, 2014).

Présentant 80% de similarité de séquence, les isoformes renferment une architecture similaire, composées de (*Figure 5*) :

- Un domaine d'homologie à la plekstrine à l'extrémité N-terminale, appelé *PH-domain* (*pleckstrin homology domain*). Ce domaine permet d'interagir avec les phospholipides membranaires, plus particulièrement avec le phosphatidyl-inositol (3,4,5) triphosphate ou (3,4) diphosphate. Non seulement ce domaine permet le recrutement de la protéine à la membrane cellulaire mais aussi la reconnaissance de AKT comme substrat par des kinases spécifiques (Hanada et al., 2004). Dans 4-8% des cancers du sein, une mutation activatrice somatique est retrouvée dans le domaine PH,

remplaçant l'acide glutamique en lysine en position 17 de l'isoforme AKT1, appelée aussi E17K (Carpten et al., 2007).

- Un domaine appelé *linker* assurant la connexion entre le domaine PH et le domaine catalytique. Cette région est très peu conservée entre les isoformes (entre 17 et 46% de similarité) et ne possède pas d'homologie avec d'autres protéines humaines de façon significative. Ce domaine est formé d'une courte région hélice- $\alpha$  dont sa fonction reste encore inconnue, mais peut être la cause de spécificité du signal selon l'isoforme (Kumar and Madison, 2005; Toker and Marmiroli, 2014).
- Un domaine catalytique, appelé aussi domaine kinase. Ce domaine est central pour l'activité d'AKT et possède une forte homologie avec d'autres kinases de la famille AGC. Cette région est fondamentale pour la phosphorylation des substrats de la protéine AKT et ainsi entrainer la poursuite de la cascade de phosphorylation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. De manière intéressante, chacune des isoformes d'AKT possède une Thréonine dans ce domaine qui doit être phosphorylée pour permettre l'activité kinase. Dans le cas de l'isoforme AKT1, il s'agit de la Thréonine 308, pour l'isoforme AKT2 c'est la Thréonine 309 et enfin la Thréonine 305 pour AKT3 (Hanada et al., 2004; Hers et al., 2011).
- Un domaine hydrophobe, appelé aussi régulateur, à l'extrémité C-terminale composé d'environ 40 acides aminés. Le motif hydrophobe F-P-Q-F-S-Y est conservé dans la famille des kinases AGC et permet la régulation de la protéine après son activation (Peterson and Schreiber, 1999). Dans ce motif, la Serine doit être phosphorylée pour permettre l'activation de la protéine. Il s'agit de la Serine 473 pour AKT1, 474 pour AKT2 et 472 pour AKT3. Cette région permet de réguler et de maintenir l'activité kinase de la protéine AKT (Toker and Marmiroli, 2014).

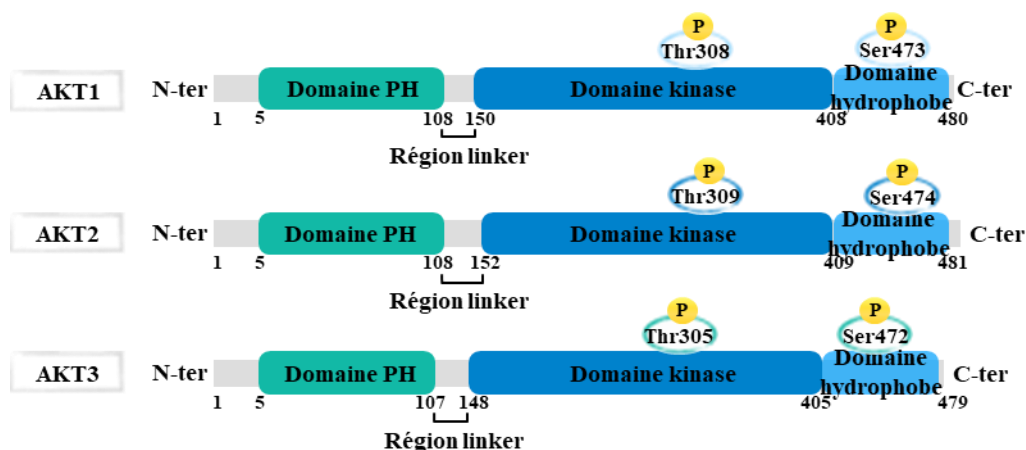
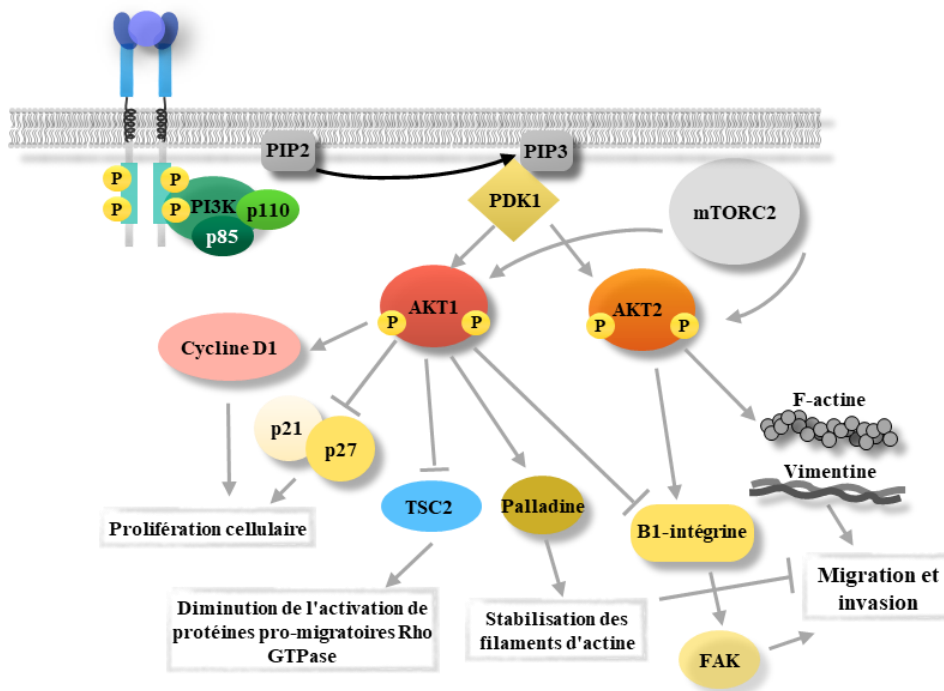


Figure 5 : Représentation de la structure des trois isoformes d'AKT. Les trois isoformes présentent trois domaines principaux, notamment le domaine PH, le domaine kinase et le domaine hydrophobe ou régulateur. Les sites de phosphorylation d'AKT1 sont la Thr308 et la Ser473, d'AKT2 les Thr309 et la Ser474 et d'AKT3 la Thr305 et la Ser472.

- Localisation et expression des différentes isoformes d'AKT

Malgré le pourcentage si élevé de similarité de séquences et leur architecture très semblable, les trois isoformes diffèrent par leur distribution dans les tissus mais aussi par la nature des substrats. Ces différences entraînent une spécificité du signal puisque selon la localisation tissulaire et la protéine phosphorylée, une voie de signalisation préférentielle sera activée (Gonzalez and McGraw, 2009a). Dans certains cas, deux isoformes d'AKT peuvent avoir une action contraire, notamment dans certaines formes de cancer du sein. En effet, il a été démontré qu'AKT1 et AKT2 agissent de façon opposée, où d'un côté l'isoforme AKT1 diminue la migration des cellules cancéreuses du sein en agissant sur la régulation par exemple de la protéine TSC2 et de la palladine, alors qu'AKT2 a la capacité de promouvoir la migration et l'invasion via la régulation par exemple de  $\beta$ -intégrines et de F-actine. Néanmoins, si d'une part AKT1 ne favorise pas l'invasion dans certaines situations, elle intervient dans la croissance tumorale (Hinz and Jücker, 2019; Riggio et al., 2017) (*Figure 6*).



*Figure 6* : Effet contraire des isoformes AKT1 et AKT2 dans le cancer du sein. Les deux isoformes peuvent activer des voies différentes telles que la prolifération cellulaire pour AKT1 et la migration et l'invasion pour AKT2. Un exemple est celui de la protéine  $\beta$ 1-intégrine qui est activée par AKT2 mais inhibée par AKT1.

L'isoforme AKT1 est ubiquitaire et elle est plus fortement exprimée par rapport aux deux autres isoformes AKT2 et AKT3. En effet, de par sa distribution tissulaire, elle a été montrée pour être impliquée dans différents processus biologiques comme la croissance cellulaire ou la survie (Chen, 2001).

En revanche, AKT2 est principalement exprimée dans les tissus sensibles à l'insuline, notamment le foie, mais aussi dans les tissus adipeux et les muscles squelettiques, avec une forte expression lors de

leur différenciation. Son activité régule principalement l'homéostasie du glucose contrôlant plus précisément le transporteur GLUT4 afin de permettre un trafic intracellulaire du glucose correct après le stimulus déclenché par l'insuline (Cho, 2001; Garofalo et al., 2003; Gonzalez and McGraw, 2009a; Kupriyanova and Kandror, 1999).

La localisation tissulaire d'AKT3 est assez restreinte en comparant avec celle des deux autres isoformes et son activité n'est pas encore tout à fait élucidée. En effet, elle est distribuée principalement au niveau du cerveau et des testicules. La seule information que nous possédons aujourd'hui est qu'elle semblerait intervenir dans le développement neuronal (Easton et al., 2005; Tschopp, 2005).

- Voie de signalisation activée selon l'isoforme

Chaque isoforme présente une voie préférentielle de signalisation, due en partie à la différente localisation tissulaire mais aussi à des stimuli extracellulaires distincts.

Cela fait maintenant une dizaine d'années qu'il a été démontré chez la souris une certaine spécificité du signal isoforme-spécifique. En effet, l'invalidation des gènes *Akt* chez la souris a permis d'élucider les rôles exclusifs des isoformes (Gonzalez and McGraw, 2009a).

Les souris n'exprimant plus le gène *Akt1* apparaissent de taille réduite par rapport aux souris sauvages. Effectivement, il a été démontré qu'un retard de la croissance embryonnaire et post-natale est présent, qu'une hypotrophie placentaire est installée, et qu'une diminution de la prolifération des fibroblastes embryonnaires est visible. Entre autres, dans des populations homogènes de cellules en culture invalidées d'*AKT1* sur les deux allèles, le processus apoptotique est fortement activé, indiquant un rôle d'AKT1 dans la survie cellulaire (Chen, 2001; Cho, 2001; Skeen et al., 2006).

Inversement, les souris *knock-out* pour le gène *Akt2* développent un phénotype de diabète de type 2, et les cellules dérivant de ces souris indiquent une dérégulation dans l'utilisation du glucose. Ce modèle murin nous renseigne sur le fait que l'isoforme Akt2 privilégie la voie de signalisation régulant l'homéostasie du glucose. De plus, une résistance à l'insuline apparaît lorsque Akt2 n'est pas exprimée, compensée par une hyperplasie des îlots  $\beta$  pancréatiques. Il a été démontré que chez les mêmes souris étaient présentes une lipoatrophie progressive ainsi qu'une dyslipidémie (Cho, 2001; Garofalo et al., 2003). Ces résultats ont été confirmés chez l'Homme par la mise en évidence d'une forme familiale de diabète de type MODY (*mature onset diabetes of the young*), présentant une mutation d'AKT2 de forme dominante négative (George, 2004).

Une chose à ne pas négliger est que selon le type cellulaire considéré, la fonction d'une isoforme peut varier. Un exemple est qu'une délétion d'*Akt2* a la capacité d'augmenter le pouvoir migratoire des

fibroblastes embryonnaires alors que cette capacité diminue dans plusieurs lignées cancéreuses (Irie et al., 2005; Zhou et al., 2006).

Concernant l'isoforme Akt3, il a été démontré que chez les souris ne possédant plus le gène *Akt3*, une déficience dans le développement du cerveau est visible, et par conséquent une réduction de la taille du cerveau. Ces résultats suggèrent un rôle d'Akt3 dans le développement neuronal (Easton et al., 2005; Tschopp, 2005).

Si l'on considère une combinaison de l'inactivation de deux isoformes sur les trois, des informations supplémentaires nous sont données, nous informant de possibles compensations ou substitutions des rôles des trois isoformes. Avant tout, une double inactivation des gènes *Akt1* et *Akt2* simultanément cause chez la souris une forte léthalité néonatale, probablement due à l'hypoxie causée par l'atrophie des muscles respiratoires. Une atrophie sévère des muscles squelettiques est visible, et d'autres problématiques comme des défauts dans le développement de la peau et des os, ainsi qu'une réduction de l'adipogenèse (Peng, 2003).

Le génotype *Akt1*<sup>-/-</sup> *Akt3*<sup>-/-</sup> chez la souris est cette fois-ci léthal au niveau embryonnaire.

Contrairement aux cas énoncés jusqu'à présent, la présence d'un seul allèle fonctionnel *Akt1* chez les souris, c'est-à-dire présentant un génotype *Akt1*<sup>+/-</sup> *Akt2*<sup>-/-</sup> *Akt3*<sup>-/-</sup>, est suffisant pour permettre la survie des souris malgré la réduction de leurs taille et poids, ainsi qu'une intolérance à l'insuline et au glucose (Dummler et al., 2006; Yang et al., 2005).

Ces résultats nous permettent de comprendre que malgré la forte proximité structurale et de séquence, les trois isoformes régulent des fonctions bien distinctes. Cette spécificité fonctionnelle dépend non seulement de leur distribution tissulaire et des stimuli extracellulaires spécifiques, mais aussi d'une activité catalytique intrinsèque à phosphoryler différents substrats, et du contexte cellulaire. En effet, en fonction de leur localisation intracellulaire, une isoforme aura accès à des substrats ou à des protéines adaptatrices spécifiques.

La spécificité des trois isoformes n'est pas simplement retrouvée au niveau physiologique mais aussi au niveau pathologique. En effet, en fonction de la mutation, un développement tumoral pourra apparaître dans un tissu bien déterminé. Cette partie sera traitée de façon plus détaillée dans la partie 5 de ce chapitre (Gonzalez and McGraw, 2009a).

### 3) La régulation de l'activité de la kinase AKT

La protéine AKT nécessite une régulation par phosphorylation afin de promouvoir la transduction du signal tout le long de la cascade de signalisation. Plusieurs événements sont nécessaires à l'activation de la voie de signalisation tels que la translocation membranaire de la protéine AKT et la phosphorylation des sites présents sur la protéine. Ainsi, cette dernière devient capable à son tour de phosphoryler des cibles spécifiques, dont BAD et d'autres encore. Selon l'isoforme considérée, les sites de phosphorylation sont différents mais proches les uns des autres. En effet, les sites de phosphorylation principalement retrouvés pour AKT1 sont la Thr308 dans le domaine kinase et la Ser473 dans le domaine de régulation C-terminal. Pour l'isoforme AKT2, ces sites correspondent à la Thr309 et la Ser474 et pour AKT3 à la Thr305 et la Ser472 (Song et al., 2005).

D'un côté, l'activation de la voie qui implique les facteurs de croissance ainsi que leurs récepteurs, est dépendante de l'activité de la PI3K avec comme conséquence le recrutement membranaire d'AKT et sa phosphorylation. De l'autre côté, l'activation peut être indépendante de la PI3K, avec l'intervention de protéines telles que Hsp27 dont nous parlerons dans un deuxième temps.

Les sites de phosphorylation évoqués jusqu'à présent ne sont pas les seuls sites qui peuvent être phosphorylés. D'autres résidus tels que les tyrosines peuvent jouer un rôle important dans la régulation d'AKT. Entre autres, des modifications post-traductionnelles telles que l'acétylation, la glycosylation ou l'oxydation ont une influence sur l'activité d'AKT (Risso et al., 2015; Song et al., 2005).

- Une régulation dépendante de la kinase PI3K

La régulation dépendante de la protéine PI3K est effectuée après l'activation de la voie de signalisation par un ligand ou un signal extracellulaire. La PI3K convertit le PIP2 en PIP3 sur lequel la protéine AKT pourra se fixer lors de son recrutement au niveau de la membrane plasmique. Le domaine PH d'AKT est responsable des interactions lipide-protéine. Néanmoins, le lipide PIP3 ne permet pas une activation directe d'AKT. Le mécanisme d'action de PIP3 passe par la modification de la conformation protéique d'AKT pour qu'elle soit accessible à la kinase PDK1 (*Figure 7*). Cette dernière peut phosphoryler la Thr308 de la protéine AKT qui représente un des sites importants dans l'activation d'AKT mais pas le seul. La kinase PDK1 est une sérine-thréonine kinase qui, grâce à la très haute affinité avec les phosphoinositides, permet d'être localisée à proximité d'AKT et de la phosphoryler (Biondi et al., 2000; Song et al., 2005).

La phosphorylation de la Thr308 permet une activation partielle de la protéine AKT1 et d'autres sites de phosphorylation sont utilisés pour obtenir une activité totale d'AKT (Alessi et al., 1996). L'activation complète d'AKT est effectuée après la phosphorylation de la Ser473. Ce site de phosphorylation est situé dans le domaine de régulation de la protéine AKT. Initialement, étant donné que ce site de

phosphorylation est dépendant de la kinase PI3K, la kinase PDK1 avait été proposée pour être responsable de cette phosphorylation sur la Serine 473. Contrairement aux théories avancées, l'invalidation du gène PDK1 dans des cellules ES a démontré que seul le site Thr308 était impacté et n'était donc plus phosphorylé par rapport aux cellules sauvages, mais que le site Ser473 restait intact (Williams et al., 2000). En revanche, la surexpression de PDK1 dans des cellules transfectées montre un état de phosphorylation plus important de la Ser473, indiquant que PDK1 pourrait influencer et contribuer de façon indirecte à la phosphorylation de cette sérine (Hill et al., 2001).

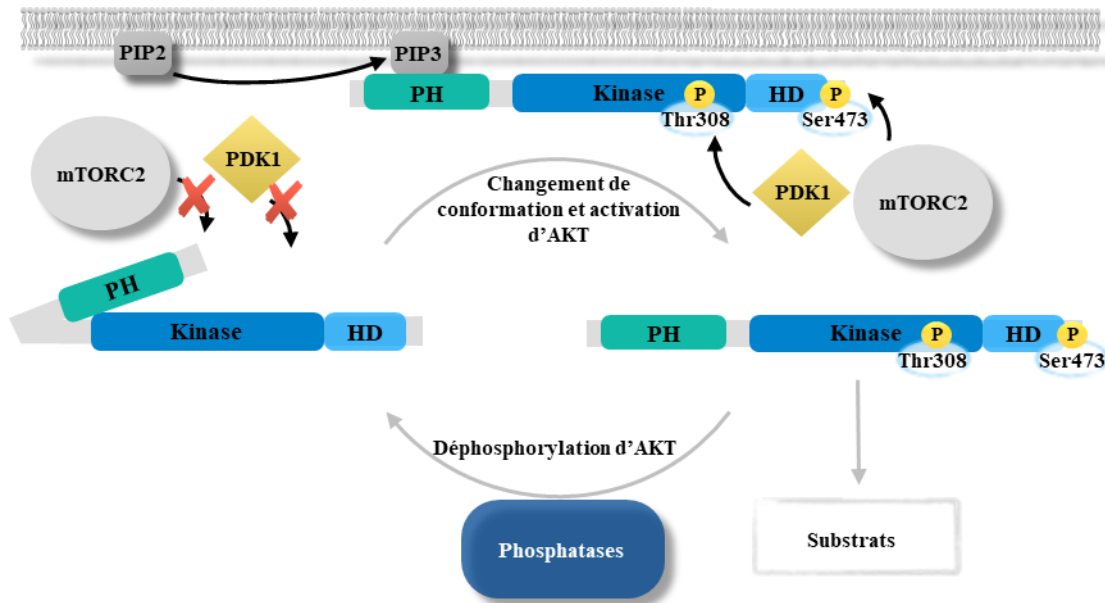


Figure 7: Translocation membranaire d'AKT. Le recrutement à la membrane d'AKT est fondamental pour le changement conformationnel de la protéine. En effet, grâce à l'interaction avec PIP3, ces domaines kinase et régulateur sont accessibles à la phosphorylation.

La kinase impliquée dans la phosphorylation de la Ser473 d'AKT1 est mTORC2, et permet la stabilisation de la conformation active d'AKT. Les deux sites Thr308 et Ser473 sont indispensables pour l'activité de AKT (Risso et al., 2015).

- Une régulation indépendante de la kinase PI3K

La régulation gouvernée par la kinase PI3K n'est pas la seule voie d'activation. En effet, la protéine AKT peut être activée de façon indépendante de la PI3K, notamment par l'activité de PKA. Il a été démontré que la présence d'agents *cAMP-elevating* tels que la prostaglandine-E1, la forskoline et la chlorophenylthio-cAMP, activent la kinase PKA. De plus, dans ce cas de figure, la protéine AKT est activée simplement après phosphorylation de la Thr308 qui est requise. La Ser473 n'est pas indispensable à l'activation de cette voie de signalisation (Filippa et al., 1999; Sable et al., 1997).

*In vitro*, la protéine AKT semble être activée de manière directe par la kinase Ca<sup>2+</sup>/calmoduline-dépendante. Entre autres, l'activation d'AKT peut se faire en réponse à un stress ou après l'association



avec des protéines ou molécules telles que Hsp27 et l'isoproterenol. Par exemple, certaines protéines faisant partie de la famille des Hsp (*heat shock protein*), comme Hsp27 et Hsp90, ont été étudiées pour leur capacité à interagir avec AKT1. Elles agissent en tant que chaperones afin de garantir une stabilisation structurale des protéines présentes après un stress extracellulaire. Par exemple, la protéine Hsp27 en interagissant avec AKT conduit à l'activation de cette dernière et l'inhibition de l'apoptose dans les neutrophiles (Konishi et al., 1997; Lanneau et al., 2008; Moule et al., 1997; Pérez-García et al., 2004; Wu et al., 2007) (Figure 8).

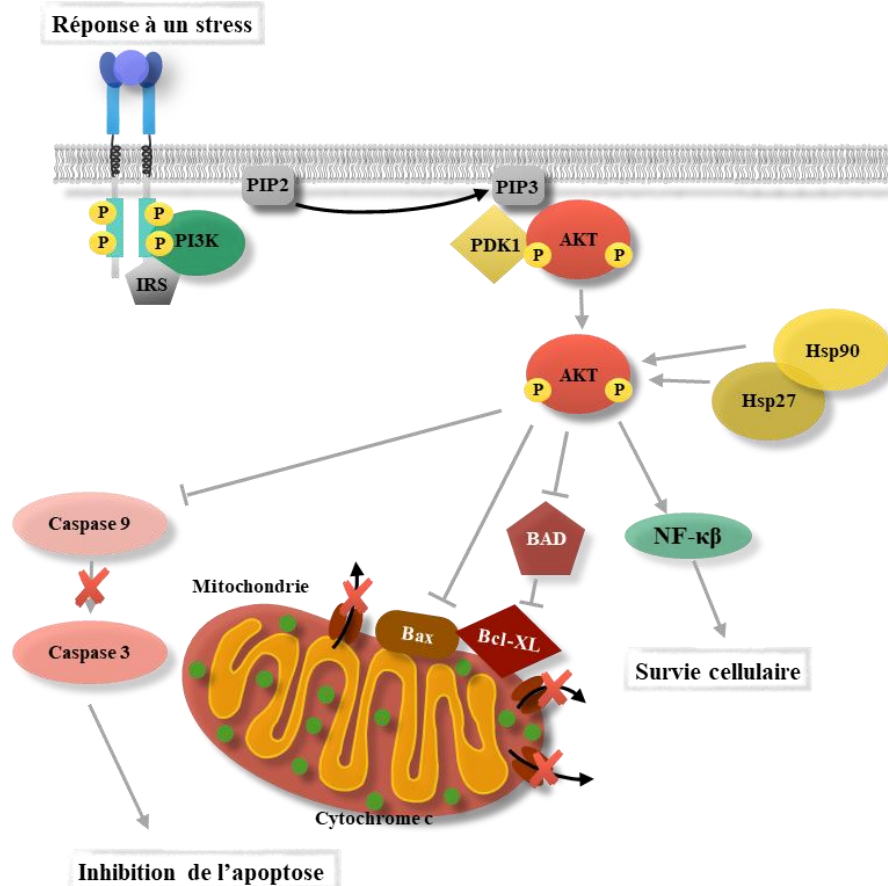


Figure 8 : La réponse à un stress et le rôle des protéines Hsp dans la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Les protéines Hsp telles que Hsp27 et Hsp90 ont la capacité à réguler AKT en réponse à un stress. Celle-ci active la survie cellulaire via le facteur de transcription NF-κβ et inhibe l'apoptose via la régulation de différentes protéines telles que BAD, Bax et la caspase 9.

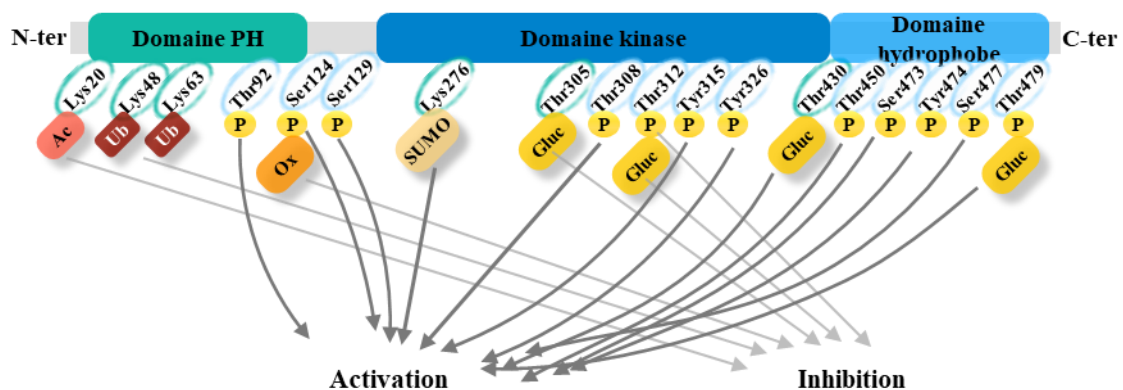
La protéine CTMP (*carboxyl-terminal modulator protein*) a été identifiée permettant la régulation d'AKT1. Ainsi, l'action de CTMP permet de réduire la phosphorylation de la Ser474 et bloque la voie de signalisation (Maira et al., 2012).

La régulation de la voie PI3K/AKT/mTOR nous donne ainsi une idée sur la complexité très élevée de chaque composant.

- L'implication d'autres sites de phosphorylation et de modifications post-traductionnelles d'AKT1

Les sites de phosphorylation Thr308 et Ser473 ne sont pas les seuls à pouvoir déterminer l'activation de la protéine AKT. En effet, au fil des années, d'autres sites mais aussi des événements post-traductionnels ont été identifiés ayant la capacité à réguler AKT. Parmi ces événements, l'acétylation, la glycosylation, l'oxydation, l'ubiquitination et la SUMOylation en font partie et sont capables de déterminer la spécificité de substrats d'AKT et leur localisation (Risso et al., 2015).

Parmi les sérines-thréonines phosphorylées, les sites Thr92, Ser124, Ser129, Thr312, Thr450, Ser477 et Thr479 sont concernés pour l'isoforme AKT1 et sont tout aussi importants pour la conformation de la protéine, pour sa stabilisation mais aussi pour son activité. Un exemple d'effet de la phosphorylation de ces sites est observé avec la Ser124. La mutation de ce site de phosphorylation entraîne un blocage du signal en réponse à des facteurs de croissance (Bellacosa et al., 1998; Risso et al., 2015). De même, la Ser129 est phosphorylée par la kinase CK2 et une diminution de son expression ou en présence de mutations du site de phosphorylation conduisent à une diminution de l'activité d'AKT (Di Maira et al., 2009). La phosphorylation de la Thr312 phosphorylée par la kinase GSK3 $\alpha$  (*glycogen synthase kinase 3 $\alpha$* ) a une action différente par rapport aux autres résidus phosphorylés. En effet, la phosphorylation de ce site ne conduit pas à une activation d'AKT mais plutôt à une inhibition de son activité. Plus précisément, du fait que le site se situe au niveau des sites d'ancrage pour les substrats d'AKT, si Thr312 est phosphorylée, une interférence entre AKT et les cibles va se créer (Gulen et al., 2012) (*Figure 9*).



*Figure 9* : Représentation des sites phosphorylés et des modifications post-traductionnelles d'AKT1.

La structure d'AKT1 est représentée avec les trois domaines fonctionnels : le domaine PH, le domaine kinase ou catalytique, et le domaine hydrophobe ou régulateur. Les sites de phosphorylation et les modifications post-traductionnelles telles que l'oxydation, l'acétylation, la SUMOylation, l'ubiquitination et la glycosylation sont indiqués.

D'autres sites de phosphorylation ont été découverts dans la régulation de la protéine AKT, notamment au niveau de résidus tyrosine. Parmi ces résidus, les Tyr315 et Tyr326 ont été identifiés dans le domaine

catalytique, et sont phosphorylés après l'activation des récepteurs (Chen et al., 2001). Une autre tyrosine est la Tyr474 qui est phosphorylée en réponse à l'insuline et au pervanadate, un inhibiteur de phosphatase. Il a été démontré qu'une mutation de la Tyr474 en Phe474 conduit non seulement à une diminution de la phosphorylation de la Thr308 mais aussi de la Ser473, indiquant un rôle de la Tyr474 dans la phosphorylation des deux sites principaux (Conus et al., 2002).

Des modifications post-traductionnelles existent, telles que l'acétylation, l'oxydation, la glycosylation, l'ubiquitination ou la SUMOylation, et permettent aussi la régulation d'AKT (Risso et al., 2015).

L'acétylation est une modification post-traductionnelle qui consiste en l'ajout d'un groupe fonctionnel acétyle par exemple sur des résidus de lysine, afin de neutraliser les charges positives et permettre une modification de la conformation protéique et des interactions protéiques. Les enzymes HAT (*histone acetyltransferase*) et HDAC (*histone deacetylase*) régulent cette modification. Il est connu que la protéine SIRT1 permet de réguler la protéine AKT par la Lys20, et en particulier elle est requise pour le lien entre la protéine AKT et les PIP3. L'activité désacétylase de la protéine SIRT1 permet de modifier la conformation d'AKT afin de pouvoir être phosphorylée par PDK1 (Choudhary et al., 2009; Sundaresan et al., 2011).

Les événements d'oxydation influencent majoritairement l'isoforme AKT2 par rapport aux deux autres isoformes d'AKT. En effet, l'oxydation des résidus de cystéine permet la régulation de la structure de la protéine et de sa fonction. Par exemple, l'activation de la voie de signalisation par PDGF conduit à la production de ROS qui entraîne l'oxydation de la Cys124 et une inhibition de l'activité kinase d'AKT2. La Cys124 se situe dans la région linker de la protéine AKT2 empêchant cette dernière d'exercer sa fonction correctement lorsqu'elle est oxydée (Chung et al., 2013; Wani et al., 2011) (*Figure 9*).

La glycosylation est un événement enzymatique conduisant au lien d'un glucide O-GlcNAc ( $\beta$ -D-N-acetylglucosamine) au niveau d'une sérine ou d'une thréonine, effectuée par l'enzyme OGT (*O-GlcNAc transferase* ou *UDP-N-acetylglucosamine :peptide  $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransferase*). Cette modification des protéines AKT1 et AKT2 a été étudiée pendant des années. Selon le résidu considéré, il peut y avoir un effet d'activation ou d'inhibition sur la protéine AKT. Par exemple, la glycosylation des Thr305 et Thr312 a un effet inhibiteur sur AKT. Au contraire, la glycosylation des Thr430 et Thr479 a une action activatrice (Gandy et al., 2006; Park et al., 2005; Risso et al., 2015).

Un autre événement régulateur est l'ubiquitination, constituée de trois étapes, avec l'activation, la conjugaison et la ligation, effectuées par des enzymes *Ub-activating enzymes* E1, *Ub-conjugating enzymes* E2 et *Ub ligases* E3s. L'ubiquitination consiste en une réaction covalente qui permet le lien de l'ubiquitine sur des résidus de lysine protéiques. De plus, cette modification est réversible à l'aide d'enzymes de déubiquitination DUBs, dans le cas où des chaînes de polyubiquitine doivent être supprimées. L'ubiquitination est généralement connue comme un processus conduisant à une dégradation des protéines par le protéasome. Dans certains cas, ce phénomène peut avoir des effets non-

dégradatifs, c'est-à-dire permettre une correcte activation de la protéine AKT. Par exemple, l'ubiquitination de la Lys48 d'AKT entraîne une dégradation de celle-ci, alors que l'ubiquitination de la Lys63 est augmentée en réponse à différents stimuli activant la voie PI3K tels que la réponse aux cytokines ou à des facteurs de croissance (Finley, 2009; Risso et al., 2015).

La dernière modification rencontrée est la SUMOylation qui est similaire biochimiquement au processus d'ubiquitination. En effet, la SUMOylation aboutit à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice de la protéine en question. Dans ce cas aussi, trois étapes enzymatiques sont nécessaires, dont la première voit la maturation ou le clivage de la protéine SUMO en C-terminal par des enzymes E1. Puis suit une phase d'activation qui permet la création de lien thioester entre SUMO et la cystéine de l'enzyme E1. Enfin la conjugaison de SUMO avec la protéine en question termine le processus. Un exemple des sites impliqués dans la SUMOylation est la Lys276 qui active la protéine AKT. En effet, dans certains cancers où est présente la mutation E17K d'AKT1, on retrouve des niveaux très élevés de SUMOylation, qui conduisent à une forme hyperactivée de la protéine AKT1 et par conséquent à l'apparition de cancers comme celui des ovaires (Li et al., 2013; Risso et al., 2015) (*Figure 9*).

La compréhension de ces modifications de la protéine AKT ouvre des possibles portes vers de nouvelles stratégies thérapeutiques.

- Les phosphatases et le contrôle négatif

Différentes phosphatases ont été identifiées pour avoir une action directe ou indirecte sur la protéine AKT. Les deux phosphatases PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*) et SHIP ou SH2 (*Src homology 2)-domain-containing inositol phosphatase*, agissent de manière indirecte sur la régulation d'AKT. Elles permettent la conversion du phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) en phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate pour PTEN et phosphatidylinositol (3,4)-biphosphate pour SHIP. Elles interviennent ainsi au niveau lipidique et ne touchent en aucun cas les sites phosphorylés d'AKT (Mondal et al., 2012).

Les phosphatases qui agissent directement sur AKT sont les phosphatases PP2A (*protein phosphatase 2A*) et les PHLPPs (*PH-domain leucin-rich repeat protein phosphatases*) qui déphosphorylent les sites de phosphorylation Thr308 et Ser473. En effet, la phosphatase PP2A déphosphoryle de façon préférentielle la Thr308 alors que les PHLPPs ne ciblent que la Ser473 (Brognard et al., 2007) (*Figure 10*).

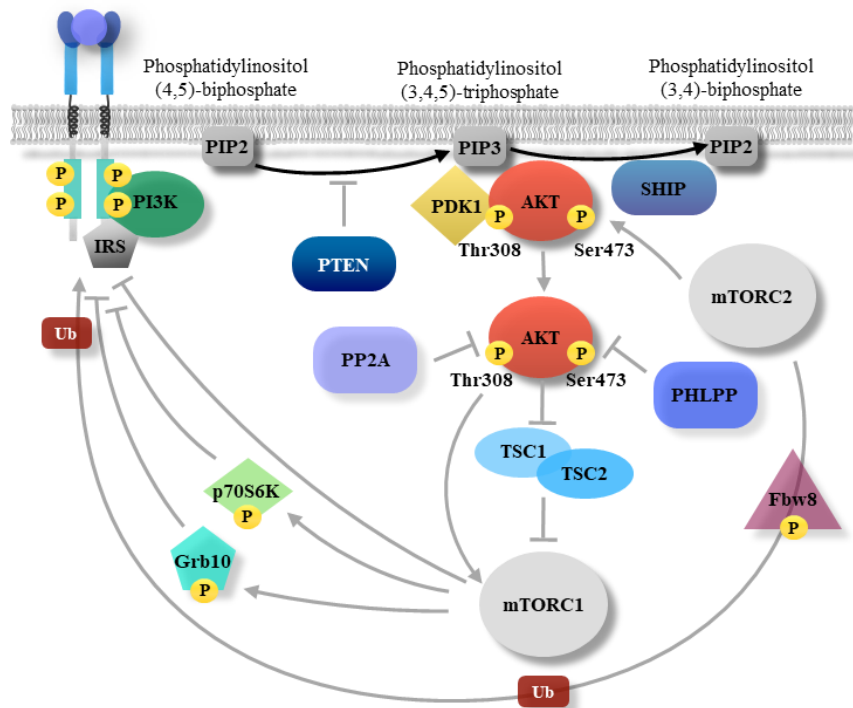


Figure 10 : Les boucles de rétrocontrôle de la voie de signalisation PI3K. Les phosphatases directes et indirectes d'AKT1 sont représentées. Les protéines PTEN et SHIP ont une action sur les lipides de membrane alors que les protéines PP2A et PHLPP agissent directement sur les sites de phosphorylation d'AKT1.

Les phosphatases permettent une régulation inhibitrice des protéines activées mais il existe néanmoins des boucles de rétrocontrôle limitant l'activation de la voie de signalisation. C'est le cas de mTORC1 qui, lorsque le signal doit être arrêté, phosphoryle de façon directe la protéine IRS1 ou bien de manière indirecte les protéines p70S6K ou Grb10 afin d'induire une dégradation d'IRS1. La protéine IRS1 peut être aussi régulée de façon négative par le complexe mTORC2 via la phosphorylation de l'ubiquitine ligase Fbw8 (*F-box and WD Repeat Domain Containing 8*) qui va favoriser la dégradation de la protéine IRS1. Montero et ses collègues ont démontré l'existence de cette boucle rétroactive effectuée par mTORC1 et mTORC2. En effet, il a été démontré que la déplétion de Raptor dans le complexe mTORC1 conduit à une augmentation de la phosphorylation d'AKT1 au niveau de la Ser473 (phosphorylée par mTORC2), prouvant le rôle de régulateur de mTORC1 (DeStefano and Jacinto, 2013; Laplante and Sabatini, 2012; Montero et al., 2012).

- Le rôle des cibles de la protéine AKT

Les cibles de la protéine AKT ainsi que les effets de son activation sont détaillés dans la partie 4 de ce chapitre.

Aujourd'hui, environ 150 protéines représentent les substrats d'AKT et sont impliquées dans de nombreux événements cellulaires tels que le métabolisme, la régulation du cycle cellulaire, la transcription, la prolifération, l'apoptose et l'angiogenèse (Manning and Toker, 2017).

La séquence consensus reconnue par la protéine AKT possède le motif R-X-R-X-X-S/T. Des substrats ont été validés *in vitro* par des essais kinases, tels que FOXO1A, GSK-3 $\beta$ , WNK1 et d'autres encore. Néanmoins, certaines protéines ne possédant pas cette séquence consensus peuvent représenter une cible de la protéine AKT. Aujourd'hui, il n'y a pas encore d'explication à cela, si la conformation tertiaire des protéines peut influencer l'interaction entre AKT et celles-ci ou s'il y a une autre raison (Hornbeck et al., 2004; Obata et al., 2000; Rena et al., 1999; Vitari et al., 2004).

La phosphorylation de la cible par AKT peut avoir des effets inhibiteurs, activateurs ou bien peut dans certains cas permettre une rétention cytoplasmique des protéines. Un exemple de substrat d'AKT est la protéine BAD, qui est phosphorylée au niveau de la Ser136 en entraînant l'inhibition de son activité. La protéine BAD phosphorylée est incapable d'interagir avec Bcl-XL, conduisant à une inhibition de l'apoptose et à la promotion de la survie cellulaire (Datta et al., 1997) (Figure 11).

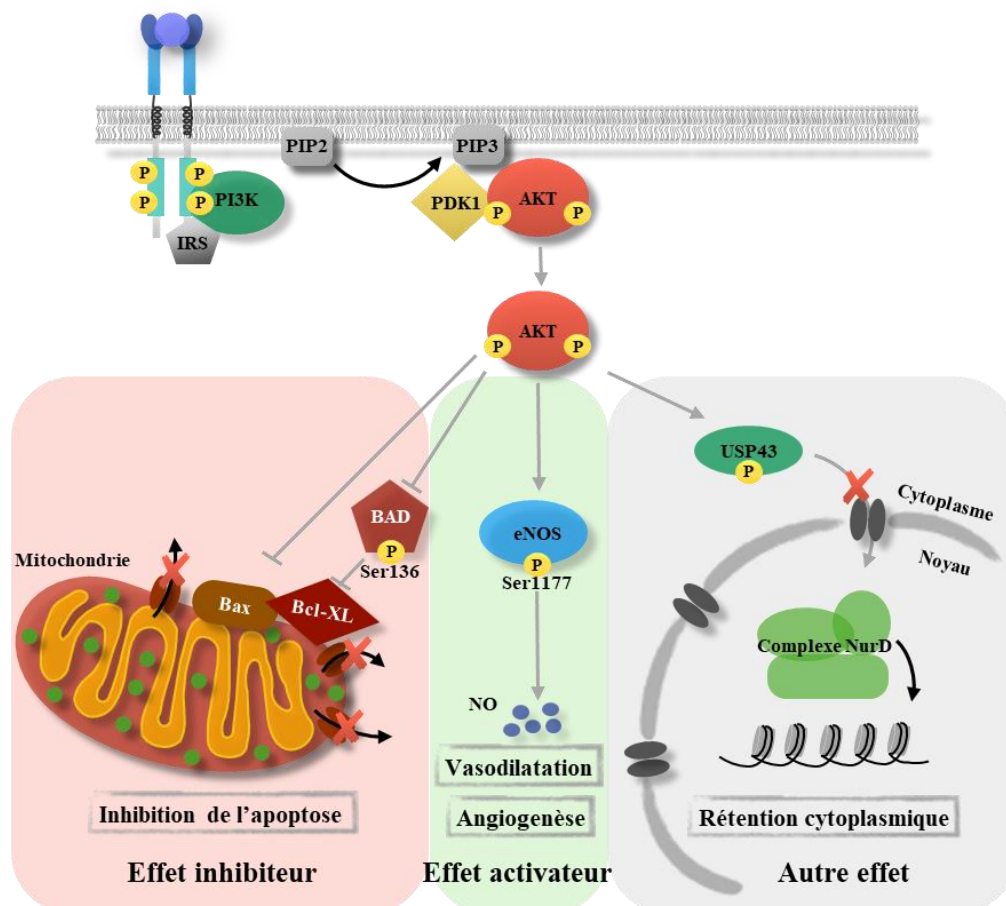


Figure 11 : Les différents effets que peut avoir l'activation de la protéine AKT. La phosphorylation d'AKT peut conduire à la régulation de protéines distinctes, avec une finalité différente. Le signal transmis par AKT peut avoir un effet inhibiteur avec l'inhibition de protéines pro-apoptotiques, un

effet activateur avec la stimulation de protéines telles que eNOS, ou bien d'autres effets comme la rétention cytoplasmique dans le cas d'USP43.

En revanche, la phosphorylation de la Ser1177 de eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) par AKT a pour conséquence d'activer l'enzyme avec la production d'oxyde nitrique (NO). Le NO permet la stimulation de la vasodilatation mais aussi l'angiogénèse (Liang et al., 2021).

Un dernier exemple de l'effet causé par la phosphorylation par AKT est observé avec la protéine USP43 (*ubiquitin-specific protease*) impliquée dans le remodelage de la chromatine avec le complexe NuRD, qui se situe dans le noyau. Le complexe USP43/NuRD a la capacité de réprimer une série de gènes tels que EGFR et il a été démontré que le complexe permet d'inhiber la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* mais aussi de supprimer la croissance et les métastases dans le cancer du sein *in vivo*. La protéine USP43 est une protéine fondamentale contre la carcinogénèse et catalyse la débubiquitination de H2BK120. La phosphorylation de USP43 par AKT cause une rétention protéique au niveau du cytoplasme. De plus, il a été démontré qu'une quantité très faible de USP43 dans le noyau est corrélée avec un haut degré histologique du cancer et un faible pronostic (He et al., 2018).

#### **4) Les différents rôles physiologiques de la protéine AKT**

Faisant partie de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR, la protéine AKT a la capacité de réguler différents processus biologiques. Certains rôles de la kinase AKT ont été élucidés en invalidant ou bien en surexprimant les isoformes de cette protéine.

Parmi ces rôles, nous retrouvons une implication d'AKT dans la survie cellulaire ainsi que dans l'apoptose, dans la prolifération, la croissance et la progression du cycle cellulaire, dans la synthèse protéique, mais aussi dans d'autres processus plus spécifiques, notamment le métabolisme énergétique, le développement neuronal, la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire et la migration (Gonzalez and McGraw, 2009b; Toker and Marmiroli, 2014).

Vu l'importance de la protéine AKT dans la voie de signalisation dont elle fait partie mais aussi dans d'autres voies de signalisation qui sont interconnectées à celle-ci comme des croisements, aujourd'hui plus d'une centaine de substrats potentiels d'AKT a été proposée. La conséquence des interactions avec les substrats est le déclenchement de signaux fondamentaux pour le bon fonctionnement cellulaire. Une partie des fonctions de la protéine AKT va être décrite ci-dessous.

- Rôle dans la prolifération, la croissance et le cycle cellulaire

Il est bien établi aujourd'hui qu'une des fonctions de la protéine AKT est de réguler positivement la prolifération cellulaire. Ces effets pro-prolifératifs sont en partie dus à une modulation directe de protéines impliquées dans le cycle cellulaire.

En effet, AKT favorise la prolifération par régulation négative de deux protéines spécifiques, la protéine p21<sup>Cip1/WAF1</sup> et p27<sup>Kip1</sup>, mais aussi par régulation positive de la cycline D1. Lorsque les protéines p21<sup>Cip1/WAF1</sup> et p27<sup>Kip1</sup> sont phosphorylées par AKT, Zhou et ses collègues mais aussi d'autres équipes ont montré que cette phosphorylation induit l'export du noyau vers le cytoplasme de ces dernières, c'est-à-dire p21<sup>Cip1/WAF1</sup> et p27<sup>Kip1</sup> (Zhou et al., 2001). Cette délocalisation entraîne d'une part l'inhibition des interactions entre p21<sup>Cip1/WAF1</sup> et l'antigène nucléaire des cellules en prolifération PCNA, et d'autre part l'inhibition des interactions avec le complexe Cycline/CDK4 (*cycline dependant kinase*). Ce complexe est normalement inhibé par p21<sup>Cip1/WAF1</sup> et p27<sup>Kip1</sup>, mais la relocalisation cytoplasmique entraîne ainsi la progression du cycle cellulaire (Héron-Milhavet et al., 2006; Liang et al., 2002; Shin et al., 2002).

D'autres cibles de la protéine AKT intervenant dans la progression cellulaire ont été identifiées, notamment la protéine GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) et le facteur de transcription FoxO (*forkhead box*) (Rössig et al., 2002; Schmidt et al., 2002). Phosphorylée par AKT sur la sérine 9, la protéine GSK3 devient inactive et permet la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S. Entre autres, cette phosphorylation empêche la dégradation de la cycline D1 (Welcker et al., 2003).

Une autre voie de régulation du cycle cellulaire et celle via la protéine mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), activée après phosphorylation des protéines TSC2 et PRAS40 par AKT. La phosphorylation des sites S939 et Thr1462 de la protéine TSC2 et du site Thr246 de la protéine PRAS40 par AKT entraîne une inhibition de leur activité, permettant ainsi le déclenchement de la cascade phosphorylative de mTORC1. La protéine mTORC1 peut être régulée soit de façon directe soit de façon indirecte via les protéines TSC1 et TSC2 (Inoki et al., 2002; Tee et al., 2003; Wiza et al., 2012).

Des sites consensus ont été identifiés dans la protéine Skp2, révélant ainsi que la protéine AKT est capable de phosphoryler cette dernière. Cette protéine est impliquée elle aussi, dans la régulation du cycle cellulaire (Gao et al., 2009).

- Rôle dans la survie cellulaire et dans l'apoptose

La protéine AKT est aussi un acteur de la survie cellulaire et de l'apoptose. En effet, il a été démontré qu'une fonction d'AKT est d'activer des facteurs de croissance induisant la survie cellulaire, et au contraire d'inhiber les facteurs impliqués dans l'apoptose.



Pour cela, trois grandes voies peuvent être différenciées afin de permettre la régulation de ces évènements. La protéine AKT peut intervenir de façon directe sur la régulation de l'apoptose, peut phosphoryler des facteurs permettant des réponses transcriptionnelles aux stimuli apoptotiques, ou bien peut réguler l'apoptose par voie métabolique (Song et al., 2005).

La régulation directe vise certains facteurs dont la protéine Bad (*BCL2 associated death promoter*), une protéine pro-apoptotique agissant sur la libération mitochondriale du cytochrome c. En effet, AKT phosphoryle la sérine 136 de Bad, en inhibant de cette façon son activité et permettant à celle-ci de se détacher du complexe Bcl-2–Bcl-xL au niveau de la membrane mitochondriale. Bad inhibe normalement les protéines Bcl-2 et Bcl-xL, facteurs anti-apoptotiques, mais la phosphorylation par AKT inhibe son activité et va interagir avec la protéine 14-3-3 afin de former un nouveau complexe. Les protéines Bcl-2 et Bcl-xL pourront donc jouer leur rôle anti-apoptotique. La localisation du complexe Bad/14-3-3 dans le cytosol va induire un état d'inactivité des deux protéines, et ainsi inhiber l'apoptose. De plus, la protéine AKT semblerait interagir aussi directement avec les protéines pro-apoptotiques, notamment Bax et Bim. Suite à leur phosphorylation par AKT, ces deux protéines deviennent inactives (Datta et al., 1999, 1997; Peso, 1997).

D'autres protéines régulant l'apoptose ont été identifiées pour leur interaction directe avec la kinase AKT. Une de celles-ci est la Caspase-9 qui est inhibée après la phosphorylation de la sérine 196 par AKT, bloquant ainsi toute la cascade de clivage des caspases suivantes (Fujita et al., 1999).

Concernant la régulation transcriptionnelle, il a été démontré qu'AKT est capable de phosphoryler certaines protéines de la famille des FoxO *Forkhead*, comme FoxO1 (*forkhead box O1*), FoxO2, FoxO3 et FoxO4. La phosphorylation de ces protéines permet la régulation négative de celles-ci, entraînant l'activation de la transcription de certains gènes pro-survie (Zhang et al., 2011). Ayant la même finalité, la régulation directe et indirecte de la protéine IKK (*IκB kinase*) active la voie NF-κB, en permettant la translocation de celle-ci dans le noyau afin de transcrire les gènes nécessaires à la survie cellulaire (Kane et al., 1999).

Si les voies énoncées jusqu'à présent montrent une inhibition d'une activité protéique suite à une phosphorylation par AKT, cette dernière peut à l'inverse, activer d'autres protéines spécifiques en les phosphorylant. En effet, les protéines YAP (*Yes-associated protein*) et l'ubiquitine ligase Mdm2 (*murine double minute 2*) sont activées après phosphorylation par AKT. L'activation de Mdm2 entraîne une translocation de la protéine dans le noyau, où elle permettra la dégradation de p53, inducteur de l'apoptose, par le protéasome (Basu et al., 2003; Ogawara et al., 2002).

Une dernière possibilité peut être de réguler l'apoptose via les voies métaboliques. Il a été démontré qu'une inhibition de la protéine GSK3 pourrait protéger de l'apoptose dans différentes circonstances. Lorsqu'un haut niveau d'insuline est présent par exemple, la protéine AKT phosphoryle GSK3 en

induisant le stockage du glucose sous forme de glycogène, et en inhibant le signal pro-apoptotique (Doble, 2003; Pap and Cooper, 1998).

- Rôle dans la migration et influence sur le cytosquelette

Lors de la migration cellulaire, différents processus sont nécessaires pour la motilité, notamment l'initiation et la polarisation, la formation de protrusions de la membrane apicale, la rétraction de la membrane basale, la contraction du corps cellulaire et la formation de nouvelles adhésions entre la cellule et l'environnement.

De façon physiologique mais aussi pathologique dans certaines situations, il a été démontré que la protéine AKT peut moduler la conformation ainsi que la dynamique du cytosquelette, en déclenchant ainsi la motilité cellulaire. Cette capacité migratoire des cellules varie en fonction du type cellulaire mais est aussi isoforme-spécifique. En effet, les isoformes AKT1 et AKT2 agissent différemment dans la motilité cellulaire (Xue and Hemmings, 2013).

Dès les premières étapes embryonnaires, la protéine AKT semblerait avoir un effet sur la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), essentielle pour la formation des organes et des tissus. En effet, il a été démontré qu'une dérégulation de la voie PI3K/AKT/mTOR, et plus précisément une surexpression de la protéine AKT, induit une gastrulation anormale. La motilité dans la gastrula embryonnaire est nécessaire au bon développement de l'embryon (Montero et al., 2003). Un des substrats identifiés pour interagir avec AKT est par exemple la protéine Twist, un régulateur majeur de la TEM qui est activé après phosphorylation conduisant à une augmentation de la motilité cellulaire (Chen and Behringer, 1995). Entre autres, la TEM n'est pas uniquement un évènement retrouvé lors du développement embryonnaire mais est présent aussi, au cours de processus de cicatrisation, de fibrose et de développement tumoral (Dudás et al., 2020).

Les circonstances permettant la migration cellulaire sont d'une part la régulation de la polarité des cellules. La première évidence de l'implication de la protéine AKT contrôlant la polarité cellulaire a été décrite dans le *Dictyostelium*, où AKT phosphoryle la protéine PAKa, protéine régulatrice de la migration cellulaire (Chung et al., 2001). Chez les mammifères, les mêmes observations ont été faites puisque la protéine PAK1 est phosphorylée par AKT.

Un autre évènement augmentant les capacités migratoires des cellules est la réorganisation du cytosquelette. Le cytosquelette est composé de filaments souples d'actine polymérisée, de petits filaments intermédiaires composés de vimentine et de microtubules rigides formés de tubuline. L'actine ainsi que la vimentine ont été identifiées comme cibles de la protéine AKT. En effet, après avoir montré une co-localisation des protéines AKT et actine au niveau membranaire de cellules ayant une forte motilité, il a été démontré qu'un lien était présent entre les deux protéines. AKT est capable de réguler

de façon directe ou indirecte la polymérisation de l'actine. En effet, dans les cellules endothéliales vasculaires après stimulation par VEGF, la protéine AKT permet la polymérisation de l'actine et par conséquent la formation de faisceaux d'actine. Cela a été confirmé après inhibition de l'activité kinase d'AKT, où l'absence de faisceaux d'actine conduit à un blocage de la locomotion cellulaire (Cenni et al., 2003; Qian et al., 2004).

La phosphorylation de la protéine palladine par AKT entraîne une inhibition de son activité. Toker et ses collègues ont démontré que l'isoforme AKT1 est capable de phosphoryler la sérine 507 de la palladine entraînant la perturbation et la désorganisation des faisceaux de F-actine et comme conséquence la suppression du mouvement cellulaire (Chin and Toker, 2010a). Au contraire, indépendamment de la phosphorylation d'AKT1 sur la palladine, l'isoforme AKT2 permet la stabilisation de la palladine et un effet opposé, donc une motilité cellulaire (Chin and Toker, 2010b).

La migration induite par réorganisation du cytosquelette est aussi promue après activation de certaines voies de signalisation dans lesquelles AKT intervient. Notamment, la voie de signalisation VEGFR/eNOS semblerait être contrôlée par la kinase AKT. Il a été démontré que la sérine 1177 de eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) est phosphorylée par AKT permettant la production d'oxyde nitrique (NO), nécessaire à la migration des cellules endothéliales et à l'angiogenèse (Dimmeler et al., 2000, 1999).

- Rôle dans le métabolisme énergétique cellulaire

La protéine AKT2 est l'isoforme impliquée principalement dans le métabolisme énergétique, et intervient plus précisément sur le métabolisme du glucose mais aussi lipidique.

Après le signal déclenché par l'insuline, les protéines AS160 (*AKT substrate of 160 kDa*) et TBCD1 (*TBC 1 domain 1*) sont phosphorylées par AKT2 favorisant l'activité GTPase d'une famille de petites protéines G impliquées dans le trafic vésiculaire. Cette phosphorylation permet de manière plus spécifique la translocation du transporteur de glucose GLUT4 vers la membrane plasmique dans les cellules musculaires et adipeuses augmentant ainsi l'absorption de glucose dans les cellules nécessitant un apport énergétique (Sakamoto and Holman, 2008). Le transporteur GLUT1 est lui aussi régulé de façon indirecte par la protéine AKT, permettant l'augmentation transcriptionnelle de transporteurs de glucose (Taha et al., 1999; Wieman et al., 2007).

La protéine AKT ne régule pas uniquement le transport du glucose mais aussi son utilisation et son stockage. D'une part, la glycolyse est régulée par AKT avec la phosphorylation de deux protéines en particulier, c'est-à-dire les protéines FoxO et PGC1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- $\alpha$* ), mais aussi de façon indirecte avec le facteur HIF1 $\alpha$  (Robey and Hay, 2009). De plus, la protéine AKT active par phosphorylation des protéines appelées hexokinases, et plus

précisément l'hexokinase II, permettant la translocation de l'enzyme dans les mitochondries en favorisant ainsi la conversion du glucose en glucose-6-phosphate (Roberts et al., 2013).

Au contraire, pour le stockage, AKT permet de favoriser la synthèse de glycogène induite par l'insuline en raison de la phosphorylation de GSK3 qui est inhibée. La phosphorylation en question entraîne la suppression de la glycogénolyse avec la promotion de la synthèse de glycogène (Fang et al., 2000).

- Rôle dans la synthèse protéique

Un autre rôle de la protéine AKT a été identifié dans la synthèse de protéines.

En effet, une cible d'AKT est la protéine TSC2 (*tuberous sclerosis complex 2*) qui est phosphorylée au niveau de la sérine 939 et de la thréonine 1462 après le déclenchement de la voie de signalisation par l'insuline. La protéine TSC2 phosphorylée va devenir inactive et la voie de signalisation mTORC1 pourra continuer sa cascade de phosphorylation, avec à la fois la phosphorylation de la protéine 4E-BP1 (*eIF4E binding protein 1*) et l'activation de RPS6KB1 (Dennis et al., 2012; Manning and Cantley, 2007).

La phosphorylation de la protéine PRAS40 par AKT aura le même effet que TSC2 sur la synthèse protéique. Néanmoins, la protéine AKT peut aussi phosphoryler directement la protéine mTORC1.

- Autres rôles et interconnexion avec les voies de signalisation

Faisant partie de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui concentre différentes voies de signalisation, la protéine AKT influe sur un nombre de fonctions considérables.

En effet, comme déjà énoncé lors de l'explication de son rôle dans la migration cellulaire, AKT est capable de phosphoryler la protéine eNOS lors de la signalisation par VEGF dans les cellules endothéliales. A partir de cette phosphorylation par AKT de eNOS, la production d'oxyde nitrique NO sera induite. Il a été démontré qu'une inhibition de la voie de signalisation PI3K ou la mutation d'un site de phosphorylation de eNOS par AKT, comme par exemple la sérine 1177, prévenait l'activation de l'enzyme synthase. De plus, la phosphorylation de eNOS par AKT représente un mécanisme régulateur Ca<sup>2+</sup>-indépendant pour la production de NO. L'oxyde nitrique est fondamental pour l'homéostasie cardiovasculaire puisqu'il permet la régulation de la pression artérielle systémique, la création de la vascularisation lors du développement embryonnaire, l'angiogenèse mais aussi l'agrégation des plaquettes (Michell et al., 1999; L. Zhang et al., 2018).

Une des voies de signalisation qui croise la voie PI3K/AKT est la voie NF-κB. Les conséquences de l'activation de la voie de signalisation NF-κB dépendent du contexte de l'activation mais aussi du type

cellulaire en question. La protéine AKT régule positivement l'activité de la protéine CREB1 (*cyclic AMP (cAMP)-response element binding protein*) sur ses cibles Tpl2 et IKK $\alpha$  (Perkins, 2007).

Une autre interconnexion importante est visible entre les voies de signalisation PI3K/AKT/mTOR et MAPK/ERK, surtout dans des conditions pathologiques. En effet, les différentes kinases impliquées dans les deux voies présentent certains substrats en commun, notamment c-Raf qui est phosphorylé par AKT sur le site sérine 259 empêchant ainsi son recrutement à la membrane et la signalisation en aval. Dans ce cas, la protéine c-Raf inhibée par AKT, va avoir un effet négatif sur la voie de signalisation MAPK/ERK. Par le biais d'interactions indirectes, la voie PI3K/AKT peut aussi réguler positivement la voie ERK (Migliaccio et al., 2013; Moelling et al., 2002).

## **5) Les pathologies associées à une dérégulation de la voie PI3K/AKT/mTOR et les stratégies thérapeutiques envisagées**

- Les différentes pathologies liées à cette voie de signalisation

La dérégulation d'un seul composant de la voie PI3K/AKT/mTOR peut entraîner des conséquences désastreuses telles que l'apparition de pathologies comme le cancer, le diabète, des pathologies cardiaques ou neurologiques (Cohen, 2013).

Selon la maladie en question, une isoforme d'AKT pourra être préférentiellement altérée mais il n'est pas exclu de retrouver une altération d'AKT1 par exemple dans des désordres neurologiques bien que ce soit principalement AKT3 qui est exprimée dans le système nerveux central.

Le rôle d'AKT1 dans le développement cardiaque et dans l'apparition de pathologies est aujourd'hui très bien documenté. Physiologiquement, AKT1 est une protéine cardioprotectrice puisqu'elle assure la croissance, la taille et la fonction contractile des cardiomyocytes. Des altérations de la phosphorylation ont été retrouvées dans l'athérosclérose où le LDL oxydé semble réduire la phosphorylation de AKT, avec comme conséquence l'inhibition de la migration des cellules endothéliales. En effet, AKT joue un rôle dans l'activation de l'apoptose au niveau du muscle lisse après activation du récepteur IGFR à insuline. L'hypertrophie cardiaque rencontre aussi une surexpression de la protéine AKT avec comme conséquence une taille excessive des cellules du cœur qui possèdent une contractilité trop importante (Aoyagi and Matsui, 2011; Fernández-Hernando et al., 2007).

Des altérations dans la régulation d'AKT2 sont la cause de pathologies métaboliques telles que le diabète. En effet, il a été démontré par Hussain et ses collègues qu'une mutation d'AKT2, et plus précisément la mutation c49G>A, p.Glu17Lys était la cause de hyperinsulinémie, d'hypoglycémie

sévère infantile, d'augmentation du poids chez les nouveaux nés, montrant le lien directe entre la protéine AKT2 et la régulation par l'insuline (Cohen, 2013; Hussain et al., 2011).

En revanche, la perte fonctionnelle de l'isoforme AKT3 est la cause de nombreuses pathologies neurologiques telles que la microcéphalie, les syndromes de mégalencéphalie ou la hémimégalencéphalie. Un exemple de mutations retrouvées dans l'isoforme AKT3 causant l'apparition de syndromes mégalencéphaliques sont les mutations c.1393C>T,p.Arg465Trp et c.686A>G,p.Asn229Ser. Il existe néanmoins des altérations qui impliquent d'autres isoformes, telles que pour la schizophrénie où le niveau de AKT1 est réduit (Cohen, 2013; Emamian et al., 2004; Mirzaa et al., 2012; Rivière et al., 2012).

Les mutations de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR représentent une partie non négligeable des tumeurs avec des phénomènes d'amplification, de surexpression, de mutation ou d'altération dans la régulation de composants de la voie de signalisation. D'un côté, des mutations génétiques peuvent causer la perte de fonction d'un gène, notamment PTEN qui est un gène suppresseur de tumeurs et qui est muté dans de nombreux cancers. Puis d'autres altérations peuvent apparaître telles que des amplifications génétiques et des surexpressions de protéines, notamment pour AKT1 avec la mutation E17K (Khan et al., 2013; Revathidevi and Munirajan, 2019).

Si l'on se concentre uniquement sur les altérations rencontrées pour AKT, il est possible de voir que la protéine AKT joue un rôle dans le développement tumoral. En effet, elle représente un oncogène qui est souvent retrouvé surexprimé dans les cancers. De plus, les aberrations d'AKT lui confèrent une résistance aux chimiothérapies ou aux thérapies conventionnelles selon les cancers. C'est le cas de surexpressions ou d'amplifications d'AKT1 ou d'AKT2, souvent associées à une résistance des cellules cancéreuses de l'ovaire au paclitaxel (Kim et al., 2007; Revathidevi and Munirajan, 2019).

Les amplifications et les surexpressions des gènes AKT représentent le pourcentage le plus élevé d'altérations causant le développement de cancers. L'isoforme AKT1 est celle qui voit une amplification majeure dans des cancers tels que les cancers gastriques, des ovaires et mammaires (40%), du colon, de l'œsophage, du pancréas, de la prostate (50%), le glioblastome mais aussi de la thyroïde (Altomare and Testa, 2005; Knobbe and Reifemberger, 2006; Revathidevi and Munirajan, 2019).

Les amplifications de AKT2 sont rencontrées avec une fréquence plus élevée par rapport aux amplifications de AKT1, dans les cancers des ovaires, mammaire et du pancréas (10%). En revanche, les surexpressions de AKT2 sont retrouvées dans 40% des carcinomes hépatocellulaires et 57% des cancers colorectaux. Les surexpressions de AKT3 sont elles aussi retrouvées dans les cancers mammaires et de la prostate (Cheng et al., 1996; Hers et al., 2011; Revathidevi and Munirajan, 2019; Roy, 2002; Xu et al., 2004).

Les mutations d'AKT1 ne sont pas fréquentes (1,78% parmi tous les cancers) par rapport aux amplifications qui représentent l'anomalie d'AKT1 la plus fréquemment retrouvée dans les cancers. Les mutations concernant le domaine PH de AKT conduisent généralement à une stabilisation de l'interaction entre AKT et les lipides membranaires, réduisant ainsi la concentration de PIP3 libres et nécessaires pour l'activation de la protéine kinase PDK1. Un exemple de mutation causant une hyperactivation de la protéine AKT1 est la mutation E17K (Chen et al., 2020). Cette mutation se situe dans le domaine PH de la protéine AKT1 et se retrouve notamment dans les cancers de la vessie, mammaire, ovariens, du pancréas ou de l'endomètre. Cette mutation entraîne une stabilisation de l'interaction entre AKT1 et les phospholipides de membrane avec comme conséquence la phosphorylation constitutive de la Thr308. Des mutations qui possèdent à peu près les mêmes caractéristiques sont la mutation E49K pour AKT1 et G171R pour AKT3, identifiées dans les cancers de la vessie avec une hyperphosphorylation de la protéine AKT et une activation constante de la protéine (Mundi et al., 2016).

Pour finir, les modifications post-traductionnelles d'AKT, telles que la O-GlcNAcylation, l'acétylation, la SUMOylation ou autres, peuvent influencer négativement sur l'hyperactivation d'AKT dans les cancers selon la modification en question avec une activation plus importante d'AKT, même en présence de PI3K et PTEN normales (Revathidevi and Munirajan, 2019).

- Les stratégies thérapeutiques dans le traitement de cancers présentant des altérations de la voie PI3K/AKT/mTOR

La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est une des voies les plus fréquemment altérées dans les cancers. Ces altérations peuvent apparaître au niveau des trois principaux acteurs de la voie de signalisation, c'est-à-dire des protéines PI3K, AKT ou bien mTOR. Afin d'adapter au mieux les thérapies selon les mutations présentes chez le patient, des traitements ciblés ont été proposés, notamment avec l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques dirigés contre les trois kinases (Janku et al., 2018; Millis et al., 2016; Rodon et al., 2013).

Les inhibiteurs de la PI3K peuvent être de plusieurs types selon leur spécificité d'isoforme et de classes reconnues. La première génération d'inhibiteurs de PI3K comprend la wortmannine ainsi que le LY294002. La wortmannine représente un produit naturel isolé en 1947 du *Penicillium Wortmannin* et se lie de manière irréversible aux enzymes PI3K sur un résidu de lysine. En revanche, le LY294002 est moins puissant et permet un lien réversible avec la PI3K. A cause de leur faible solubilité, de leur instabilité et de leur toxicité, des études pour la découverte de nouveaux composés ont été établies (Bauer et al., 2015; Janku et al., 2018; Walker et al., 2000) (*Figure 12*).

Parmi d'autres inhibiteurs qui ont été développés les années suivantes, on y retrouve des pan-inhibiteurs tels que Buparlisib qui est en essai clinique de phase III contre le cancer du sein, ou bien SF1126 en phase II chez des patients atteints de HNSCC et qui présentent une altération PI3K (Maira et al., 2012; Ragon et al., 2017; Santuray et al., 2018). Ces inhibiteurs permettent de cibler les différentes isoformes de p110 par exemple, tels que  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$  et sont appelés de seconde génération pour leur effet spécifique sur le site catalytique de la kinase.

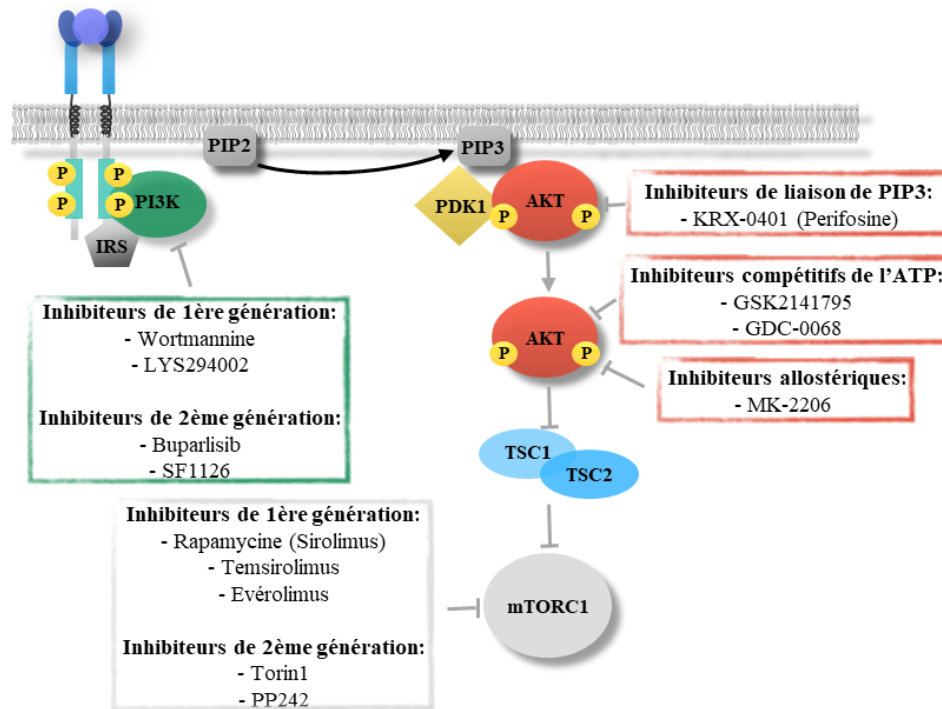


Figure 12 : Développement d'inhibiteurs de la voie PI3K/AKT/mTOR. Des inhibiteurs ont été identifiés et ciblent une des trois protéines principales de la voie PI3K : PI3K, AKT ou mTOR.

La protéine mTOR représente elle aussi une cible proposée pour la mise en place de thérapies ciblées. Un des premiers inhibiteurs de mTOR sur le marché a été la rapamycine ou *sirolimus* qui avait été d'abord étudié comme antifongique et comme immunosuppresseur puisqu'elle possède une action inhibitrice sur la prolifération des lymphocytes T via l'interleukine 2 (Nungaray et al., 2005). Cependant, si d'un côté comme immunosuppresseur la rapamycine est un bon candidat pour les traitements, de l'autre côté cette molécule n'est pas tout à fait indiquée pour la cancérologie en raison d'une résistance à la rapamycine qui s'installe. Pour cette raison, des dérivés de la rapamycine ont commencé à être développés, tels que le *temsirolimus* (CCL779) et l'*évériolimus* (RAD001), qui sont deux dérivés de la rapamycine appelés aussi « rapalogues ». Ces deux médicaments sont utilisés dans le traitement de cancers du rein, du sein et des lymphomes. Leur mode d'action est de former un complexe moléculaire de très grande affinité avec la protéine FKBP12 qui se fixe sur le domaine FRB de la protéine mTOR. Avec la formation d'un complexe avec un encombrement stérique important, la protéine mTOR devient a fonctionnelle. Mais l'apparition d'infections récurrentes causés par leur effet immunosuppresseur et de



mécanismes de résistance pour ces inhibiteurs de première génération, ont mis de côté ces derniers. Le développement d'inhibiteurs de seconde génération a suivi, avec le Torin1 ou le PP242 qui sont des antagonistes de l'ATP (Baselga et al., 2012; Guertin and Sabatini, 2009; Hudes et al., 2007; Janku et al., 2018; Klumpen et al., 2010).

La troisième cible pour le traitement de cancers avec une dérégulation de la voie PI3K/AKT/mTOR est la protéine AKT. Pour cela, des inhibiteurs d'AKT ont été développés et sont classifiés en trois catégories d'inhibiteurs selon leur activité, c'est-à-dire s'ils sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, des inhibiteurs allostériques ou bien des inhibiteurs de liaison avec PIP3. Le tout premier inhibiteur d'AKT qui est entré dans des essais cliniques est le KRX-0401 appelé aussi *Perifosine*. Cette molécule est un alkylphospholipide qui s'accumule dans la membrane plasmique en empêchant le lien entre la protéine AKT et le PIP3. Les effets de cet inhibiteur sont assez modestes malgré que son action anti-angiogénique pour le traitement contre le gliome ait été démontré (Brown and Banerji, 2017; Mundi et al., 2016; Revathidevi and Munirajan, 2019; Song et al., 2019).

D'autres molécules développées faisant partie de la classe d'inhibiteurs compétitifs de l'ATP sont par exemple le GSK2141795 et le GDC-0068 qui sont en phases I/II pour le traitement de cancers du sein, de l'estomac, de la prostate, du mélanome et des leucémies (Cheraghchi-Bashi et al., 2015; Saura et al., 2017). Ces inhibiteurs ont la capacité d'inhiber l'activité catalytique de la protéine AKT qui n'est plus capable de phosphoryler ses cibles dont mTOR. L'inconvénient majeur de ces inhibiteurs est l'absence de sélectivité pour AKT puisqu'ils ont une influence sur les protéines PKA, PKC ou p70S6K (Hers et al., 2011).

La dernière classe d'inhibiteur d'AKT est représentée par des molécules inhibitrices allostériques, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se fixer sur le domaine PH de la protéine AKT et d'induire des modifications conformationnelles d'AKT. La conséquence de ces modifications de la conformation est que la protéine AKT ne peut effectuer sa translocation au niveau de la membrane. Parmi ces inhibiteurs, on y retrouve la molécule MK-2206, spécifique pour les trois isoformes d'AKT (Hirai et al., 2010). Il a été démontré que cette molécule a une meilleure efficacité dans des lignées présentant l'absence de PTEN, une mutation du gène P3KCA ou bien des amplifications des gènes codant les RTKs (Yap et al., 2011). Cet inhibiteur peut être utilisé en combinaison avec d'autres molécules. La liste des inhibiteurs de cette classe qui ont été découverts est très longue et les nommer tous serait difficile. Néanmoins, les stratégies thérapeutiques sont toujours en évolution, afin de cibler au mieux les protéines altérées et éviter les mécanismes de résistance qui peuvent s'installer, effet indésirable de certains inhibiteurs de première génération.

## II. La maturation des ARN et les mécanismes de contrôle-qualités

### 1) De l'ARN pré-messager à l'ARN messenger

Le processus de maturation de l'ARN, d'ARN pré-messager à ARN messenger, est indispensable pour la reconnaissance de ce dernier par le ribosome afin de permettre la synthèse protéique.

Initialement, l'ADN est transcrit en acide ribonucléique pré-messager (ARN pré-messager) qui va poursuivre plusieurs étapes de maturation pour devenir un ARN mature (ARN messenger). La traduction de ce dernier va donner comme produit final une protéine. Chaque protéine exprimée est issue d'un gène et portera une fonction particulière utile aux besoins de la cellule (Crick, 1970).

Trois étapes composent le mécanisme de maturation de l'ARN. La première est l'ajout d'une coiffe de 7-méthylguanosine triphosphate à l'extrémité 5'. Puis, à l'extrémité 3' se forme une queue poly-A à l'aide d'un processus appelé polyadénylation. Enfin, la dernière étape est l'épissage avec la suppression des introns et la jonction des exons (Popp and Maquat, 2014).

La maturation de l'ARN est effectuée dans le noyau à l'aide de complexes protéiques et/ou ribonucléoprotéiques spécifiques à chaque étape. L'ARN messenger qui en découle est recouvert de protéines formant ainsi des particules ribonucléoprotéiques appelées aussi mRNP.

Une fois ces particules mRNP exportées dans le cytoplasme, elles subissent un remodelage pour pouvoir ensuite être traduites en peptides. La maturation en ARNm est nécessaire tout d'abord pour l'export de cette molécule d'ARN vers le cytoplasme puis pour la traduction en protéine. Cette maturation sert notamment à protéger les extrémités des ARNm des enzymes de dégradation, comme les exoribonucléases et organiser la séquence codante afin qu'elle soit conforme à la séquence codée par le gène (Proudfoot et al., 2002; Wahl et al., 2009).

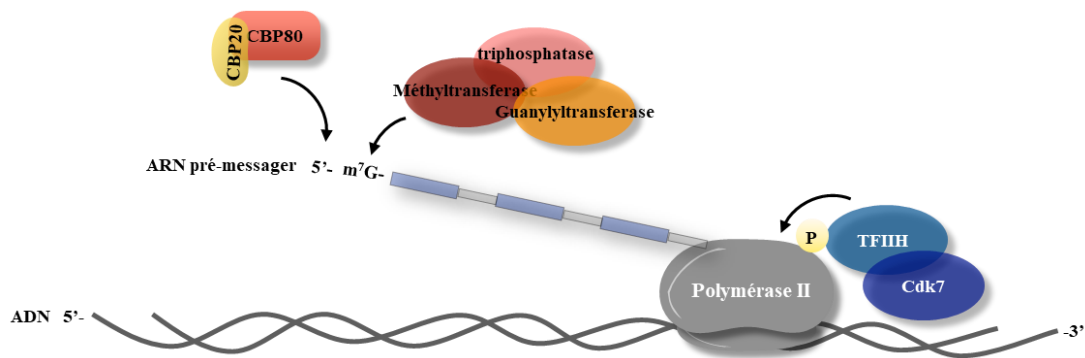
Les étapes de la maturation des ARN sont décrites en détail ci-dessous, en me focalisant surtout sur les mécanismes présents dans les cellules de mammifères.

- La coiffe

La toute première étape de maturation de l'ARN pré-messager en ARNm apparaît au cours de la transcription lorsqu'une trentaine de nucléotides (nt) ont été polymérisés. Cette étape consiste en l'ajout d'une N7- méthylguanosine (m7GpppN) en 5' de l'ARN pré-messager en liant le premier nucléotide de l'ARN avec une polarité inversée 5'-5'. Cet ajout est appelé coiffe ou *cap* en anglais et possède des

fonctions diverses, comme par exemple celle de protéger contre la dégradation dirigée par des exoribonucléases (Furuichi, 2015) (*Figure 13*).

Reddy et al. ont été les premiers à identifier cette structure, après la découverte d'une coiffe chez les virus des années auparavant (Banerjee, 1980; Ghosh and Lima, 2010; Martin et al., 1975; Shatkin, 1976). De plus, chez les procaryotes, aucune structure similaire n'est retrouvée, indiquant que la coiffe est spécifique des organismes eucaryotes et des virus (Furuichi, 2015).



*Figure 13* : L'ajout de la coiffe en 5' sur l'ARN. Lors de la transcription, le facteur de transcription TFIIH et la kinase Cdk7 phosphorylent la Ser5 du domaine carboxy-terminal ou CTD de la Polymérase II. La phosphorylation induit le recrutement de trois enzymes, l'ARN triphosphatase, l'ARN guanylyltransférase et l'ARN guanine-N7 méthyltransférase qui permettent l'ajout de la coiffe en 5'. Le complexe CBC composé des protéines CBP20 et CBP80 se fixe ensuite sur la coiffe.

Les enzymes nécessaires à l'ajout de la coiffe sont : l'enzyme ARN triphosphatase, l'ARN guanylyltransférase et l'ARN guanine-N7 méthyltransférase (Fabrega et al., 2004; Furuichi, 2015). La première enzyme, c'est-à-dire l'ARN triphosphatase, permet le clivage du 5'-prophate qui est terminal à l'ARN pré-messenger en cours de transcription. De suite, la deuxième enzyme l'ARN guanylyltransférase catalyse l'ajout d'une guanosine G monophosphate à l'extrémité clivée par la triphosphatase pour former une structure G(5')ppp(5'). En dernier, l'enzyme méthyltransférase ajoute un groupe méthyle en position N7 de la guanosine afin de donner vie à la coiffe 7mG G(5')ppp(5') (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014).

Afin de recruter les enzymes nécessaires à la formation de la coiffe, l'ARN polymérase II doit être phosphorylée sur la Sérine 5 de son domaine carboxy-terminal ou CTD. Deux protéines sont recrutées, le facteur de transcription II H (TFIIH) ainsi que la kinase Cdk7 (ou Kin28 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*), afin de permettre la phosphorylation de ce résidu Ser5. Au cours de la transcription, une deuxième sérine de l'ARN polymérase II est phosphorylée, plus exactement la Ser2 dans le domaine CTD, nécessaire lors de la phase d'élongation du transcrit et pour le recrutement des protéines impliquées dans l'épissage. La phosphorylation de la Ser2 a pour conséquence la perte d'affinité du complexe protéique permettant la formation de la coiffe avec le domaine CTD de la

polymérase II, qui se détache. La Sérine 2 phosphorylée est nécessaire au clivage et au recrutement des facteurs de terminaison de la transcription. On peut donc comprendre pourquoi cette première étape survient après la transcription des premiers nucléotides, et de plus, cela nous fait comprendre le lien entre ce processus de maturation et celui de la transcription (Braun and Young, 2014).

La coiffe possède des fonctions qui sont diversifiées. Une de celles-ci est d'interagir avec un complexe particulier, appelé complexe de fixation de la coiffe ou *Cap-Binding Complex* (CBC). Ce complexe protéique est un hétérodimère composé des protéines CBP20 (*Cap-binding protein*) et CBP80 de 20 kDa et 80 kDa respectivement. Chez la levure, l'hétérodimère est composé des protéines Cbc1 et Cbc2 (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014). Les protéines CBP20 et CBP80 fonctionnent toutes les deux de façon synergique, et CBP80 interagit avec CBP20 qui se lie à son tour à la coiffe (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014; Hocine et al., 2010). Un rôle du complexe protéique CBC est celui d'intervenir dans l'activation du mécanisme de *Nonsense-mediated mRNA decay* (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014; Lejeune et al., 2004, 2002).

Le complexe CBC a une fonction très importante puisqu'il reconnaît la coiffe au niveau nucléaire et influence l'épissage de l'ARN ainsi que l'export de la mRNP vers le cytoplasme. En effet, le CBC est reconnu par un complexe protéique du pore nucléaire, permettant le passage du noyau vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, après le premier tour de la traduction, le complexe CBC est remplacé par le facteur d'initiation de la traduction eIF4E qui permettra de poursuivre les tours suivants de la traduction (Gonatopoulos-Pournatzis and Cowling, 2014; Hocine et al., 2010). Le complexe eIF4F dont fait partie eIF4E, ainsi que eIF4A et eIF4G est de cette façon impliqué dans la traduction de l'ARNm en protéine. La protéine eIF4E interagit de façon directe à la coiffe, alors que eIF4G permet le lien de eIF4E avec eIF4A, une DEAD-box ARN hélicase/ATPase permettant de dérouler les structures secondaires dans la région 5'-UTR (Gross et al., 2003).

La coiffe agit comme précurseur d'une autre modification post-transcriptionnelle, notamment la polyadénylation. Les étapes de maturation de l'ARN sont finement contrôlées afin de déceler la présence de possibles altérations. En effet, chez les cellules de mammifères, la protéine DXO permet de vérifier les étapes de l'ajout de la coiffe. En cas de dysfonctionnement, comme l'absence de méthylation, la coiffe est clivée par un mécanisme de contrôle nucléaire qui rétablit l'extrémité 5'-monophosphate, et permet ainsi la dégradation de l'ARN par l'exoribonucléase nucléaire Rat1/XRN2 (Jiao et al., 2013).

Une autre fonction de la coiffe est de protéger l'extrémité 5' libre de l'action des exoribonucléases à activité 5'→3', enzymes dégradant les ARN au niveau de cette extrémité (Braun and Young, 2014; Hocine et al., 2010). Cette possible dégradation ribonucléolytique 5'-3' peut apparaître au niveau nucléaire, mais aussi une fois le transport de l'ARNm vers le cytoplasme achevé par la protéine XRN1.

- La queue poly-A

Une autre étape de la maturation des ARN est l'événement de polyadénylation, c'est-à-dire l'ajout d'une séquence répétitive d'adénosines appelée queue poly-A. Cet événement de polyadénylation survient dès la fin de la transcription de l'ADN en ARN pré-messager. Chez les eucaryotes, tous les ARNm possèdent une queue poly-A à l'exception des ARN pré-messagers codant pour les histones (Kühn and Wahle, 2004; Mandel et al., 2008; Tudek et al., 2018) (Figure 14).

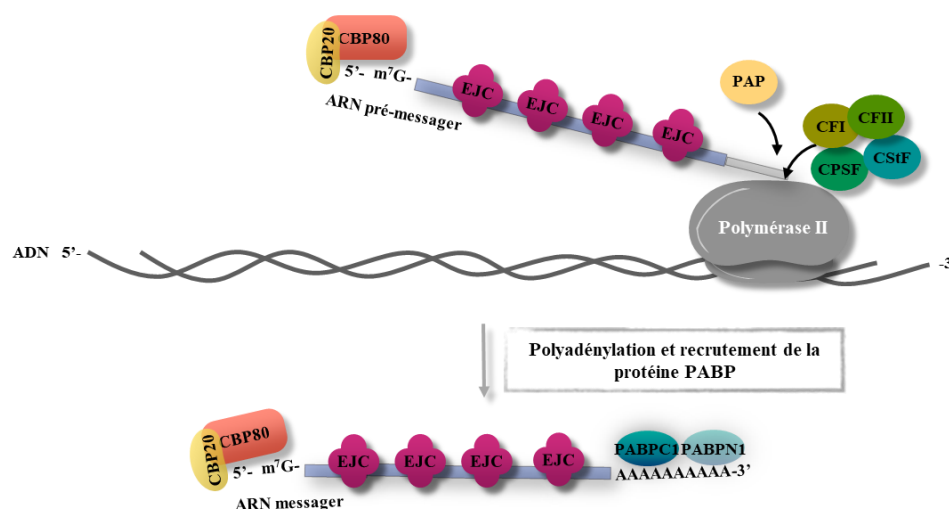


Figure 14: L'événement de polyadénylation de l'ARN. A la fin de la transcription, le domaine CTD de la Polymérase II qui présente la Ser2 phosphorylée, recrute les enzymes pour la polyadénylation telles que le complexe CPSF, les facteurs CStF, CFI et CFII. Après le clivage du transcrit causé par le signal de polyadénylation, la queue poly-A est ajoutée. Les protéines PABPN1 et PABPC1 se fixent sur la queue poly-A.

Le clivage de l'extrémité 3' ainsi que la réaction de polyadénylation sont dirigés par des éléments de séquence, appelés éléments cis (*cis elements*), qui se situent dans la région non traduite de l'ARN pré-messager. Un changement de position de ces séquences ainsi qu'un mauvais fonctionnement entraînent une perte de l'efficacité de la polyadénylation. Chez les mammifères, il existe trois éléments de séquence principaux qui définissent le site de polyadénylation, ainsi que deux éléments auxiliaires permettant la régulation de la maturation. Les premières séquences consistent en un signal de polyadénylation appelé aussi PAS (*polyadenylation signal*), du site de clivage et de l'élément en aval riche en G/U, appelé aussi DSE (*downstream element*). Les deux séquences auxiliaires sont en revanche des éléments qui entourent les trois principaux éléments qui forment le signal (Darmon and Lutz, 2012; Eckmann et al., 2011; Mandel et al., 2008).

Le signal de polyadénylation PAS est un hexamère AAUAAA, ou sa variante AUUAAA, qui se situe en amont du site poly-A à une distance de 10 à 30 nucléotides. Il a été démontré chez des patients atteints

de  $\alpha$  et  $\beta$  thalassémie avec une mutation de la dernière base du motif PAS une réduction de l'expression des ARNm (Higgs et al., 1983). Cela explique donc pourquoi cet élément est crucial dans la régulation des ARNm.

Un autre élément *cis* est la région DSE riche en G/U qui est la moins conservée et elle est située généralement à une distance de 30 nucléotides du site de clivage. Cette région DSE a été observée sous deux formes : la première riche en GU qui forme la séquence YGUGUUYU où Y est une pyrimidine, et la deuxième riche en U donnant la séquence UUUUU.

Le site de clivage est extrêmement important et se situe entre les éléments PAS et DSE, à une distance de 13 nucléotides (Mandel et al., 2008).

Les deux séquences auxiliaires, en amont et en aval des trois principaux éléments, permettent la régulation de la polyadénylation. Celle située en amont, qui consiste généralement en éléments riches en U, permet de promouvoir l'interaction entre les facteurs de polyadénylation et le site de clivage. La séquence en aval du site de clivage est généralement riche en G et présente la même fonction de régulation que la première séquence auxiliaire (Mandel et al., 2008).

Comme dit précédemment, la réaction de maturation de l'extrémité 3' est composée d'une première réaction de clivage et de la réaction de polyadénylation qui suit. Différentes protéines interagissent avec ces séquences et permettent l'ajout de la queue poly-A. En effet, une première protéine est le facteur de clivage et de polyadénylation, appelé CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*), constitué de cinq sous-unités CPSF-30, CPSF-73, CPSF-100, CPSF-160 et hFip1.

La protéine CPSF interagit directement avec le signal de polyadénylation PAS mais son interaction est sous l'influence d'une deuxième protéine, le facteur de stimulation de clivage CStF (*Cleavage Stimulation factor*). Après l'interaction entre CPSF et l'élément PAS, le facteur CStF se lie à l'élément DSE riche en G/U, pour former un complexe avec CPSF, en permettant ainsi la formation d'une boucle à l'extrémité 3' de l'ARN. Cela entraîne le recrutement des facteurs de clivage I et II appelés CFI et CFII (*cleavage factor I and II*), avec la formation du complexe ARN – CPSF-CStF-CFI-CFII.

L'enzyme qui se charge de couper l'ARN et aussi d'ajouter les résidus d'adénosines est la polymérase poly-A, PAP pour *Poly-A polymerase* (Darmon and Lutz, 2012; Eckmann et al., 2011; Kühn and Wahle, 2004; Mandel et al., 2008). Lors de la synthèse de la queue poly-A, la protéine nucléaire PABPN1 (*poly-A binding protein*) et la protéine cytoplasmique PABPC1 (*poly-A binding protein*) sont recrutées au fur et à mesure sur l'extrémité 3', entraînant une augmentation de la processivité de la PAP. Le processus de polyadénylation se termine après qu'environ 200 à 300 résidus d'adénosines aient été ajoutés sur l'ARNm. Ensuite, lors de l'export de l'ARNm, la protéine PABPN1 se détache en laissant sa place à la protéine PABPC1 de façon exclusive. Les deux protéines *Poly-A binding protein* agissent comme des transporteurs entre le noyau et le cytoplasme. De plus, la PABPC1 joue un rôle dans la régulation de la

traduction de l'ARNm en protéine. Une autre fonction tout aussi importante de la protéine PABPC1 est retrouvée dans l'activation et la régulation du mécanisme de NMD. Une partie du chapitre III sera consacrée à son activité dans le NMD (Darmon and Lutz, 2012; Kumar and Glaunsinger, 2010; Lemay et al., 2010; Mandel et al., 2008).

La maturation de l'ARN à l'extrémité 3' est importante pour de nombreuses raisons. Cette étape de maturation agit sur la transcription en mettant fin à celle-ci. De plus, la queue poly-A confère une protection de la région 3'-UTR contre les exoribonucléases 3'-5', et donc sa stabilité au niveau du noyau mais aussi dans le cytoplasme.

Une autre fonction de la queue poly-A est de permettre le transport vers le cytoplasme de l'ARNm pour pouvoir déclencher la traduction de ce dernier et synthétiser les protéines nécessaires au bon fonctionnement des cellules. Un lien entre la traduction et la réaction de polyadénylation a été démontrée grâce à l'identification d'interactions entre les protéines *Poly-A binding protein* et certains facteurs impliqués dans la traduction tels que le facteur d'initiation eIF4G ou bien le facteur de terminaison eRF3 (Ivanov et al., 2016; Mandel et al., 2008; Tudek et al., 2018).

- L'épissage et sa régulation

- a) Épissage constitutif

Une autre modification faisant partie des processus de maturation de l'ARN est l'épissage ou en anglais *splicing*. L'épissage conduit à la suppression de séquences introniques et à la jonction des séquences exoniques consécutives, événement co-transcriptionnel comme les autres modifications de l'ARN (Hastings and Krainer, 2001; Hocine et al., 2010).

Afin d'être reconnus comme tels et pouvoir être éliminés, les introns possèdent des caractéristiques spécifiques pour que le spliceosome, complexe ribonucléoprotéique permettant la réaction d'épissage, puisse séparer les régions introniques des régions exoniques, avec un remodelage successif de la mRNP.

Chez les eucaryotes, l'identification des introns est effectuée grâce à trois séquences consensus principales. La première est le site d'épissage 5' (5'ss) entre l'exon amont et l'intron qui suit, formée généralement de la séquence consensus GURAGU où R est une purine (soit adénosines, soit guanosine). La deuxième séquence consensus est le site d'épissage 3' (3'ss) entre l'intron et l'exon aval, formée d'une séquence polypyrimidique se finissant très souvent par CAG. Enfin, à 20 à 50 nucléotides en amont du site d'épissage 3' se situe le point de branchement BPS (*branch point sequence*). La particularité du point de branchement est une adénosine qui sera à l'origine de la première réaction de transestérification pour former une structure secondaire appelé lasso (*lariat*) (Hastings and Krainer, 2001; Lee and Rio, 2015; Reed and Maniatis, 1988) (*Figure 15*).

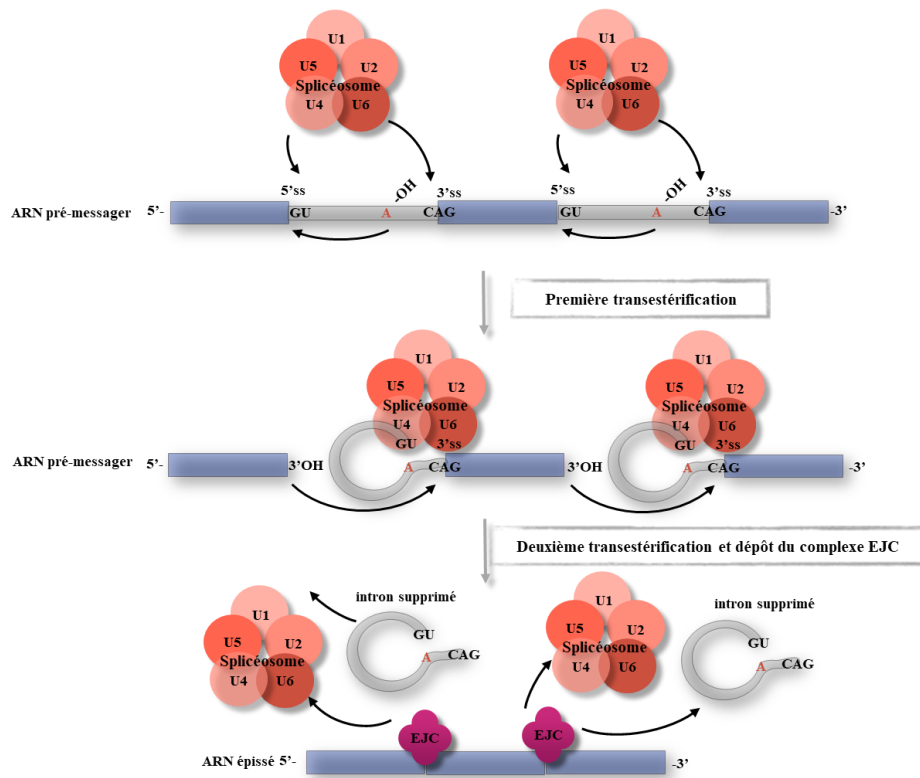


Figure 15 : Une des réactions de maturation de l'ARN est l'épissage constitutif. Le splicéosome assure deux réactions de transestérification afin de permettre l'excision des introns. La première réaction de transestérification libère l'exon en 5', avec le site d'épissage en 5' interagissant avec le point de branchement et forme le lasso (*lariat*). La seconde réaction permet l'attaque nucléophile du groupe hydroxyle du site d'épissage en 3' et l'excision de l'intron. Le complexe EJC est déposé après l'épissage.

Le splicéosome qui catalyse la réaction d'épissage, est formé de cinq ribonucléoprotéines nucléaires appelées U snRNP (*small nuclear RNPs*), plus précisément U1, U2, U4, U5 et U6, en conjonction avec un large nombre de protéines additionnelles. Tout le long de la réaction d'épissage, le splicéosome change de conformation et forme des complexes différents selon les protéines qui interviennent (Matera and Wang, 2014; Wahl et al., 2009; Will and Luhrmann, 2011). Ces éléments protéiques sont conservés chez la levure mais aussi chez les cellules de mammifères (Käufer and Potashkin, 2000).

La suppression des introns se fait avec deux séries de réactions de transestérification afin de permettre la formation d'un lien phosphodiester entre les deux exons qui entourent la séquence intronique. Tout d'abord, la protéine U1 est la première à interagir avec la séquence 5'ss, puis par le facteur d'épissage SF1 qui se lie à la boîte de branchement, en formant le complexe E. La protéine U2 associée avec le facteur U2 *auxiliary factor* (AF) interagit successivement avec l'adénosine du point de branchement et



la séquence de pyrimidines du site 3' d'épissage, en induisant le détachement de la protéine SF1. Cela permet de former le complexe de pré-splicéosome ou complexe A. Puis, le complexe trimérique formé des protéines U4, U5 et U6 rejoint le complexe A, en formant ainsi le complexe du splicéosome précatalytique ou complexe B. Le détachement de U1 et de U4 active le splicéosome, devenant ainsi le complexe B\*, qui entrainera la première réaction de transestérification après réarrangements de l'ARN et des protéines. Le complexe C va permettre la deuxième réaction de transestérification, en induisant la formation du lasso (*lariat*) et la jonction des exons. La réaction d'épissage nécessite de l'énergie sous forme d'ATP, et c'est là où interviennent plusieurs protéines comme Prp28 ou Prp2 dans chaque étape du processus d'épissage qui hydrolysent l'ATP (Wahl et al., 2009).

L'épissage est une des étapes de maturation de l'ARN, qui permet un remodelage de la mRNP mais aussi le recrutement de complexes protéiques, comme l'*Exon Junction Complex* ou EJC. Ce complexe macromoléculaire est déposé comme conséquence de l'épissage à 20-24 nucléotides en amont de chaque jonction exon-exon (Le Hir et al., 2000a, 2000b). L'EJC possède plusieurs fonctions comme celle notamment de favoriser l'export des mRNP du noyau vers le cytoplasme, ainsi que d'activer et réguler le mécanisme de dégradation du *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) dont je parlerai de façon détaillée ultérieurement (Le Hir et al., 2001; Zhou et al., 2000). Il peut néanmoins jouer un rôle dans le processus d'épissage même puisqu'il a été démontré qu'une mutation des protéines constituant l'EJC, dont par exemple les protéines d'épissage RNPS1 ou SRm160, engendre des sauts d'exons chez la drosophile (Ashton-Beaucage et al., 2010).

Le type d'épissage que j'ai présenté, est appelé épissage constitutif car il se produit à chaque transcription du gène. Il existe aussi des réactions d'épissage appelée épissage alternatif, qui se produisent seulement dans certaines conditions et permettent de produire plusieurs formes d'ARNm codant des isoformes protéiques différentes à partir d'un même transcrit (Hastings and Krainer, 2001).

#### b) Épissage alternatif

Le génome humain est composé d'environ 25 000 gènes qui peut donner naissance à plus de 100 000 protéines différentes. Cela s'explique par l'épissage alternatif, un événement qui peut créer des variants différents issus d'un même gène.

En effet, l'épissage constitutif est lui, centré sur la suppression des introns et la ligation des exons en créant l'isoforme « de référence », mais pour l'épissage alternatif, il existe des combinaisons possibles aboutissant à des isoformes variées (Zheng et al., 2005).

Un exemple est celui du gène *Dscam* chez la drosophile, qui peut produire environ 38 000 ARNm à partir de la même séquence d'ARN pré-messager (Schmucker et al., 2000).

Chez les eucaryotes supérieurs, plus de 90 % des gènes sont sujets à l'épissage alternatif (Pan et al., 2008). La régulation de ce mécanisme est néanmoins fondamentale et cruciale afin d'éviter le développement de pathologies (Licatalosi and Darnell, 2010).

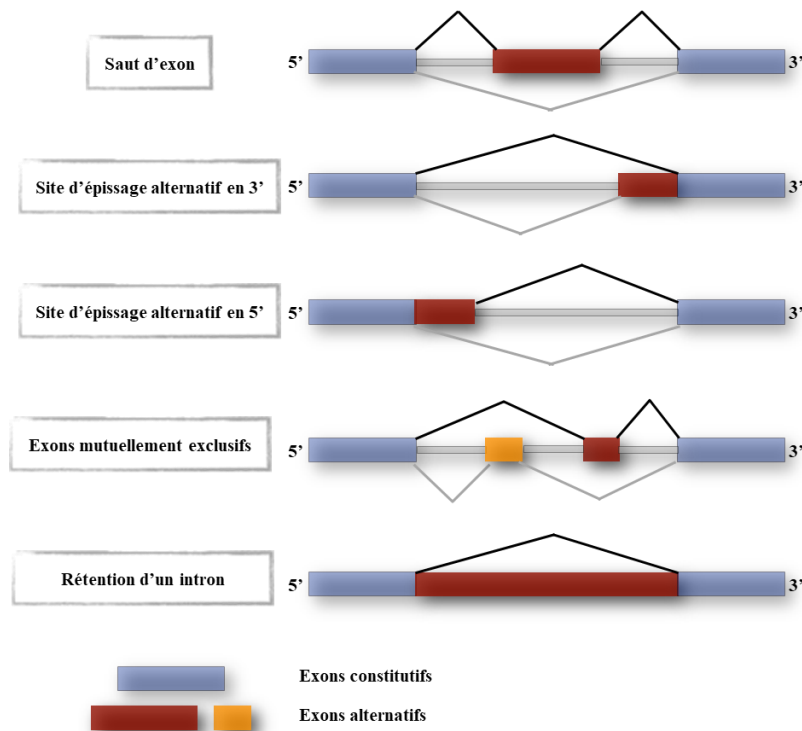


Figure 16 : Représentation de l'épissage alternatif. Les exons sont représentés par des rectangles de couleur bleue, rouge et orange, alors que les introns sont en gris.

L'épissage alternatif peut être dû à différents événements qui ne sont pas forcément exclusifs, tels que le saut de l'exon (ou *exon skipping*), l'utilisation du site 3' d'épissage alternatif, l'utilisation du site 5' d'épissage alternatif, les exons mutuellement exclusifs et la rétention complète d'un intron (Figure 16).

L'épissage alternatif le plus courant est le saut d'un exon qui est la conséquence de la non reconnaissance par le spliceosome d'un site d'épissage 3' et 5' entourant un exon. Cet exon sera alors absent de l'ARNm. Ce type d'épissage alternatif est retrouvé dans pratiquement 40 % des réactions d'épissage alternatif.

Les événements d'utilisation d'un site 3' ou 5' d'épissage alternatif montrent une compétition des sites d'épissage, c'est-à-dire que les sites ne seront pas forcément reconnus et entraînent une rétention intronique en amont de l'exon ou bien une excision d'une partie proximale de l'exon. Ces événements représentent 7,9 % et 18,4 %, respectivement, des épissages alternatifs chez les eucaryotes.

La réaction d'épissage alternatif avec des exons mutuellement exclusifs présente une incorporation exclusive d'une séquence exonique, notamment l'incorporation du premier exon fera que le deuxième ne sera pas considéré et intégré dans la séquence d'ARNm.

La rétention d'un intron apparaît lorsque le splicéosome ne reconnaît pas les sites d'épissage 5' et 3' de la séquence intronique ce qui conduit à conserver cette séquence intronique dans l'ARNm (Black, 2003; Cartegni et al., 2002; Labrador and Corces, 2003).

Pour l'épissage alternatif mais aussi pour le constitutif, la régulation du splicéosome est fondamentale puisque cela va déterminer le produit final de l'ARNm.

En effet, le mécanisme d'épissage alternatif est influencé par plusieurs paramètres tels que la force des sites d'épissage, la présence d'éléments de régulation d'épissage sur l'ARN, le niveau d'expression de protéines interagissant avec le splicéosome et la structure secondaire des ARN (Baralle and Giudice, 2017; Pan et al., 2008). On peut aussi parler d'éléments *cis* et *trans* qui interviennent dans le processus (*cis-acting sequence elements and trans-acting splicing factors*).

Les sites d'épissage peuvent tout d'abord être définis comme sites « forts » ou « faibles » selon s'ils sont identifiés lors de l'épissage constitutif, ou bien s'ils sont situés au niveau d'exons alternatifs (Fu and Ares, 2014). La séquence de ces sites influence l'épissage de l'ARN mais les séquences voisines ne sont pas à négliger. En effet, elles font parties des éléments *cis*, influençant la composition de l'ARNm. Les éléments *cis* sont classés en quatre grandes classes : les *exonic splicing enhancer* ou ESE, les *exonic splicing silencer* ou ESS, les *intronic splicing enhancer* ou ISE et les *intronic splicing silencer* ou ISS. Ces éléments auront soit un effet inhibiteur, soit activateur pour l'épissage (Shepard and Hertel, 2009).

Pour ce qui concerne les éléments protéiques *trans*, il existe plusieurs membres de la famille des protéines riches en Sérine/arginine (*SR proteins*) et les hnRNP (*heterogenous nuclear ribonucleoproteins*) (Bourgeois et al., 2004; Shepard and Hertel, 2009). Les protéines SR sont des protéines qui interagissent avec l'ARN à l'aide de plusieurs motifs de reconnaissance à l'ARN (RRM) qui les composent sur l'extrémité N-terminale. En C-terminal, elles possèdent un domaine d'interaction protéine-protéine appelé *RS domain*, riche en sérines et arginines. Ce domaine peut être phosphorylé afin d'activer les protéines SR (Misteli et al., 1998; Shepard and Hertel, 2009). Puis, d'autres facteurs régulateurs de l'épissage sont présents tels que la protéine NOVA, un facteur d'épissage neuronal exprimé dans le tissu cérébral et qui permet la régulation d'environ 700 transcrits alternatifs, avec des fonctions dans le développement synaptique (Buckanovich et al., 1993; Zaghlool et al., 2014).

Les structures secondaires de l'ARN peuvent aussi influencer l'épissage. Plus précisément, des structures en épingles à cheveux peuvent masquer des sites d'épissage, et c'est le cas notamment du gène MAPT où est présente la structure secondaire au niveau du 5'ss de l'exon 10. Deux protéines tau sont ainsi produites, contenant trois ou quatre régions de liaison aux microtubules (appelées 3R-tau ou 4R-tau) (Grover et al., 1999; J. Park et al., 2016).

- L'export de l'ARN messenger vers le cytoplasme

Après la maturation de l'ARN pré-messenger en ARNm, la molécule d'ARN doit être transportée vers le cytoplasme afin d'être traduite en protéine. Uniquement un ARN mature pourra être transféré du noyau vers le cytoplasme et un dysfonctionnement d'une des trois étapes de maturation peut entraîner la dégradation de l'ARN ou bien la production d'une protéine aberrante (Hocine et al., 2010).

Le noyau où sont effectuées les étapes de maturation post-transcriptionnelle est constitué d'une double membrane qui consiste en une couche biphase phospholipidique imperméable à l'eau avec des protéines associées à cette couche. Le transport des molécules de mRNP est effectué par des protéines appelées *nuclear pore complexes* ou NPCs qui forment des pores nucléaires (Rodriguez et al., 2004) (*Figure 17*).

Le NPC consiste en une structure centrale d'environ 125 nm de diamètre contenant huit *spokes* qui se situent sur le tube central au niveau du côté cytoplasmique. Le tube central connecte le nucléoplasme avec le cytoplasme. Puis, des extensions périphériques sont présentes, comme les filaments du cytosquelette, qui permettent d'ancrer la structure au niveau de la double membrane phospholipidique (Rodriguez et al., 2004; Strambio-De-Castillia et al., 2010). D'autres protéines forment le complexe du pore nucléaire, ce sont les nucléoporines appelées aussi Nups. Ces dernières diffèrent selon leur position et leur fonction, comme les cytoplasmiques ou les nucléaires, appelées aussi FG-Nups pour leur composition en phénylalanine et glycine. Ce sont elles qui forment la barrière semi-perméable et permettent le transport des ions, de l'eau ainsi que des métabolites, mais sont restrictives pour les grandes molécules où un système de transport est mis en place (Strambio-De-Castillia et al., 2010).

Les mRNP sont des macromolécules trop grandes pour traverser seules les pores nucléaires. De ce fait, des protéines cargo, qui sont en réalité des récepteurs, aident les ARNm à rejoindre le cytoplasme. Chez la levure, le complexe de récepteurs s'appelle Mex67-Mtr2, alors que ce complexe a un autre nom chez les mammifères, appelé TAP-p15 ou bien NXF1-NXT1. Les karyophérines et les RanGTP n'interviennent pas dans ce type de transport, mais plutôt pour des molécules de petite taille.

A côté des récepteurs, des adaptateurs comme Yra1 ou Aly/REF s'associent aux récepteurs et aux ARNm puisqu'ils interagissent directement avec l'ARN. Les protéines SR intervenant lors de l'épissage de l'ARN pré-messenger peuvent aussi jouer un rôle d'adaptateur. Ce rôle se poursuit dans le cytoplasme où ces protéines SR peuvent avoir une fonction dans la stabilisation de l'ARN et dans la traduction (Köhler and Hurt, 2007).

Une fois dans le cytoplasme, plusieurs protéines se détachent en laissant la place à des protéines cytoplasmiques. Par exemple, le complexe CBC au niveau de la coiffe est remplacé par le facteur d'initiation eIF4E et la protéine PABPN1 sur la queue poly-A est, elle, remplacée par la PABC1 après le premier tour de traduction (Yasuhito Ishigaki et al., 2001; Wahl et al., 2009).

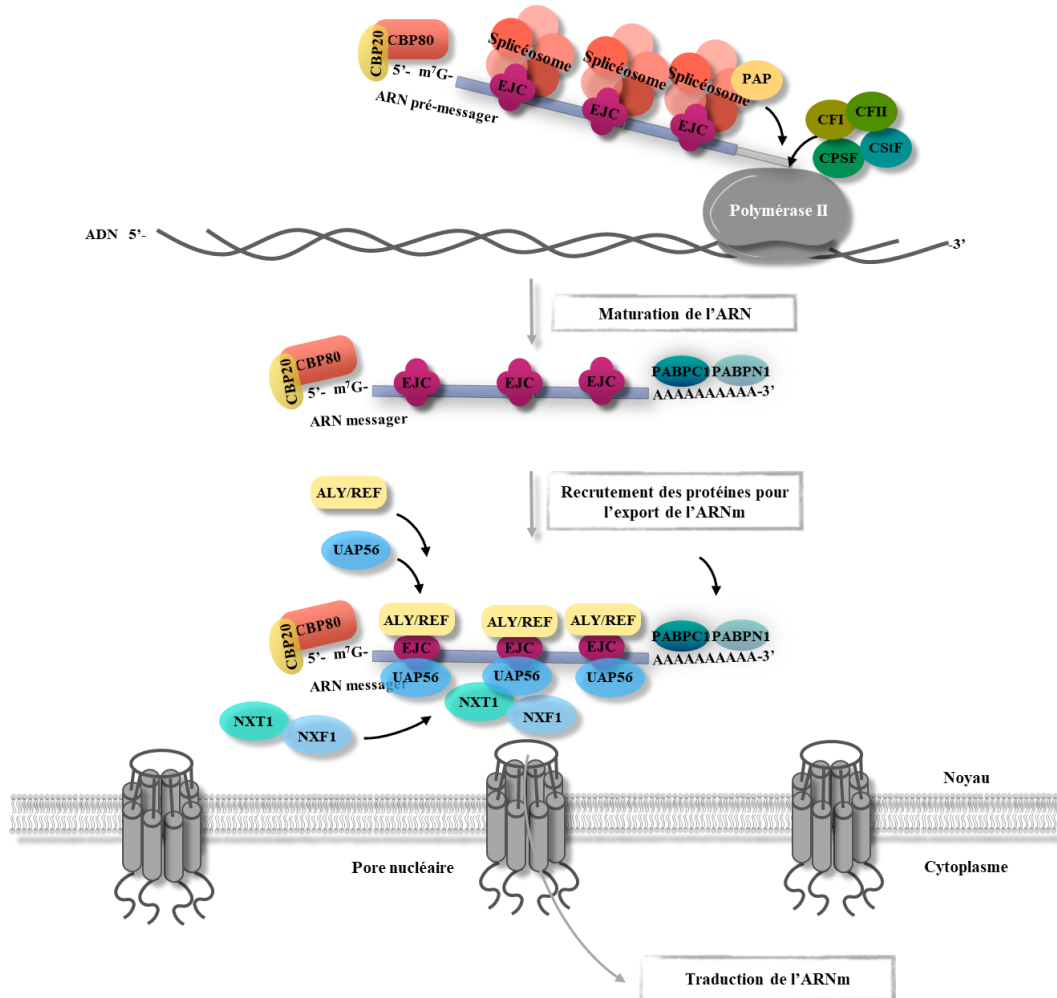


Figure 17 : Les étapes de maturation de l'ARN pré-messager en ARN messenger et l'export vers le cytoplasme. La maturation de l'ARN est représentée par trois événements : l'ajout de la coiffe en 5', l'épissage et la polyadénylation en 3'. Après l'épissage, le dépôt du complexe EJC entraîne le recrutement de facteurs d'export tels que Aly/REF ou NXT1 et ainsi, l'ARN est capable d'être exporté du noyau vers le cytoplasme en passant par les pores nucléaires.

Le seul complexe resté à sa place est l'EJC (Lejeune et al., 2002) qui reste fixé sur l'ARNm et semblerait avoir une fonction dans l'export de l'ARNm. En effet, l'EJC semble interagir avec le complexe NXF1-NXT1 lors du passage du noyau vers le cytoplasme (Köhler and Hurt, 2007). L'EJC a aussi un rôle dans le processus suivant qu'est la traduction.

## 2) Dégradation des ARNm

Les ARNs portants des erreurs ou résultants du manque de précision de la transcription et des étapes de maturations sont considérés comme aberrants. Ce type d'ARNm doit être dirigés rapidement vers des systèmes de dégradation afin d'éviter la synthèse de protéines aberrantes. Néanmoins, les ARNm ne présentant aucune mutation, mais qui doivent tout simplement être dégradés afin de permettre une régulation correcte des signaux dans la cellule, empruntent eux aussi des voies de dégradation. Les mécanismes de dégradation des ARNm sont présents dans le noyau, afin d'éviter l'export vers le cytoplasme d'ARN présentant déjà une maturation incomplète ou erronée, mais aussi dans le cytoplasme où ils sont associés à la machinerie traductionnelle. Sans système de dégradation des ARNm, il serait impossible pour une cellule de contrôler précisément son contenu en ARNm. L'expression d'un gène est donc un rapport entre la synthèse de l'ARNm et sa dégradation (Decker and Parker, 1994; Łabno et al., 2016a).

Comme évoqué précédemment, les étapes de maturation, plus précisément l'ajout de la coiffe ainsi que la polyadénylation, protègent les extrémités 5' et 3' des ARNm des exoribonucléases (Furuichi, 2015; Kühn and Wahle, 2004). Les deux extrémités sont des sites d'ancrages de différentes protéines, celles qui composent la coiffe et celles qui interagissent avec la queue poly-A, et les extrémités communiquent entre elles afin de permettre une circularisation de l'ARNm. Cette circularisation est fondamentale puisqu'elle ajoute une barrière supplémentaire à la dégradation des extrémités qui pourraient être exposées à des enzymes de dégradation (Borman, 2000). Les responsables de la circularisation sont les protéines PABP sur la queue poly-A ainsi que les facteurs eIF4E et eIF4G au niveau de la coiffe, qui interagissent, permettant une communication entre les deux extrémités d'un ARNm.

Il existe plusieurs voies de dégradation des ARNm comme la voie de dégradation de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5', ou bien la voie de dégradation par endonucléases. Selon l'organisme, une voie sera privilégiée au détriment d'une autre. Par exemple, chez la levure, la dégradation 5' → 3' est majoritairement activée, avec la coiffe de l'ARNm qui est supprimée par un événement appelé *decapping*, en exposant ainsi l'extrémité 5' (Mitchell and Tollervey, 2000). En revanche, chez les mammifères, la voie préférentielle est la dégradation 3' → 5', où la déadénylation est effectuée dans un premier temps afin de retirer la queue poly-A et d'exposer ainsi l'extrémité au complexe protéique appelé exosome (Chen and Shyu, 2011). Enfin, la dernière voie de dégradation classique des ARNm, qui est la moins fréquente, est la dégradation par clivage endonucléolytique (Schoenberg, 2011).

Il existe d'autres voies de dégradation des ARNm selon les caractéristiques et les modifications présentées sur le matériel génétique. Cela déclenche des mécanismes de contrôle-qualité ultérieures, comme le *Non-Stop decay* (NSD), le *No-Go decay* (NGD) et le *Nonsense -mediated mRNA decay*

(NMD). Nous parlerons plus dans le détail de ce dernier dans un deuxième temps puisqu'il est l'objet d'étude de ma thèse (Bicknell and Ricci, 2017).

Les principales voies ainsi que les étapes de la dégradation des ARNm sont décrites ci-dessous, avec les différents enzymes qui interviennent dans chacune d'entre elles.

- Déadénylation et la dégradation 3' → 5'

La voie de dégradation 3' → 5' est activée majoritairement chez les mammifères, avec tout d'abord un événement de déadénylation permettant l'élimination de la queue poly-A à l'extrémité 3' (Doidge et al., 2012).

Yamashita et al. ont découvert que la déadénylation est un événement biphasique, c'est-à-dire composé de deux étapes consécutives, liées entre elles puisque l'élimination de la queue poly-A ne peut pas être complétée si l'une des deux étapes est manquante. Lors de la première étape, environ 110 nucléotides sont supprimés de la queue poly-A depuis l'extrémité 3', sans le déclenchement de la dégradation de l'ARNm à ce stade. Par la suite, le raccourcissement de 110 à environ 20 nucléotides de la queue poly-A avec l'activation de la dégradation de l'ARNm, composent la deuxième étape (Yamashita et al., 2005).

Il existe différents complexes protéiques possédant une activité de déadénylation, comme les complexes PAN2-PAN3 et CCR4-NOT, et l'enzyme PARN (*poly-A specific ribonuclease*) (Figure 18). Le complexe qui intervient dans la première étape de déadénylation est le complexe PAN2-PAN3, un complexe dépendant de la protéine *poly-A binding protein* (PABP) à l'extrémité 3'. L'hydrolyse de la queue poly-A est catalysée par le domaine exonucléase de PAN2, protéine appartenant à la famille des RNAses. En revanche, la protéine PAN3 est la sous-unité régulatrice du complexe PAN2-PAN3. Comme indiqué précédemment, la première étape permet de réduire la taille de la queue poly-A à l'aide du complexe PAN2-PAN3 (Chen and Shyu, 2011; Wiederhold and Passmore, 2010). La suppression successive de ces nucléotides engendre le détachement de la protéine PABP fixée sur la queue poly-A, et au fur et à mesure que la séquence diminue en taille, le complexe PAN2-PAN3 perd son efficacité. L'activité réduite de PAN2-PAN3 se détache de l'ARNm en laissant la place à un deuxième complexe, CCR4-NOT. Ce dernier assure la dépolymérisation des adénosines restantes, en laissant ainsi une extrémité complètement découverte, qui puisse être reconnue et dégradée successivement par des exoribonucléases (Wiederhold and Passmore, 2010). Chez la levure, le complexe CCR4-NOT est composé de neuf sous-unités, incluant les protéines Ccr4, Caf1, Caf40, Caf130, Not1, Not2, Not3, Not4 et Not5. Chez les mammifères sont présentes des sous-unités homologues (Azzouz et al., 2009).

De façon intéressante, les protéines PABPC1 et PABPN1 fixées sur la queue poly-A, influencent de manière différente l'activité des complexes de déadénylation. En effet, les protéines PABP modulent l'activité des sous-unités catalytiques des complexes de déadénylation, mais aussi de décoiffage, en

stimulant l'activité déadénylase de la protéine PAN2 (Uchida et al., 2004) mais en inhibant celle de CCR4 (Tucker et al., 2002). Les protéines PABP possèdent un double rôle dans le métabolisme des ARNm dans le cytoplasme. D'une part, elles stabilisent les ARNm afin de déclencher la traduction, avec la formation du complexe de pré-initiation. D'autre part, elles régulent la dégradation des ARNm, en activant le processus de déadénylation avec le recrutement de complexes protéiques.

Après les deux étapes de déadénylation, la queue poly-A ne forme plus une protection contre les exoribonucléases. Les dernières adénosines restantes qui sont environ de 15 à 25 résidus, ne sont pas assez nombreuses pour arrêter la dégradation de l'ARNm. Ainsi, la voie de dégradation de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' est généralement déclenchée. Ce type de dégradation, selon si la coiffe est présente ou pas, peut s'accompagner de la dégradation dans le sens contraire, c'est-à-dire la dégradation 5' → 3' débutant par l'étape du décoiffage de l'ARNm. La dégradation 3' → 5' est gouvernée par un complexe multi-protéique composés d'exoribonucléases à activité 3' vers 5' appelée exosome, dont nous parlerons de manière détaillée dans le paragraphe des exoribonucléases (Niederberger et al., 2011).

- Décoiffage et dégradation 5' → 3'

Une autre voie de dégradation classique est celle où a lieu l'événement de décoiffage, c'est-à-dire l'élimination de la coiffe à l'extrémité 5', suivie par la dégradation 5' → 3' effectuée par des exoribonucléases à activité 5' vers 3' (Franks and Lykke-Andersen, 2008) (*Figure 18*).

Souvent effectuée après la déadénylation, mais pas toujours, vient le décoiffage qui peut être pris en charge par différentes protéines. Une des premières protéines à avoir été identifiées initialement chez la levure est DCP2 (*decapping enzyme 2*) et son activité est régulée par son interaction avec la protéine DCP1. Ces dernières années, d'autres enzymes ont été découvertes ayant le même rôle que DCP2, comme l'enzyme Nudt16 ou l'enzyme Nudt13, toutes les trois appartenant à la même famille de protéines. Ces trois enzymes sont des Nudix hydrolases, pour *Nucleoside Diphosphate linked to a variable moiety X*, possédant une activité pyrophosphohydrolase permettant la coupure de la coiffe, et donc le *decapping*. Il semblerait néanmoins que les protéines Nudt16 et Nudt13 soient spécifiques à certains ARNm et à certaines conditions (Kramer and McLennan, 2019).

Afin de permettre l'activité catalytique de DCP2 et permettre ainsi le clivage de la liaison pyrophosphate entre le premier nucléotide de l'ARNm et la coiffe, DCP2 doit être sous forme hétérodimérique avec son cofacteur DCP1. La protéine DCP1 présente deux isoformes, DCP1a et DCP1b, capables d'interagir indifféremment avec DCP2. Du fait de sa faible activité intrinsèque, le complexe DCP2-DCP1 nécessite l'aide de facteurs accessoires comme le complexe promoteur du décoiffage LSM1-LSM7 (*Sm-like protein 1- 7*). Ce dernier se fixe au niveau de l'extrémité 3' des ARNm déadénylés, entraînant ainsi le



décoiffage par le complexe DCP2-DCP1 et le recrutement de la protéine, Pat1 (Charenton and Graille, 2018).

L'interaction entre les complexes LSM1-LSM7 et DCP2-DCP1 entraîne un changement de la conformation de la protéine DCP2, en stimulant ainsi son activité catalytique Nudix/MufT. Cette activité permet le clivage successif de la coiffe en libérant du m7GDP, en laissant une extrémité phosphate libre pour la dégradation par exoribonucléases (van Dijk et al., 2002). Le complexe LSM1-LSM7 n'est pas le seul à favoriser le decapping. En effet, le complexe DCP2-DCP1 peut être aussi stimulé par des *enhancers* du décoiffage, c'est-à-dire les protéines Edc comme Edc1 et Edc3 (*Enhancer of Decapping*) (Franks and Lykke-Andersen, 2008), ou par d'autres protéines comme Dhh1 (Fischer, 2002).

Chez les mammifères, la coiffe m7GDP retirée est hydrolysée en m7GMP par l'enzyme DCPS (*Scavenger Decapping enzyme*), qui agit en combinaison avec la protéine FHIT (*Fragile histidine triad*) (Wang and Kiledjian, 2001). De plus, l'enzyme DCPS est capable d'hydrolyser des fragments d'ARNm qui sont initialement dirigés vers la voie de dégradation 3' → 5', donc déadénylés, et qui contiennent un ARN coiffé n'excédant pas les 10 nucléotides (Milac et al., 2014).

Lorsque la coiffe est clivée, l'ARNm possédant alors une extrémité libre, est dégradé par son extrémité 5' libre suite à l'intervention des exoribonucléases XRN, soit XRN1 soit XRN2. Ces enzymes reconnaissent le phosphate libre et dégradent l'ARNm d'une manière processive. La famille des protéines XRN est composée d'enzymes nucléaires comme XRN2, appelée aussi RAT1 chez la levure et XRN3, et d'enzymes cytoplasmiques comme XRN1, appelée aussi PACMAN ou XRN4 (Nagarajan et al., 2013). Selon le compartiment où se situe l'ARNm décoiffé, les protéines exoribonucléases seront différentes, donc dans le cytoplasme la dégradation sera effectuée par XRN1 et dans le noyau par XRN2. En outre, il a été démontré par co-immunoprécipitation que la protéine XRN2 peut se localiser dans le cytoplasme pour jouer un rôle dans le mécanisme de surveillance appelé *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) (Lejeune et al., 2003).

- Exoribonucléases

L'événement de déadénylation conduit à une dégradation privilégiée de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5' par des exoribonucléases, plus précisément l'exosome. Cette voie de dégradation peut être effectuée aussi bien dans le noyau qu'au niveau du cytoplasme. De plus, l'ARNm dégradé par son extrémité 3' par l'exosome peut ne pas subir d'autres étapes de la dégradation, c'est-à-dire que la phase de *decapping* peut ne pas être présente. L'exosome qui est un complexe majeur de dégradation des ARNm possède une structure assez particulière avec une polarité, où chaque protéine qui le compose a une fonction bien précise. Son cœur central, appelé aussi exo-9, est composé comme son nom l'indique de neuf protéines différentes qui forment une structure cylindrique. Ces neuf protéines sont donc disposées en un anneau

à deux couches, avec la couche inférieure formée de six sous-unités homologues à la RNase bactérienne PH (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 et Mtr3), tandis que la couche supérieure se compose de trois sous-unités de liaison à l'ARN qui est appelée aussi *cap* composée de Rrp4, Rrp40 et Csl4 (Chlebowski et al., 2013; Ogami et al., 2018).

Le cœur central à lui seul ne possède pas d'activité enzymatique mais lorsqu'il s'associe à des sous-unités actives possédant des fonctions endo et exonucléolytiques, il peut engendrer la dégradation vers l'extrémité 5' de l'ARNm. En effet, les deux sous-unités catalytiques sont Rrp6, appelée aussi PM/Scl-100 ou EXOSC10, et Dis3, connue aussi comme Rrp44 ou EXOSC11. La protéine Dis3 est une endonucléase, alors que Rrp6 est une exonucléase et chez la levure cette protéine joue un rôle dans la surveillance co-transcriptionnelle. Une autre exoribonucléase qui peut agir seule ou en collaboration avec l'exosome est la protéine DIS3L2 (Łabno et al., 2016b).

Les protéines Dis3 et Rrp6 ne sont pas les seules à interagir et à permettre l'activation de l'exosome et il existe différents facteurs additionnels qui interviennent dans le mécanisme de dégradation. Parmi ces facteurs, on retrouve l'hélicase à ARN appelée Mtr4 (chez les mammifères, cette protéine est connue aussi sous le nom de SKIV2L2, MTREX, ou HUGO), la protéine Rrp47 (ou C1D), et la protéine Mpp6. Ces facteurs sont nécessaires à l'activité maximale de l'exosome, comme Rrp47 qui interagit avec Rrp6 afin de créer une sorte de plateforme avec Mtr4. La protéine Mtr4 fait partie du complexe de polyadénylation non canonique TRAMP, composé donc des protéines Trf4, Air2 et Mtr4. Mtr4 interagit avec les protéines Dis3, Rrp6 et le cœur central de l'exosome exo-9, en formant le complexe appelé exo-11 (exo-9-Dis3-Rrp6). De plus, le complexe TRAMP est normalement impliqué dans la maturation des ARN ribosomiaux (ARNr), des petits ARN nucléaires (snRNA) et des ARN nucléolaires (snoRNA) (Chlebowski et al., 2013; Mitchell, 2014).

Comme dit précédemment, la dégradation peut se faire au niveau du noyau ou bien dans le cytoplasme. Pour cela, l'association et les interactions protéiques seront légèrement différentes. Par exemple, dans le noyau, l'exosome interagit principalement avec le complexe TRAMP. En revanche, au niveau du cytoplasme, la protéine Mtr4 est substituée par une hélicase qui est son homologue SKI2 (*Superkiller-2*). L'exo-9 associé à Dsi3 qui donne le complexe exo-10 interagit donc avec le complexe SKI formé des protéines SKI2 et SKI3 et deux protéines SKI8, à l'aide de la protéine SKI7. Ces interactions vont donc activer le processus de dégradation, en permettant ainsi à l'exosome de supprimer l'ARNm en question. Les protéines entre le noyau et le cytoplasme portent des noms différents mais leur activité et fonction restent exactement les mêmes (Chlebowski et al., 2013).

Pour ce qui concerne la voie de dégradation 5' → 3', d'autres exoribonucléases permettent l'élimination de l'ARNm, comme les protéines XRN1 et XRN2 dont nous avons déjà parlé dans la partie précédente. Ces dernières, peuvent avoir différents rôles dans la cellule en permettant le bon fonctionnement de l'organisme. En effet, chez la levure, il a été démontré que la protéine XRN2 soutient l'élongation des

télomères en dégradant les ARN contenant une répétition télomérique (TERRA), un ARNnc (*non-protein-coding RNAs*) qui réprime l'activité de la télomérase (Nagarajan et al., 2013).

- Endoribonucléases

Les voies de dégradation 5' → 3' et 3' → 5' où les exoribonucléases suppriment les ARNm au niveau des extrémités, ne sont pas les seules possibles. En effet, d'autres voies sont présentes comme la dégradation par clivage endonucléolytique. Les ARNm dirigés vers cette voie de dégradation sont coupés généralement en deux fragments : un qui possède la coiffe et une partie de l'ARNm avec l'extrémité 3' libre, et le deuxième avec la queue poly-A et l'ARN avec l'extrémité 5' libre. Le fragment coiffé est dégradé par l'exosome ou par l'exonucléase DIS3L2 avec une direction 3' → 5'. En revanche, le fragment porteur de la queue polyadénylée est dégradé par la voie 5' → 3' par deux exoribonucléases selon sa localisation, XRN2 dans le noyau ou bien XRN1 dans le cytoplasme (Schoenberg, 2011).

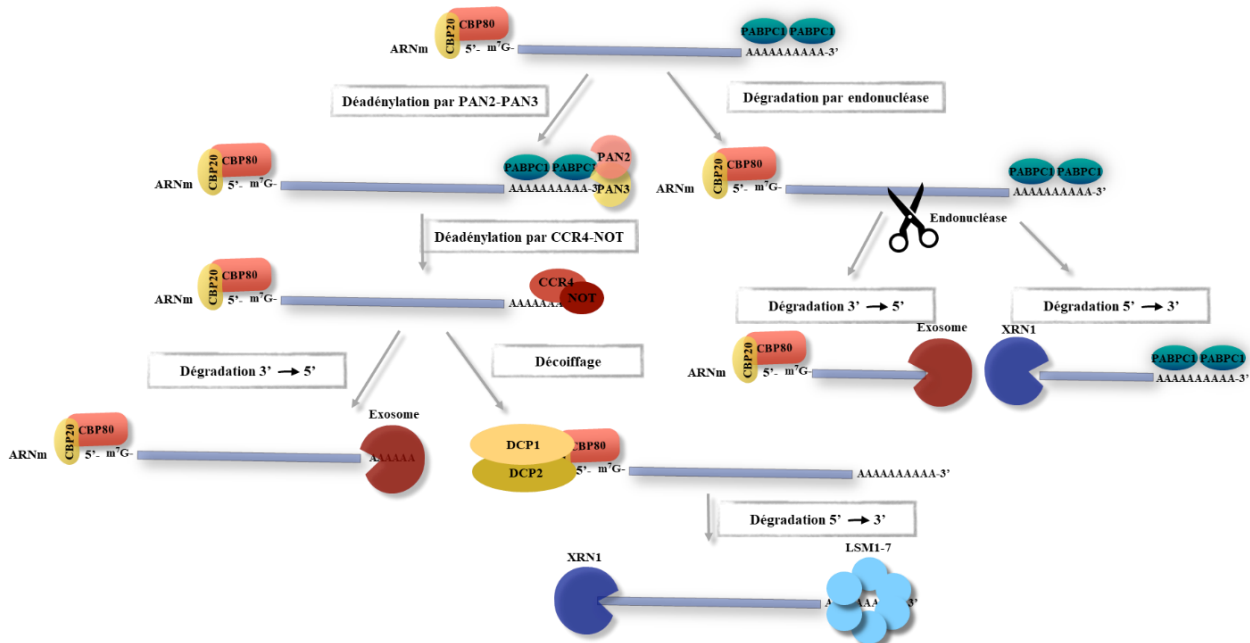


Figure 18 : Les différentes enzymes dans la dégradation des ARNm. Plusieurs voies de dégradation des ARNm sont représentées, telles que la dégradation de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5', ou bien la voie de dégradation par endonucléases.

Selon les ARNm en question, la localisation mais aussi la voie de dégradation, les endoribonucléases recrutées seront différentes. Malgré les bonnes connaissances que nous avons sur les exoribonucléases qui interviennent dans la dégradation des ARNm, les endoribonucléases ayant un rôle dans ces voies sont encore assez peu décrites dans le détail (Houseley and Tollervey, 2009; Schoenberg, 2011).

L'endonucléase la plus étudiée aujourd'hui est la protéine AGO2 (*Argonaute Protein-2*) faisant partie du complexe de régulation de l'expression génique RISC (RNA induced silencing complexe). Cette voie de dégradation est régulée par des siRNA (*small interfering RNA-siRNA*) qui reconnaissent les ARNm en question qui ont comme destin celui d'être supprimés. La protéine AGO2 reconnaît successivement ces ARNm où sont présents les siRNA et déclenche le clivage endonucléolytique (Liu, 2004).

Comme expliqué précédemment avec l'exposition de l'exosome, la protéine Dis3 (ou Rrp44) qui fait partie du complexe protéique est une endonucléase permettant la dégradation 3' → 5'.

Puis, une protéine dont je vais parler dans ma thèse est la protéine SMG6, qui fait partie du mécanisme du *Nonsense-mediated mRNA decay*, et qui permet de réguler la dégradation des ARNm porteurs d'un codon stop prématuré (Huntzinger et al., 2008; Schoenberg, 2011).

### 3) Mécanismes de surveillance des ARNm

Pour le bon fonctionnement des cellules, les protéines synthétisées doivent posséder l'information contenue dans le gène. Il est néanmoins possible que des erreurs surviennent lors de chaque étape. C'est pour cela que des mécanismes de surveillance sont présents, afin d'éviter que les erreurs soient maintenues et donnent ainsi des protéines aberrantes. Les mécanismes de contrôle-qualité permettent ainsi de corriger ces erreurs ou bien tout simplement de les éliminer en dégradant l'ARN. Tout au long des processus de synthèse, depuis la transcription, en continuant avec la maturation, l'export et la traduction, les systèmes de surveillance vérifient la présence de possibles erreurs à l'aide de *checkpoints*, où des protéines sont activées afin de monitorer les défaillances qui peuvent apparaître (Moraes, 2010; van Hoof and Wagner, 2011; Wagner and Lykke-Andersen, 2002).

Une première phase où peuvent apparaître des erreurs est au niveau de la transcription, où l'ADN est converti en ARN pré-messager, possédant normalement les informations nécessaires à la synthèse protéique. Après cette étape, un premier mécanisme de surveillance co-transcriptionnelle vérifie la conformité du transcrit et décide s'il est apte de procéder à la maturation en ARN messenger. Dans le cas contraire, l'exosome nucléaire s'active afin de permettre la dégradation de cet ARN aberrant (Bresson and Tollervey, 2018).

La maturation des ARNm est aussi une étape où des erreurs peuvent se produire. Par exemple, un dysfonctionnement au niveau de la coiffe avec une méthylation qui n'a pas eu lieu, est reconnu par un système de surveillance nucléaire. Celui-ci entraîne un clivage de la coiffe afin de rétablir une extrémité 5'-monophosphate et pouvoir être corrigée, ou bien tout simplement une exonucléase se charge de dégrader l'ARNm en question (Moraes, 2010).

Au niveau de l'épissage, si cette étape n'est pas correctement réalisée, les systèmes de surveillance s'activent, en évitant surtout l'export de l'ARNm et aussi une dépense énergétique pour l'obtention de la protéine qui serait inutile. L'ARNm peut être incomplètement épissé et ainsi retenir encore des introns, ou être complètement non épissé. Dans ces situations, chez la levure les protéines Mlp1 et Mlp2 et chez les mammifères les protéines TPR reconnaissent les ARN en activant les voies de dégradation. Galy et al. ont démontré que la création de mutants Mlp1 entraînent le déplacement vers le cytoplasme d'ARNm non épissés, nous indiquant que la protéine Mlp1 est indispensable au mécanisme de contrôle-qualité (Galy et al., 2004). De plus, des interactions entre Mlp et Rrp6, co-facteur de l'exosome nucléaire, ont été identifiées, donnant une preuve supplémentaire que Mlp recrute l'exosome nucléaire, et retient l'ARN mal épissé dans le noyau.

Un autre événement qui peut induire l'activation de la dégradation est la polyadénylation où la queue poly-A peut avoir une longueur anormale, ou bien absente. La polyadénylation peut aussi arriver prématurément à des sites cryptiques (Ozsolak et al., 2010). De plus, si un ARNm n'est pas exporté ni dégradé, sa queue poly-A pourra être allongée ultérieurement, permettant le recrutement des systèmes de dégradation.

Puis, le processus de l'export est lui aussi contrôlé et le pore nucléaire agit alors comme point de surveillance afin d'éviter que l'ARNm soit exporté vers le cytoplasme s'il n'est pas correctement maturé. Dans le noyau sont ainsi présentes les premières phases où chaque étape est vérifiée et le problème résolu avec la dégradation par des exosomes nucléaires (Hieronymus, 2004).

Des systèmes de surveillance sont ensuite activés dans le cytoplasme afin de poursuivre l'analyse qualité de l'ARNm. Selon le type de mutation et d'aberration présente sur la séquence d'ARN mature, le système activé sera différent. Les mécanismes de surveillance cytoplasmique sont le *Non-Stop decay* (NSD), le *No-Go decay* (NGD) et le *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Certaines enzymes intervenant dans les voies de dégradation canoniques voient leur implication dans certains processus de dégradation pour ARNm aberrants. De façon intéressante, ces mécanismes cytoplasmiques sont reliés à l'événement de traduction en protéine.

Le *No-Go decay* ou NGD, a été décrit pour la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Doma and Parker, 2006). Ce système de surveillance mais aussi de dégradation des ARNm reconnaît des ARNm porteurs de structures secondaires, comme des *hairpins* ou des boucles avec un encombrement stérique et/ou une stabilité importante. La présence de ces pseudo-noeuds (*pseudoknots*) ou la répétition de codons rares, induit l'activation du NGD avec le recrutement des protéines Dom34p et Hbs1p, similaires aux facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3. Ces deux protéines du NGD permettent la dissociation de la machine traductionnelle en interagissant probablement avec le site A du ribosome. Une endonucléase intervient alors afin de produire deux fragments avec des extrémités

libres pouvant être dégradées par la voie 3'→5' et 5'→3', par l'exosome ou bien par la protéine XRN1 (Harigaya and Parker, 2010).

Un ARNm ne possédant aucun codon stop d'arrêt de la traduction est lui reconnu et dégradé par le *Non-Stop decay* (NSD). Sans signal de terminaison, le ribosome reste bloqué au niveau de l'extrémité 3' de l'ARNm en entraînant un arrêt de la synthèse protéique, ainsi qu'une dégradation de l'ARNm en question. Chez la levure, le NSD voit intervenir la protéine SKI7, l'exosome et le complexe SKI. La protéine SKI7, et plus précisément son domaine C-terminal a la particularité de mimer la structure GTPase du facteur d'élongation de la traduction eEF1A ainsi que du facteur de terminaison eRF3. Elle peut donc reconnaître le site A du ribosome. En revanche, son domaine N-terminal permet le recrutement de l'exosome et du complexe SKI, afin de déclencher la dégradation (Arribere and Fire, 2018).

En présence d'un ARNm porteur d'un codon stop prématuré, appelé aussi PTC (*premature termination codon*), le système de surveillance activé est le *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) dont je vais me focaliser tout le long de ma thèse. Les PTC peuvent apparaître après des événements d'épissage alternatif, des mutations entraînant des décalages du cadre de lecture, ou bien tout simplement des mutations non-sens. Selon certaines règles que doit suivre la cellule et les caractéristiques de l'ARNm, le NMD sera activé afin d'éviter la synthèse d'une protéine qui serait tronquée. Si produite, la protéine tronquée pourrait soit garder une partie de sa fonctionnalité si par exemple le PTC est assez proche du codon stop physiologique, soit être non fonctionnelle ou avoir une fonction différente de la protéine sauvage, ou encore être cytotoxique en cas d'aggrégation par exemple (van Leeuwen et al., 1998). Elle pourrait aussi entraîner une perte de fonction par effet de dose. L'effet de ces mutations dépend aussi du gène dans lequel on les retrouve et ces erreurs peuvent être délétères (Hall and Thein, 1994). Le NMD se charge ainsi d'éviter l'apparition d'une protéine avec ces caractéristiques, en dégradant l'ARNm et permettre le bon fonctionnement cellulaire. Non seulement le NMD intervient comme contrôle-qualité, mais il permet aussi la régulation de l'expression de certains ARNm physiologiques (Frischmeyer, 1999). Ce système de surveillance et contrôle-qualité sera détaillé dans le chapitre suivant.

### III. Le *Nonsense-mediated mRNA decay* (NMD)

#### 1) Les protéines du NMD : les acteurs du mécanisme de dégradation des ARNm porteurs de codons stop prématurés

Le mécanisme de *Nonsense-mediated mRNA decay* (ou NMD) fait partie des différents contrôle-qualités des ARNm permettant d'éviter la synthèse de protéines tronquées et/ou non fonctionnelles. Ce processus de dégradation a été retrouvé dans tous les organismes eucaryotes étudiés avec des particularités d'une espèce à l'autre. Par ailleurs, le NMD permet de réguler environ 5% du génome humain et entre 10 et 20% de l'expression génique chez d'autres espèces comme la drosophile ou la Levure *Saccharomyces Cerevisiae* (Conti and Izaurralde, 2005).

Nous connaissons aujourd'hui une vingtaine de protéines jouant un rôle dans le NMD, dont les principaux acteurs sont les protéines *up-frameshift* (UPF) et les protéines SMG, pour *suppressor with morphological effect on genitalia*. Ces protéines interagissent avec diverses protéines comme la protéine PABPC1 ou le complexe protéique *Exon Junction Complex* (EJC) (Kurosaki and Maquat, 2016a).

Les premiers facteurs du NMD nommés UPF1, UPF2 et UPF3 ont été identifiées pour la première fois chez la levure *Saccharomyces Cerevisiae* à l'aide d'un criblage génétique (Cui et al., 1995; He et al., 1997; Leeds et al., 1991). Les protéines SMG quant à elles ont été identifiées chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Hodgkin et al., 1989; Pulak and Anderson, 1993).

Les structures ainsi que les rôles des protéines impliquées dans le NMD vont être détaillés dans les paragraphes ci-dessous.

- Les protéines UPF

- a) La protéine UPF1

La protéine UPF1, appelée aussi RENT1 (*regulator of nonsense transcript 1*), représente un des facteurs centraux du NMD en raison de sa fonction d'activateur du NMD, mais aussi pour son implication dans la reconnaissance de l'ARNm cible et de sa dégradation. La protéine UPF1 est codée par le gène UPF1 situé sur le chromosome 19.

Elle fait partie de la super famille 1 (SF1) des hélicases à ADN et ARN. Les hélicases sont des enzymes à activité ATPase qui permettent le déroulement des doubles brins d'ADN ou d'ARN, nécessaire par exemple lors de la lecture de la séquence d'ARN par le ribosome. En effet, la protéine UPF1 possède

ces fonctions hélicase 3'-5' et ATPase ARN dépendante. Ces deux rôles sont fondamentaux et requis pour le NMD (Gowravaram et al., 2018; Kim and Maquat, 2019; Weng et al., 1996).

Au niveau structural, le facteur UPF1 est composé de trois domaines spécifiques et conservés. Le premier domaine situé à l'extrémité N-terminale de la protéine est un domaine en doigt de zinc riche en cystéine et histidine, appelé domaine CH (Czaplinski et al., 1998; He and Jacobson, 1995). Il a été démontré que cette région CH interagit avec la protéine UPF2 ainsi que les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3 pour former le complexe SURF (*SMG1/8/9-UPF1- eRF1 and eRF3 complex*) (Kashima et al., 2006) (Figure 19).

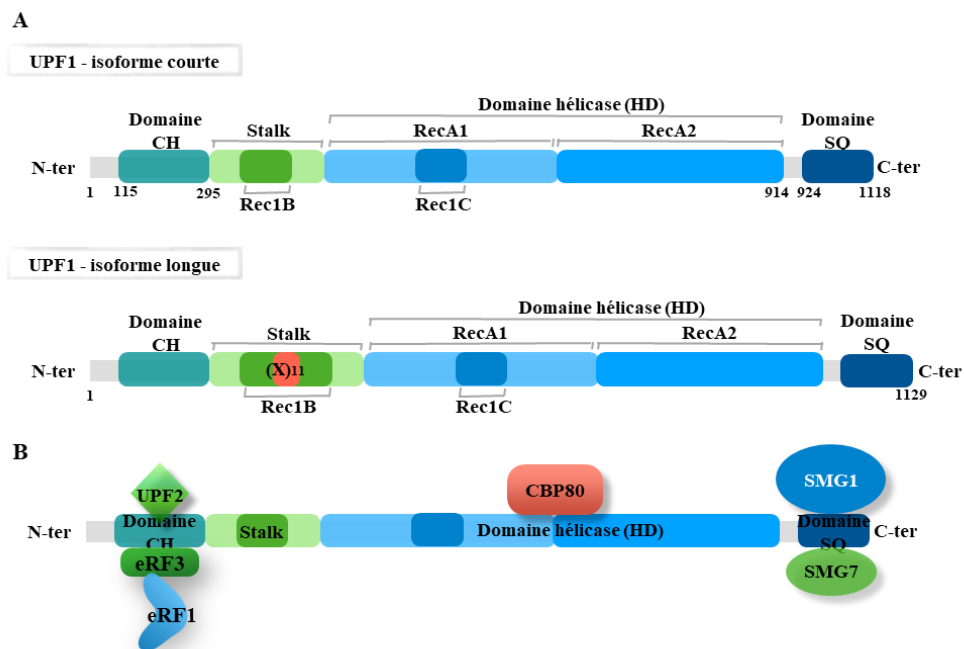


Figure 19 : Représentation de la protéine UPF1. **A.** Structure des deux isoformes d'UPF1 avec les trois domaines principaux qui sont le domaine CH, le domaine HD et le domaine SQ. **B.** Interactions entre la protéine UPF1 et les protéines impliquées dans le NMD.

Le deuxième domaine fonctionnel dans la séquence protéique de UPF1 correspond à un domaine ATPase/hélicase, nommé domaine HD pour *Helicase Domain*. Le domaine HD est lui-même composé de deux sous-domaines appelés RecA1 et RecA2, intercalés par deux autres sous-domaines appelés Rec1B et Rec1C. Les domaines RecA permettent la formation d'une poche d'interaction des nucléotides pour pouvoir ainsi interagir avec une molécule d'ARNm (Appelquist et al., 1997; Cheng et al., 2007; Leeds et al., 1991).

Le dernier domaine de UPF1 est un domaine riche en sérine-glutamine à l'extrémité C-terminale, appelé domaine SQ. Lorsque le NMD doit être activé afin de dégrader un ARNm soumis au NMD, la protéine UPF1 utilise son activité catalytique pour remodeler les mRNPs contenant un PTC. Le domaine SQ



interagit avec le cœur de l'hélicase entraînant l'inhibition de l'activité catalytique de la protéine UPF1. Cela peut être probablement dû au maintien du domaine hélicase dans un stade de « faible interaction » avec la molécule d'ARNm, ou bien au changement de conformation associé à l'interaction avec l'ATP (Gowravaram et al., 2018). Les deux domaines CH et SQ qui entourent ainsi le domaine HD ont la capacité de réguler le domaine hélicase selon les besoins.

La protéine UPF1 présente deux isoformes produites par épissage alternatif, exprimées de façon différente (Gowravaram et al., 2018). La première isoforme est composée de 1129 acides aminés avec un poids moléculaire de 124 kDa. Elle contient une insertion dans le domaine Rec1B conduisant à une extension de 22 résidus dans sa boucle de régulation (*Figure 19*). Aujourd'hui, nous avons peu d'information sur l'activité catalytique de cette isoforme.

La deuxième isoforme est composée de 1118 acides aminés et un poids moléculaire de 123 kDa. Sa boucle de régulation est formée de 11 résidus seulement. Cette isoforme est majoritaire et la plus étudiée (Gowravaram et al., 2018; Nicholson et al., 2014).

Les deux isoformes de la protéine UPF1 semblent différer dans leur activité de liaison à l'ARN mais aussi leur activité catalytique. Comme montré par Gowravaram et al., les différences fonctionnelles entre les deux isoformes UPF1 peuvent être attribuées aux résidus supplémentaires dans l'isoforme longue qui modifie la conformation de la boucle régulatrice par rapport à celle de l'isoforme plus courte (Gowravaram et al., 2018).

L'activité ATPase de UPF1 est, elle aussi, essentielle au NMD. En effet, des mutations ciblant les acides aminés nécessaires à la capacité d'UPF1 à hydrolyser l'ATP entraînent une perte de l'activation du NMD (Weng et al., 1998, 1996). L'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP permet à UPF1, à l'aide de UPF2, d'activer son domaine hélicase et de dérouler le double brin d'ARN (dsRNA) et/ou d'altérer les interactions présentes sur la molécule d'ARN avec les protéines (Chakrabarti et al., 2011; Chamieh et al., 2008; Cheng et al., 2007; Imamachi et al., 2012). En outre, il a été constaté que l'activité ATPase est nécessaire dans les dernières étapes lorsque l'ARN doit être dégradé et les protéines du NMD recyclées (Franks et al., 2010). Franks et ses collègues ont démontré que l'absence de l'activité ATPase pouvait induire une accumulation des facteurs du NMD dans des foyers cytoplasmiques appelés *P-bodies* (*Processing bodies*). La description et la fonction des *P-bodies* seront décrites ultérieurement.

La localisation de la protéine UPF1 est principalement cytoplasmique où elle peut prendre part au mécanisme du NMD, mais une petite fraction est aussi retrouvée dans le noyau où la protéine va jouer un rôle supplémentaire (Azzalin and Lingner, 2006a, 2006b). Il a été observé que dans certains cas, comme pour les formes mutantes du domaine ATPase de UPF1 ou bien les formes hyperphosphorylées, UPF1 est retrouvée accumulée dans les *P-bodies* (Durand et al., 2007; Franks et al., 2010; Unterholzner and Izaurralde, 2004). Les *P-bodies* sont des foyers cytoplasmiques dont leur fonction est controversée,

mais une possibilité est qu'ils puissent être utile comme forme de stockage des facteurs du NMD, lorsque la cellule n'a pas besoin du NMD.

Il est maintenant connu que la protéine UPF1 doit être phosphorylée et déphosphorylée afin d'être le signal déclencheur du NMD. En effet, UPF1 est une phosphoprotéine, pouvant être phosphorylée sur de multiples résidus aux extrémités N et C-terminales. Les cycles de phosphorylation et déphosphorylation sont effectués par la protéine kinase SMG1, la seule kinase identifiée aujourd'hui pour la phosphorylation de UPF1, et la protéine phosphatase PP2A qui elle, déphosphoryle UPF1 (Yamashita et al., 2001).

*In vitro*, il a été démontré que les sites phosphorylés à l'extrémité C-terminale sont les sérines Ser1073, Ser1078, Ser1096 et Ser1116 (Okada-Katsuhata et al., 2012). *In vivo*, seul le site Ser1073 n'a pas été retrouvé sinon les trois autres sites ont bien été validés. Par ailleurs, la thréonine Thr28 à l'extrémité N-terminale a été montrée phosphorylée uniquement *in vivo* (Matsuoka et al., 2007; Ohnishi et al., 2003; Okada-Katsuhata et al., 2012; Yamashita et al., 2001). Le rôle exact de cette phosphorylation reste encore assez obscure mais la phosphorylation de la sérine Ser1116 semble être un site de liaison pour les protéines SMG5 et SMG6 (Chakrabarti et al., 2014).

Comme déjà énoncé précédemment, UPF1 joue un rôle central dans le NMD que nous décrivons de façon approfondie dans un deuxième temps. La protéine UPF1 par ailleurs, est impliquée dans différents mécanismes, comme le maintien de la longueur des télomères, la réplication de l'ADN, la régulation de la traduction des ARNm codant pour les histones ou encore le *Staufen 1* (STAU1)-*mediated mRNA decay* (SMD) ou autres (Azzalin and Lingner, 2006a, 2006b; Jia et al., 2015; Kim and Maquat, 2019; Popp and Maquat, 2015a).

#### b) La protéine UPF2

La protéine UPF2 est une protéine de 1272 acides aminés et un poids moléculaire de 150 kDa, codée par le gène UPF2 situé sur le chromosome 10. Sa localisation est majoritairement cytoplasmique où elle se concentre dans la région périnucléaire (Lykke-Andersen et al., 2000; Tatsuno et al., 2016).

La protéine UPF2 est composée de 3 domaines conservés, appelés MIF4G (MIF4G-I, MIF4G-II et MIF4G-III) pour *Middle portion of eIF4G*, nommés ainsi pour leur similarité avec le domaine central du facteur eIF4G (*eukaryotic translation initiation factor 4G*) (Mendell et al., 2000). Ces domaines confèrent à la protéine UPF2 la capacité d'interagir avec une série de protéines, telles que UPF3 et UPF3X via le troisième domaine MIF4G, mais aussi avec des facteurs d'initiation de la traduction tels que eIF4A et eIF3.

Clerici et al. ont démontré que l'absence du premier et du deuxième domaine MIF4G entraîne une inactivation du NMD, indiquant l'importance de la protéine UPF2 dans le processus de dégradation des ARNm par NMD (Clerici et al., 2014) (*Figure 20*).

Une interaction directe entre UPF2 et eRF3 ainsi que le complexe SURF a été démontrée, montrant que UPF2 interagit non seulement avec les facteurs d'initiation mais aussi avec les facteurs de terminaison de la traduction (López-Perrote et al., 2016). Cela montre l'importance de la traduction dans le mécanisme du NMD. Ce complexe UPF2-eRF3 qui se forme fournit une voie alternative pour recruter UPF2 sur le ribosome, modèle différent de celui où UPF2 forme le complexe avec UPF3X et l'EJC pour stimuler la phosphorylation de UPF1. Les modèles d'activation du NMD vont être décrits de façon détaillée dans la partie 2 de ce chapitre.



*Figure 20* : Schéma de la structure d'UPF2. Les trois domaines MIF4G sont représentés, suivis du domaine U1BD qui interagit avec la protéine UPF1. Certaines interactions protéiques sont indiquées.

Un autre domaine présent dans la protéine UPF2 est le domaine U1BD (*UPF1 binding domain*) à l'extrémité C-terminale, et permet l'interaction avec le domaine CH de la protéine UPF1. Comme évoqué précédemment, le troisième domaine MIF4G de UPF2 interagit avec la protéine UPF3X, en devenant ainsi une connexion entre UPF1 et UPF3X. Ce lien protéique est fondamental pour l'activation du NMD. En effet, Melero et al. ont démontré par cryo-electromicroscopie du complexe UPF1/UPF2/UPF3X et l'EJC que UPF2 forme les contacts cruciaux avec UPF1, UPF3X et l'EJC, en positionnant la protéine UPF1 de façon à permettre son activité hélicase (Melero et al., 2012).

Gehring et al. ont en revanche démontré qu'il existe deux voies d'activation du NMD par rapport à la protéine UPF2: une voie UPF2-dépendante et une voie UPF2-indépendante, dont la seule différence est la fonction et le rôle de l'EJC. En effet, la protéine RNPS1 qui est un composant du complexe EJC joue un rôle dans l'activation du NMD UPF2-dépendante, alors que ce sont les protéines Y14, MAGOH et eIF4A3 qui rejoignent la voie d'activation UPF2-indépendante du NMD (Gehring et al., 2005).

Comme UPF1, la protéine UPF2 est une phosphoprotéine mais contrairement à UPF1, sa kinase n'a pas été identifiée (Chiu et al., 2003; Wang et al., 2006). En 2014, Clerici et al. ont décrit une possible interaction avec la protéine kinase SMG1, pouvant ainsi phosphoryler UPF2 et UPF1 en même temps sans compétition entre elles (Clerici et al., 2014). *In vitro*, il a été démontré que le troisième domaine MIF4G de UPF2 est phosphorylé par la kinase SMG1. La combinaison de la spectrométrie de masse et

d'analyses *in vitro* ont permis d'identifier trois sites de phosphorylation. Les sérines phosphorylées sont Ser886, Ser992 et Ser1046 mais seulement la dernière peut être quantifiée. Les résultats *in vivo* ont indiqués qu'UPF2 se lie à la kinase SMG1 de manière indépendante à l'activité de UPF1, et qu'inversement, la protéine UPF1 interagit avec SMG1 indépendamment de UPF2 mais aucune preuve confirme la phosphorylation d'UPF2 par SMG1 (Kashima et al., 2006).

Toutefois, l'importance de la phosphorylation de UPF2 dans le NMD a été prouvée uniquement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Wang et al., 2006). Tout d'abord, il faut savoir que la levure est privée d'EJC, plus précisément du complexe déposé lors de l'épissage au niveau de chaque jonction exonique. Afin de comprendre le mécanisme qui déclenche la dégradation par NMD, un nouveau type de reconnaissance des PTC chez la levure a été proposé avec la découverte d'une séquence particulière appelée DSE (*downstream sequence element*). Cette séquence DSE mime en quelque sorte l'EJC présent chez les mammifères. Il a été démontré que la protéine UPF2 interviendrait dans l'activation du NMD chez la levure avec la phosphorylation des sérines Ser32 et Ser33 dans le premier domaine MIF4G (Wang et al., 2006). En effet, ces sites phosphorylés pourraient permettre l'interaction avec certaines protéines liant l'ARNm, comme la protéine Hrp1 (González et al., 2000). Le positionnement de la protéine Hrp1 sur la séquence DSE serait ainsi le signal pour la dégradation de l'ARNm.

Le rôle de UPF2 dans la réaction de NMD est encore assez mal défini chez les mammifères. Cependant, il a été montré que cette protéine régule le niveau de phosphorylation de UPF1. En effet, l'absence de UPF2 conduit à une forte diminution de l'état de phosphorylation de UPF1. UPF2 pourrait réguler la phosphorylation de UPF1 soit en contrôlant directement la kinase SMG1, en stabilisant UPF1 phosphorylée, soit en empêchant l'association de UPF1 avec le complexe de déphosphorylation (Wittmann et al., 2006).

Enfin, un autre point commun entre UPF1 et UPF2 est que ces deux protéines sont clivées pendant l'apoptose par les caspases 3 et 7 (Jia et al., 2015). Le clivage entraîne une inhibition du NMD causée par la perte de fonction des deux protéines UPF1 et UPF2. Notre laboratoire a aussi démontré qu'une surexpression du fragment N-terminal de la protéine UPF2 généré par les coupures par les caspases conduit à une amplification de l'apoptose (Jia et al., 2015).

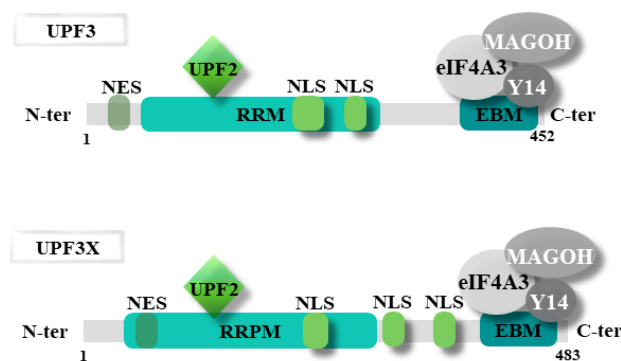
### c) Les protéines UPF3/UPF3X

La protéine UPF3 est le dernier facteur du NMD faisant partie des protéines *up-frameshift*. Chez les mammifères, il existe deux gènes UPF3 et UPF3X, codant pour les deux protéines UPF3 (ou UPF3A) et UPF3X (ou UPF3B). La première possède 452 acides aminés avec un poids moléculaire de 52 kDa, et son gène se situe sur le chromosome 13. La deuxième, nommée UPF3X, possède 483 acides aminés

avec un poids moléculaire de 58 kDa, et son gène se localise sur le chromosome X (Serin et al., 2001). Les deux gènes sont donc paralogues, provenant d'un événement de duplication du génome.

Les deux protéines contiennent un domaine similaire à un motif de reconnaissance de l'ARN dans la région N-terminale, appelé RRM (*RNA Recognition Motif*) qui ne permet pas la liaison directe des protéines à l'ARN mais ce domaine est le site d'interaction avec UPF2. Cela est probablement dû à l'absence de résidus aromatiques nécessaires à cette interaction (Clerici et al., 2014; Kadlec et al., 2004).

Les protéines UPF3/UPF3X possèdent néanmoins deux types de séquences particulières que sont les séquences de localisation nucléaire NLS (*Nuclear Localisation Sequence*) en C-terminal et centrale, et une séquence d'export nucléaire NES (*Nuclear Export Sequence*) en N-terminal (Shirley et al., 2002, 1998). Ces séquences permettent aux protéines UPF3/UPF3X d'avoir une fonction de navette entre le noyau et le cytoplasme (Lykke-Andersen et al., 2000; Serin et al., 2001; Shirley et al., 2002, 1998). En effet, UPF3/UPF3X se localisent principalement dans le noyau où UPF3X pourra être recrutée sur l'ARNm par l'EJC via son domaine C-terminal appelé *EJC-binding motif* ou EBM. Ce dernier permet donc à UPF3X d'interagir avec les protéines de l'EJC comme Y14, MAGOH et eIF4A3 (Gehring et al., 2003; Melero et al., 2012). Plus récemment, il a été montré que la région N-terminale de la protéine UPF3X interagit avec le facteur de terminaison de la traduction eRF3 (Neu-Yilik et al., 2017) (*Figure 21*).



*Figure 21* : Structure des protéines UPF3/UPF3X et interactions protéiques.

Entre les deux protéines, la forme plus active dans le NMD est UPF3X (Chan et al., 2009; Lykke-Andersen et al., 2000).

Comme dit précédemment, UPF3X semble le premier facteur du NMD positionné sur la molécule d'ARNm, avant l'export du noyau vers le cytoplasme (Le Hir et al., 2001). Après l'export de la mRNP, UPF3X recrute UPF2 avec l'EJC et la protéine UPF1 sera ensuite recrutée afin de permettre l'activation du NMD. *In vitro*, Franks et al. ont démontré que UPF2 et UPF3X stimulent l'activité hélicase de la protéine UPF1, déclenchant ainsi le mécanisme du NMD (Franks et al., 2010). Le mécanisme sera détaillé dans la partie 2 de ce chapitre.

Le mécanisme du NMD où UPF3/UPF3X jouent un rôle ne semble pas le seul mécanisme existant. En effet, pour certains ARNm comme pour les récepteurs aux cellules T, il pourrait y avoir une activation du NMD UPF3-indépendante, puisque l'absence des protéines UPF3/UPF3X n'a pas de conséquences sur le NMD (Avery et al., 2011; Chan et al., 2007).

- Les protéines SMG

Pour l'activation et la régulation du NMD, les protéines *up-frameshift* ne sont pas les seules à intervenir. En effet, les protéines SMG (*suppressor with morphogenetic effects on Genitalia*) possèdent elles aussi des fonctions nécessaires au bon fonctionnement du processus de dégradation par NMD (Yamashita et al., 2009).

Il existe plusieurs protéines SMG dont celles-ci impliquées dans le NMD : SMG1, SMG5, SMG6, SMG7, SMG8 et SMG9. Les premières identifiées ont été les protéines SMG1, SMG5, SMG6 et SMG7 chez le ver *Caenorhabditis elegans*, et successivement les protéines SMG8 et SMG9 ont été découvertes, avec leur capacité à être des co-activateurs de la kinase SMG1 (Yamashita et al., 2009).

Les protéines SMG sont décrites ci-dessous, en montrant pour chacune leurs caractéristiques.

- a) La protéine SMG1, la principale kinase

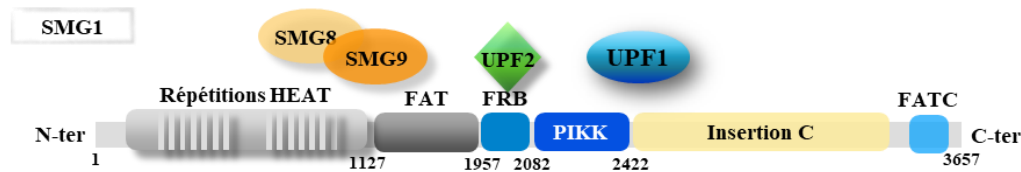
La protéine SMG1 est une sérine/thréonine kinase de la famille des *phosphatidyl-Inositol (PI) 3-kinase-related kinase* (PIKK), de poids moléculaire de 410 kDa. Son gène se situe sur le chromosome 16. Tous les membres de la famille des PIKK sont impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN (Abraham, 2004a).

La kinase SMG1 est organisée en plusieurs domaines, possédant tous une fonction particulière. Elle peut être divisée en deux grandes structures : la structure appelée *Arm* pour bras en étant mobile, qui permet les interactions protéiques avec le dimère SMG8-SMG9 ; et la structure globulaire appelée *Head* pour tête contenant la région catalytique de la protéine et pouvant interagir avec UPF2 et UPF1.

La structure *Arm* à l'extrémité N-terminale contient les répétitions d'alpha-hélices HEAT (Huntington, EF3A, ATM, TOR) (Andrade and Bork, 1995; Arias-Palomo et al., 2011) qui lui confèrent la capacité à interagir avec les protéines SMG8 et SMG9 afin de former le complexe SMG1C. SMG8 et SMG9 régulent l'activité kinase de la protéine SMG1, en lui permettant un changement de conformation qui la maintient dans un stade inactif (Arias-Palomo et al., 2011; Yamashita et al., 2009).

On retrouve dans la structure *Head* le domaine FAT (FRAP, ATM, and TRRAP) formé de répétitions hélicoïdales, suivi par le domaine FRB (*FKBP12-rapamycin-binding*) de 100 acides aminés (Yang et

al., 2013), puis de la région catalytique homologue à la kinase PIKK et, pour terminer, d'un petit domaine  $\alpha$ -hélicoïdale FATC en C-terminal (*FAT C-terminal*) (Arias-Palomo et al., 2011). Entre la région catalytique PIKK et la région FATC se situe une séquence d'insertion nommée domaine *C-insertion* dont sa fonction reste inconnue (*Figure 22*).



*Figure 22* : Domaines présents dans la protéine kinase SMG1 et interactions protéiques

Le domaine FRB semblerait être dans un premier temps le domaine où il y a interaction avec la protéine UPF2 (Melero et al., 2014). Lorsque le dimère SMG8-SMG9 garde la kinase SMG1 sous une forme inactive, la protéine UPF2 qui interagit avec SMG1 par son troisième domaine MIF4G va entraîner une activation de l'activité kinase de SMG1. En effet, lorsque UPF1 sera liée à SMG1, il y aura consécutivement la phosphorylation par le domaine PIKK et l'activation des activités ATPase/hélicase de UPF1 (Melero et al., 2014).

De plus, il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome et la répression génique de SMG1 causent une accumulation des facteurs UPF1 et UPF2 dans les cellules suggérant une régulation de l'expression de ces deux protéines par SMG1 (Zhao et al., 2014).

La phosphorylation de UPF1 par SMG1 apparaît au niveau du motif SQ dans la partie N-terminale sur la thréonine T28 (démontrée uniquement *in vivo*) et dans la partie C-terminale sur les sérines S1078, S1096 et S1116 (Okada-Katsuhata et al., 2012).

Comme pour UPF1, la protéine SMG1 est elle aussi capable d'intervenir dans le mécanisme de *Staufen mediated mRNA decay* (SMD) qui permet la dégradation spécifique de certains ARNm, après reconnaissance d'une structure secondaire de type tige-boucle dans la partie 3'UTR des ARNm par la protéine *Staufen* (Park and Maquat, 2013). SMG1 n'est pas uniquement impliquée dans les mécanismes de dégradation des ARNm, mais possède des fonctions supplémentaires, comme permettre l'inhibition de l'apoptose induite par le *tumor necrosis factor alpha* (Masse et al., 2008). Un autre rôle de SMG1 a été observé dans la réponse au stress génotoxique, c'est-à-dire lorsque les cellules subissent un stress dû aux radiations UV. Après l'induction de ce stress, SMG1 peut être activée et interagir avec la protéine p53 (Brumbaugh et al., 2004). Enfin, SMG1 semble aussi avoir une activité lors de la croissance cellulaire et de l'expression de certains gènes (Abraham, 2004b, 2001).

La protéine SMG1 représente la seule kinase identifiée aujourd'hui permettant de phosphoryler UPF1. Néanmoins, il est fort probable que d'autres kinases puissent avoir la même fonction afin de permettre l'activation du NMD.

b) Les protéines SMG5, SMG6 et SMG7

Le facteur SMG5 est une protéine de 114 kDa, codé par le gène SMG5 sur le chromosome 1. SMG6 possède un poids moléculaire plus important, de 160 kDa et elle est transcrite à partir du gène SMG6 sur le chromosome 17. La protéine SMG7 quant à elle, codée par le gène SMG7 sur le chromosome 1 est une protéine de 127 kDa.

Un premier domaine présent uniquement dans les protéines SMG5 et SMG6 est le domaine *Pi1T N-terminus domain* (PIN) à l'extrémité C-terminale (Fukuhara et al., 2005), domaine retrouvé aussi dans des protéines qui possèdent une activité ribonucléase (Schneider et al., 2009). Pour SMG5, ce domaine ne semble pas fonctionnel puisque la protéine ne présente pas d'activité endonucléolytique (Glavan et al., 2006). En revanche, pour la protéine SMG6, le domaine PIN est parfaitement fonctionnel permettant ainsi le clivage endonucléolytique de l'ARNm au voisinage du PTC pour former deux fragments où les extrémités 5' et 3' ne sont pas protégées (Eberle et al., 2009; Gatfield and Izaurralde, 2004; Huntzinger et al., 2008). L'ARNm est alors rapidement dégradé à partir des extrémités à l'aide des exoribonucléases XRN1 et XRN2 (Lejeune et al., 2003). De plus, la protéine SMG6 possède dans sa région N-terminale deux motifs EBM (*EJC binding motif*) qui permettent d'interagir avec le complexe EJC (Kashima et al., 2010) (*Figure 23*).

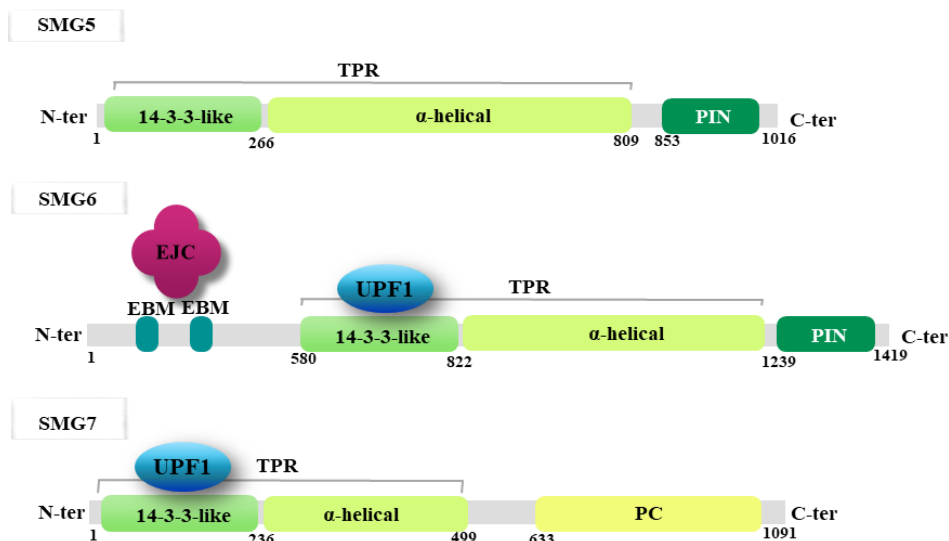


Figure 23 : Structure des protéines SMG5, SMG6 et SMG7 et interactions protéiques



Une autre fonction des protéines SMG5 et SMG6 est leur interaction avec le *human telomerase reverse transcriptase* (hTERT), jouant ainsi un rôle dans le maintien de la longueur des télomères (Reichenbach et al., 2003).

Les protéines SMG5, SMG6 et SMG7 présentent néanmoins des domaines communs entre elles, comme deux répétitions tétratricopeptide TPR à l'extrémité N-terminale pour SMG5 et 7 et centrale pour SMG6. Ces répétitions sont fondamentales afin de permettre certaines interactions protéiques. Un des motifs faisant partie du domaine TPR est une structure hélicoïdale à *hairpin*. L'autre motif TPR est celui de fixation des phosphosérines 14-3-3 présent dans les protéines SMG5 et SMG7 qui confère la possibilité d'interaction entre les deux protéines pour former un hétérodimère SMG5-SMG7 (Fukuhara et al., 2005). Ce dernier pourra ensuite lier la protéine UPF1 phosphorylée (Chakrabarti et al., 2014). En effet, il a été démontré qu'une mutation de ce domaine dans la protéine SMG7 ainsi qu'une mutation de la partie N-terminale de SMG5, entraînent une inhibition des interactions avec UPF1 *in vitro* (Ohnishi et al., 2003).

Le complexe SMG5, SMG6 et SMG7 participe à la déphosphorylation de UPF1 afin d'activer le NMD. En effet, UPF1 nécessite un cycle de phosphorylation et déphosphorylation successif pour qu'il y ait activation du NMD. Les trois protéines SMG ne possèdent pas d'activité phosphatase mais permettent d'agir comme adaptateurs entre UPF1 phosphorylée et la protéine phosphatase 2A (PP2A). De ce fait, elles ont été retrouvées en co-immunoprécipitation avec UPF1 et PP2A (Chiu et al., 2003; Ohnishi et al., 2003).

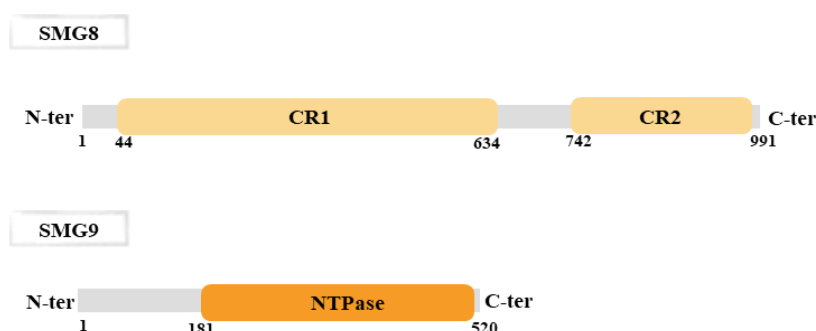
Une absence des protéines SMG5, SMG6 et SMG7 conduit à une accumulation de la protéine UPF1 hyperphosphorylée (Chiu et al., 2003). Il a été démontré que la protéine SMG6 peut se lier à UPF1 via le résidu thréonine Thr28 phosphorylé de UPF1 grâce à son domaine *14-3-3-like* (Okada-Katsuhata et al., 2012). De façon plus détaillée, la Thr28 représente un site de phosphorylation de UPF1 par la kinase SMG1 et la phosphorylation avec la Ser1096 de UPF1 permet de créer une plateforme d'ancrage pour les protéines SMG6 et le complexe SMG5-SMG7. Ainsi, la déphosphorylation de la protéine UPF1 pourra avoir lieu et le mécanisme de dégradation par NMD continuer.

Pour la protéine SMG7, le domaine TPR est suivi par une région *linker* et un domaine riche en proline, appelé PC, responsable de la dégradation des ARNm avec la stimulation du décoiffage et de la déadénylation. En effet, la protéine SMG7 peut avec ce domaine recruter le complexe déadénylase CCR4-NOT par interaction avec CNOT8 (*CCR4-NOT transcription Complex Subunit 8*) (Loh et al., 2013).

### c) Les protéines SMG8 et SMG9

La protéine SMG8 est codée par le gène SMG8 sur le chromosome 17, avec un poids moléculaire de 110 kDa. En revanche, la protéine SMG9 est plus petite, avec un poids moléculaire de 60 kDa et elle est codée par le gène SMG9 sur le chromosome 19 (Yamashita et al., 2009). Elles ont été identifiées avec une analyse d’empreinte de masse peptidique après co-immunoprécipitation de SMG1.

De structure différente, SMG8 possède deux domaines conservés, appelés CR1 et CR2 pour *Conserved region* avec des motifs à épingle à cheveux (Fernández et al., 2011; Shaheen et al., 2016). En revanche, SMG9 contient un domaine nucléoside triphosphatase NTPase dont la fonction n’a pas encore été élucidée. Cette protéine reste encore très peu caractérisée (Yamashita et al., 2009) (*Figure 24*).



*Figure 24* : Structure des protéines SMG8 et SMG9

Les deux protéines ont la capacité de former un dimère SMG8-SMG9 qui va ensuite interagir avec les domaines HEAT et *C-insertion* de la kinase SMG1. Le dimère SMG8-SMG9 avec la protéine SMG1 vont former le complexe SMG1C dans lequel l’activité kinase de SMG1 est inhibée (Li et al., 2017; Shaheen et al., 2016; Yamashita et al., 2009).

C’est bien cette liaison du dimère avec SMG1 qui modifie sa conformation protéique mais dès que la protéine UPF1 s’unie au complexe SMG1C, la kinase SMG1 acquiert à nouveau son activité kinase (Arias-Palomo et al., 2011; Deniaud et al., 2015). Après phosphorylation de UPF1, la protéine UPF2, ainsi que UPF3X et l’EJC, vont favoriser le détachement de UPF1 pour pouvoir interagir avec les phosphatases et continuer la dégradation de l’ARNm en question (Kashima et al., 2006; Yamashita et al., 2009).

Il a été démontré que SMG8 peut former des interactions avec SMG1 uniquement si SMG9 est présent. En effet, SMG9 permet de former une sorte de pont de communication entre les protéines SMG8 et SMG1.

## 2) Les mécanismes de reconnaissance d'un codon stop prématuré (PTC) et l'activation du NMD

Le NMD est un mécanisme de surveillance des ARN messagers finement régulé, conduisant au bon fonctionnement cellulaire. Il assure ainsi la dégradation des ARNm porteurs d'un codon stop prématuré afin de prévenir la synthèse d'une protéine tronquée. Les différents facteurs intervenant dans la régulation du NMD possèdent chacun une fonction propre, permettant de reconnaître fidèlement l'erreur mais aussi de différencier ces ARNm aberrants des ARNm sauvages.

Afin de comprendre comment le NMD reconnaît les ARNm porteurs d'un PTC et comment s'active ce mécanisme de dégradation, des études ont été menées depuis les années 80 et ont abouti à la proposition de deux modèles de reconnaissance des PTC et d'activation du NMD.

Le premier modèle s'appuie sur la présence du complexe protéique *Exon Junction Complex* (EJC) sur le transcrit. L'EJC a été montré pour être déposé lors de l'épissage et être impliqué dans le transport et la traduction. Cette voie d'activation est aussi connue comme la règle des 50 à 55 nucléotides ou le NMD EJC-dépendant. Au contraire, le deuxième modèle dépend de la protéine PABPC1, et plus précisément de la distance qui sépare cette protéine fixée sur la queue poly-A et le PTC (Metze et al., 2013; Popp and Maquat, 2013).

Les deux modèles possèdent des particularités que je vais développer. Ces deux mécanismes coexistent dans la cellule ce qui suggère qu'ils sont soit exclusifs de certains ARNm, soit qu'ils agissent de concert sur tous les ARNm mais d'une manière séquentielle.

- L'origine des codons stop prématurés (PTC)

Les codons stop prématurés ou *premature termination codon* (PTC) peuvent apparaître tout au long des événements liés à l'expression génétique. Certains événements constituent une source importante de PTC et d'autres contribuent très superficiellement à l'apparition de PTC (Lejeune and Maquat, 2005).

En effet, un PTC peut être introduit au niveau de l'ADN, avec la substitution d'un nucléotide entraînant l'apparition d'un des trois codons stop (mutation non-sens), ou bien par l'insertion ou la délétion de nucléotides provoquant un décalage du cadre de lecture. Ces types de mutations peuvent apparaître lors de la réplication de l'ADN, ou bien de la transcription de l'ADN en ARN pré-messager suite à des erreurs de l'ARN polymérase II (Lambert et al., 2020; Mendell et al., 2004). Néanmoins, ces mécanismes étant très fidèles, on assiste à des taux d'erreur très faibles, entre 0,05 à 0,5% concernant les erreurs de transcription (Muhlemann et al., 2008).

Les événements plus fréquents voyant comme conséquence l'introduction d'un PTC dans la séquence d'ARNm sont des événements liés à l'épissage mais aussi aux réarrangements génomiques de certains

loci. Concernant l'épissage alternatif, 33% des isoformes d'ARNm obtenues par épissage alternatif sont dégradées par NMD du fait de la présence d'un PTC. En effet, les séquences introniques sont très riches en codons stop dans les trois cadres de lecture ce qui entraîne très rapidement l'apparition d'un PTC lorsqu'une séquence intronique est conservée dans un ARNm. De même, un saut d'exon partiel ou total peut lui aussi engendrer l'introduction d'un PTC en induisant un décalage du cadre de lecture (Lejeune and Maquat, 2005).

L'autre source importante de PTC dans les séquences d'ARNm est très spécifique à certains gènes codant les récepteurs aux cellules T ou les immunoglobulines. En effet, ces loci sont sujets à des réarrangements de l'ADN lors du développement lymphocytaire générant la variété de récepteurs antigéniques. Effectivement, il a été démontré que les deux tiers des recombinaisons V(D)J induisent la génération de PTC dans le gène recombiné dans les lymphocytes. Le NMD a été étudié dans les lymphocytes T, où une dégradation efficace a été retrouvée de l'ARNm de TCR-  $\beta$ . Une perturbation du développement des lymphocytes T a été rencontrée dans des souris déficientes en NMD, indiquant le lien entre ce système de dégradation des ARNm et la maturation lymphocytaire (Frischmeyer-Guerrero et al., 2011; Lambert et al., 2019; Li and Wilkinson, 1998a; Tinguely et al., 2012).

Le NMD permet non seulement de dégrader des ARNm porteurs d'un PTC, mais aussi de réguler entre 5 et 15% des ARNm physiologiques. Cette régulation par NMD implique la présence d'un cadre de lecture dans la région 5'-UTR (*upstream open reading frames* ou uORF), un événement d'épissage en aval du codon stop physiologique, une longue région 3'-UTR ainsi que des ARNm codant pour des sélénoprotéines (Kurosaki and Maquat, 2016a; Lambert et al., 2020; Seyedali and Berry, 2014). Les substrats naturels du NMD seront présentés dans la partie 4 de ce chapitre.

- Le premier modèle d'activation du NMD : la voie dépendante de l'EJC
  - a) Structure et influence de l'EJC dans le NMD

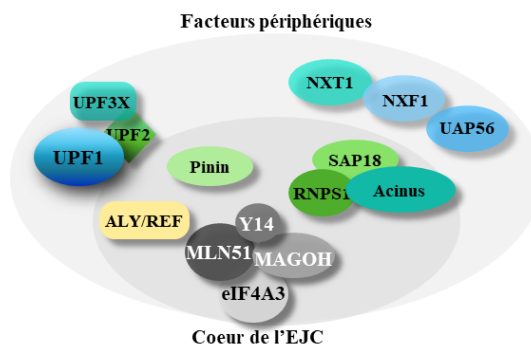
Un des modèles qui a été proposé afin d'expliquer la voie d'activation du NMD est gouverné par le complexe des jonctions exoniques ou *l'Exon Junction Complex* (EJC). En effet, sa présence est nécessaire et indispensable dans ce modèle à la reconnaissance du PTC par le NMD. De plus, il a été démontré que l'EJC est déposé comme conséquence de l'épissage en amont de chaque jonction exonique, créant par conséquent un lien entre le NMD et l'épissage (Le Hir et al., 2000a).

Comme son nom l'indique, le complexe des jonctions exon-exon est composé de plusieurs protéines qui constituent un cœur central interagissant avec des facteurs périphériques diverses. L'assemblage de ces différentes protéines a lieu dans le noyau lors de l'épissage où celles-ci vont se positionner de façon spécifique et précise sur l'ARNm. Plus particulièrement, l'EJC est déposé à une distance de 20 à 24

nucléotides en amont des jonctions exon-exon. Ce dépôt de l'EJC sur l'ARNm ne nécessite pas a priori une séquence de reconnaissance particulière.

Dès son ancrage sur l'ARNm, l'EJC accompagne l'ARNm du noyau au cytoplasme où il interviendra dans la détection des défauts présents sur la séquence. Au niveau cytoplasmique, il pourra provoquer deux destins différents pour l'ARNm selon sa position sur l'ARNm et la séquence d'ARN en question. En effet, lors du premier tour de traduction, le ribosome synthétise de façon séquentielle le polypeptide conduisant au détachement progressif des EJCs en amont de chaque jonction exonique. Lorsque la machinerie traductionnelle arrive à un codon stop, la traduction sera interrompue et la présence d'au moins un EJC en aval provoquera l'activation du NMD.

Le cœur central de l'EJC est un hétérotétramère composé des protéines suivantes : eIF4A3 (*eukaryotic initiation factor A3*), MAGOH (*mago-nashi homolog*), MLN51 (*metastatic lymph node 51*, ou *Barentsz* chez la drosophile ou *CASC3*) et Y14 (*RNA binding motif protein 8A* ou *RBM8A*) (Andersen, 2006; Le Hir et al., 2016; Le Hir and Andersen, 2008; Tange, 2005) (*Figure 25*).



*Figure 25 : Composition du complexe EJC.* L'EJC est composé du cœur central, avec les protéines eIF4A3, MAGOH, MLN51 et Y14, et des facteurs périphériques dont les facteurs d'épissage, d'export et du NMD.

De manière plus détaillée, toutes les protéines qui donnent vie à l'EJC possèdent une fonction bien précise et définie. La toute première protéine qui se dépose sur l'ARN et qui forme un support pour les interactions protéiques des composants du cœur de l'EJC est la protéine eIF4A3. Cette protéine est une hélicase ATP-dépendante faisant partie de la famille des protéines à boîte DEAD (*DEAD-box*). Son interaction avec l'ARN ainsi que sa capacité à hydrolyser l'ATP sont liées aux deux domaines globulaires de eIF4A3, RecA1 et RecA2, qui lui confèrent son rôle d'hélicase (Andersen, 2006; Chan, 2004; Linder and Jankowsky, 2011).

Comme évoqué précédemment, eIF4A3 va composer le premier site d'ancrage des autres composants du cœur de l'EJC. Une des protéines qui est recrutée sur la séquence d'ARN est MLN51. La protéine MLN51 a été identifiée lors d'une étude sur les cancers du sein où le gène est retrouvé surexprimé (Tomasetto et al., 1995). En effet, des niveaux élevés de MLN51 sont trouvés dans 30% des cancers primaires du sein (Degot et al., 2002). MLN51 interagit plus précisément avec le domaine N-terminal

d'eIF4A3 en stimulant son activité ATPase. La conséquence de cette stimulation est l'augmentation de l'affinité de la protéine pour l'ARNm. Dans son domaine C-terminal riche en proline, MLN51 possède un signal d'exportation nucléaire appelé NES. Sa partie N-terminale contient deux séquences de localisation nucléaire appelées NLS, un motif en super hélice ainsi qu'un domaine appelé SELOR (*Speckle Localizer and RNA-binding module*) qui est conservé et fondamental à l'incorporation de la protéine dans l'EJC. Cette région SELOR est la responsable de la liaison de MLN51 à l'ARN en amont de la jonction exonique (Baguet et al., 2007; Degot et al., 2004; Noble and Song, 2007).

Une autre caractéristique de la protéine MLN51 est qu'elle est décrite comme étant une protéine navette entre le noyau et le cytoplasme. Plusieurs études ont tenté d'élucider le rôle de cette protéine. Dans un premier temps, il a été démontré que la protéine MLN51 permet l'activation de la traduction puisque l'inhibition de l'expression de MLN51 entraîne une réduction de l'événement de traduction (Chazal et al., 2013). Une autre étude a aussi montré que la surexpression ou l'inactivation d'une forme mutée de MLN51, et plus précisément la perte de la région C-terminale, induit l'altération de l'assemblage des granules de stress au niveau cytoplasmique (Baguet et al., 2007). Récemment, une nouvelle étude semble indiquer que la protéine MLN51 pourrait ne pas être si nécessaire qu'on ne le croyait concernant l'assemblage de l'EJC lors de l'épissage mais son rôle est plutôt lié à l'activation du NMD, avec une stimulation directe du clivage endonucléolytique dépendant de la protéine SMG6. Néanmoins, ses nombreuses capacités dans les événements de traduction et de dégradation des ARNm restent à être élucidées (Gerbracht et al., 2020).

Les deux autres composants du cœur de l'EJC sont les protéines MAGOH et Y14. Ensemble, elles forment un hétérodimère qui a la capacité d'interagir avec le domaine C-terminal de la protéine eIF4A3, en inhibant son activité ATPase. Le résultat de cette inhibition est la stabilisation de l'interaction entre le complexe et l'ARN. Y14 présente un domaine de liaison à l'ARN appelé RBD dans la région centrale mais son interaction avec MAGOH qui a une très forte affinité avec le domaine RBD, masque la surface pouvant interagir avec l'ARN. Ainsi, la liaison avec l'ARN est inhibée. Néanmoins, l'interaction entre les deux protéines semble être fondamentale puisque l'absence de celle-ci entraîne des défauts fonctionnels dans le métabolisme de l'ARNm mais aussi dans sa localisation et stabilité (Chuang et al., 2015; Lau et al., 2003; Ma et al., 2019).

Le cœur de l'EJC est ainsi prêt à former une plateforme d'ancrage aux facteurs additionnels nommés aussi facteurs périphériques, tels que des facteurs d'épissage, des facteurs d'export nucléaire, des facteurs liés à la traduction ou à la localisation cellulaire et des facteurs impliqués dans le NMD (Le Hir et al., 2016) (*Figure 25*).

Les premiers facteurs périphériques à se déposer sur la plateforme formée par l'EJC sont les facteurs d'épissage ACINUS, SAP18, RNPS1 (*RNA-binding protein with Ser-rich domain 1*) et PININ (Le Hir et al., 2016; Murachelli et al., 2012). ACINUS et PININ sont des protéines navettes pouvant donner vie

à deux complexes ternaires alternatifs selon leur association avec RNPS1 et SAP18. Respectivement, les deux complexes qui peuvent être formés sont le complexe ASAP (*apoptosis and splicing-associated protein*), et le complexe PSAP (où PININ, SAP18 et RNPS1 interagissent entre elles) (Murachelli et al., 2012; Schwerk et al., 2003). D'autres protéines impliquées dans l'événement d'épissage font partie des facteurs périphériques secondaires de l'EJC, tels que Pnn/DRS et SRm160.

Les facteurs d'export nucléaire qui s'associent à l'EJC sont variés, tels que Aly/REF (aussi connu comme THOC4), UAP56 (appelé également DDX39B), NXT1 (*NTF2-related export protein*), NXF1 (*nuclear export factor 1*) et TAP-p15. La première protéine recrutée par l'EJC et qui permet ensuite le recrutement séquentiel des autres facteurs d'export nucléaire est la protéine hélicase UAP56. Ensuite, le facteur Aly/REF se fixe sur le cœur de l'EJC et à son tour permettra le recrutement de l'hétérodimère NXF1-NXT1 sur la séquence d'ARNm. Comme leur nom l'indique, ces facteurs sont impliqués dans l'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme (Le Hir et al., 2016).

Les facteurs impliqués dans le NMD font partie de la dernière classe des facteurs périphériques de l'EJC. En effet, il a été démontré que certaines protéines du NMD interagissent de façon directe avec l'EJC. Parmi celles-ci, on y retrouve les protéines UPF, tels que UPF1, UPF2 et UPF3/3X. Plus particulièrement, la première protéine recrutée dans le compartiment nucléaire est UPF3X où elle s'associe à l'EJC via son motif de liaison à l'EJC, appelé EBM (*EJC-binding motif*). Une fois l'export de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme, l'interaction entre UPF3X et UPF2 permet à UPF2 de rejoindre le complexe EJC et de se déposer sur l'ARNm. La protéine UPF1 ne sera recrutée qu'après un signal d'activation du mécanisme de NMD. Une autre protéine ayant deux motifs EBM et pouvant interagir avec l'EJC est la protéine SMG6 (*morphogenetic effects on genitalia*). La présence de ces deux motifs lui confère ainsi la capacité à interagir avec l'EJC mais en compétition avec la protéine UPF3X (Chamieh et al., 2008; Kashima et al., 2010) (*Figure 25*).

Après avoir nommé les différents composants de l'EJC, nous pouvons dire que l'EJC est dynamique, c'est-à-dire que seule la fraction composant le cœur de l'EJC va rester associée à l'ARNm mais que les facteurs périphériques vont s'interchanger selon la localisation de l'ARNm. En effet, l'ARN qui a subi les phases de maturation et doit ensuite rejoindre le cytoplasme, verra le recrutement de facteurs d'export nucléaire tout autour du cœur central et ainsi de suite (Le Hir, 2001; Le Hir and Andersen, 2008; Tange et al., 2004). L'association des protéines composant l'EJC va être décrite de suite.

#### b) Assemblage et fonctions de l'EJC

En regardant plus dans le détail l'assemblage de l'EJC, les différentes protéines sont recrutées de manière séquentielle. Seul le cœur de l'EJC sera la fraction protéique fixe alors que les facteurs périphériques seront interchangeables et dynamiques.

A l'aide des facteurs d'épissage CWC22 (*complexed with CEF1 22* ou appelé aussi NCM ou *Nucampholin* chez la mouche *Drosophila melanogaster*) et CWC27, eIF4A3 se dépose en amont des événements d'épissage de façon séquence-indépendante, formant ainsi la première partie du cœur de l'EJC. En effet, une récente étude a démontré qu'un complexe tertiaire se forme, composé de CWC27, CWC22 et eIF4A3 (Barbosa et al., 2012; Busetto et al., 2020).

Ensuite, le complexe MAGOH-Y14 est à son tour recruté au niveau du spliceosome, entourant la protéine eIF4A3. Suite au dépôt de ce complexe, les protéines de l'épissage telles que UAP56, RNPS1 et SRm160 vont rejoindre le spliceosome, ainsi que les protéines utiles à l'export de l'ARN telle que Aly/REF (Andersen, 2006) (*Figure 26*).

Après l'épissage et la libération du mRNP du spliceosome, les protéines MLN51 et UPF3X rejoignent le complexe avec Y14 et RNPS1. Suite à l'export vers le cytoplasme, UPF2 va s'associer à UPF3X, et l'ARNm pourra avoir plusieurs destins selon sa séquence, soit être traduit en protéine, soit être dégradé par le NMD si porteur d'un PTC (Ballut et al., 2005; Chamieh et al., 2008; Lejeune et al., 2002).

Une protéine qui a été identifiée comme facteur de dissociation de l'EJC mais aussi comme protéine initiatrice de la traduction est PYM (*Partner of Y14 and MAGOH*) qui interfère avec la liaison entre eIF4A3 et l'hétérodimère Y14-MAGOH en déstabilisant le complexe EJC sur l'ARNm (Bono et al., 2004; Le Hir et al., 2016).

L'EJC présente différentes fonctions que je vais présenter. Un des premiers rôles est celui d'être déposé lors de l'épissage en amont de chaque jonction exonique en régulant finement cette étape de maturation de l'ARN pré-messager. En effet, il a été démontré que la mutation ou la réduction d'expression de protéines composant le cœur de l'EJC mais aussi des facteurs périphériques peuvent causer des sauts d'exons et des rétentions d'introns chez la drosophile (Ashton-Beaucage et al., 2010).

Une autre fonction de l'EJC est d'intervenir dans la traduction. En effet, les ARNm qui après épissage possèdent au moins un EJC seront traduits plus efficacement que ceux dépourvus d'EJC. Le complexe optimise ainsi la traduction, et sera décroché par le ribosome lors du premier tour de traduction. Il a été démontré en effet qu'une diminution de l'expression de MLN51 cause une baisse d'efficacité de traduction puisque MLN51 recrute deux facteurs d'initiation de la traduction, c'est-à-dire les protéines eIF3A et eIF3D (Chazal et al., 2013; Le Hir et al., 2016). Il a aussi été montré que la fixation artificielle de composants de l'EJC sur un ARNm conduit à une augmentation de la traduction (Le Hir et al., 2003).

Comme évoqué lors de l'explication de la structure de l'EJC, le complexe intervient dans l'export des ARNm du noyau vers le cytoplasme puisqu'il a été démontré que l'EJC est une plateforme pour le recrutement de facteurs périphériques impliqués dans ce processus d'export, tels que NXT1 et NXF1 (Köhler and Hurt, 2007).



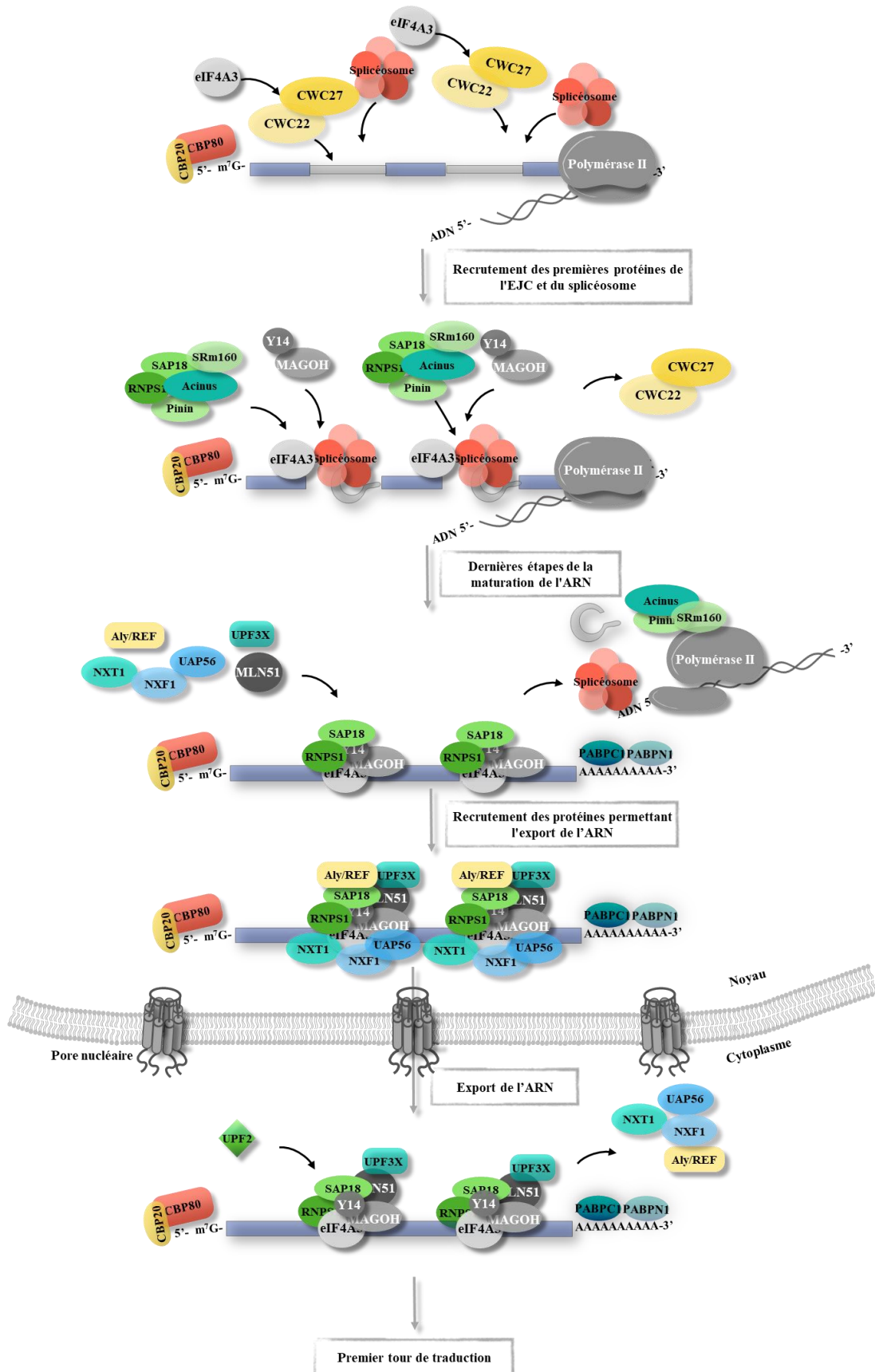


Figure 26 : Assemblage des différentes protéines qui composent l'EJC sur l'ARN. Les protéines du cœur de l'EJC se déposent sur l'ARN à l'aide des facteurs périphériques tels que les facteurs d'épissage, d'export et du NMD.

La fonction de l'EJC la plus décrite aujourd'hui est celle qu'elle occupe dans le mécanisme du NMD. De ce fait, un modèle de reconnaissance des PTC et d'activation du NMD qui présente une dépendance à l'EJC a été proposé (Brognia and Wen, 2009). Il a déjà été mis en évidence que l'EJC interagit avec les facteurs du NMD, plus précisément avec les protéines UPF2 et UPF3X (Chamieh et al., 2008). Différentes études montrent que les protéines UPF1 et RNPS1 co-immunoprécipitent et que RNPS1, Y14, SRm160 et Aly/REF co-immunoprécipitent avec UPF3X de façon ARN-indépendante. De plus, la suppression de l'expression des protéines Y14, eIF4A3 et MLN51 entraîne une inhibition du NMD. Entre autres, des mutations de Y14 ou MAGOH empêchant la formation du complexe Y14-MAGOH, conduisent aussi à une inhibition du NMD. Tout cela démontre le rôle essentiel joué par l'EJC dans le mécanisme du NMD (Fribourg et al., 2003; Lejeune et al., 2002; Lykke-Andersen, 2001).

Une autre information tout aussi importante est que le dépôt de l'EJC 24 nucléotides en amont de la jonction exon-exon ne reconnaît pas de motif nucléotidique spécifique, indiquant que la séquence n'influence pas la localisation de l'EJC. En revanche, il a été démontré que 20% des jonctions exoniques ne possèdent pas d'EJC déposé, indiquant une variabilité entre exons (Saulière et al., 2012; Singh et al., 2012; Woodward et al., 2017).

#### c) La règle des 50 à 55 nucléotides et l'importance de l'épissage

En 1979, une corrélation a été faite entre la présence des PTC et la réduction de la quantité d'ARNm présent (Losson and Lacroute, 1979), et quelques années plus tard, il a été démontré que les PTC étaient la cause d'une réduction de la stabilité des ARNm dans la  $\beta$ -thalassémie (Maquat et al., 1981).

Une étude plus récente portant sur le gène codant pour la triosephosphate isomérase ou TPI a dévoilé un lien direct entre les événements d'épissage et la reconnaissance du PTC avec comme conséquence l'activation du NMD (Cheng et al., 1994). En effet, l'ARNm codant ce gène a permis d'établir que les PTC doivent se situer à plus de 50 nucléotides en amont d'une jonction exon-exon afin d'être reconnus par le système de surveillance NMD.

Les années qui ont suivi ont permis d'affiner le modèle d'activation du NMD en montrant notamment que la substitution du dernier intron du gène TPI par une autre séquence intronique, pas spécifique à ce gène, n'affecte pas l'activation du NMD indiquant que le NMD nécessite un événement d'épissage mais n'est pas lié à la séquence intronique (Zhang et al., 1998a). Ces résultats ont été confirmés avec l'étude sur un autre gène codant cette fois-ci pour la  $\beta$ -globine humaine, avec la présence d'une mutation non-sens au niveau du codon 39 (Zhang et al., 1998b).

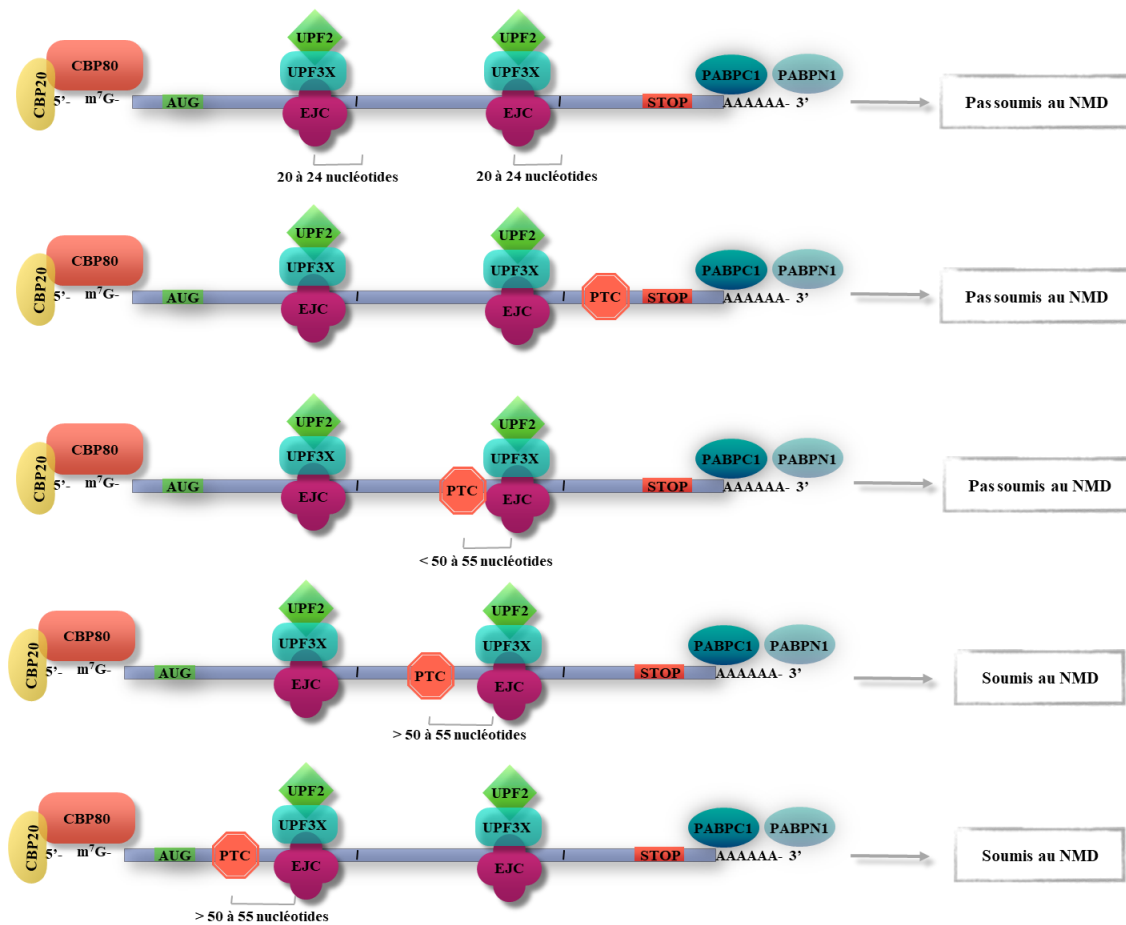


Figure 27 : Les caractéristiques des ARNm soumis au NMD. Le PTC doit respecter la distance des 50 à 55 nucléotides en amont d'une jonction exonique afin d'être reconnu comme tel et activer le NMD.

Une analyse plus ample de gènes variés a mis en évidence que cette distance est nécessaire pour l'activation du NMD non seulement chez les vertébrés mais aussi chez d'autres organismes tels que certaines plantes. C'est à partir de ces observations qu'est née la « règle des 50 à 55 nucléotides », qui définit qu'un codon stop prématuré doit nécessairement se situer en amont d'une jonction exonique à plus de 50 à 55 nucléotides pour activer le NMD (Nagy and Maquat, 1998).

La raison de cette distance bien définie a été argumentée quelques années plus tard avec les recherches de Le Hir et ses collègues, qui ont réussi à définir la position exacte des EJC sur les ARNm. En effet, l'EJC est déposé à une distance de 20 à 24 nucléotides en amont de chaque jonctions exoniques. Cette étude a ainsi permis d'avoir plus d'informations concernant l'EJC, complexe multiprotéique mis en place sur la séquence d'ARN lors de l'épissage dans le noyau et libéré lors du premier tour de la traduction dans le cytoplasme (Yasuhito Ishigaki et al., 2001; Le Hir et al., 2000a) (Figure 27).

A partir de cette règle, un premier modèle de reconnaissance des PTC et d'activation du NMD a été proposé, qui est dépendant de l'EJC et par conséquent aussi de l'épissage. Le dépôt de l'EJC à chaque jonction exonique, permet de distinguer les PTC des codons stop physiologiques. En effet, les codons stop physiologiques sont situés dans le dernier exon, sauf dans quelques cas où le codon stop est porté par un autre exon et à moins de 50 nucléotides en amont de la dernière jonction exon – exon pour 98% de ces exceptions (Hawkins, 1988; Nagy and Maquat, 1998).

Les données précédentes démontrent clairement un lien très fort entre l'épissage et le NMD et ceci a été confirmé par les études suivantes. En effet, il a été démontré que le gène codant pour le récepteur de la mélanocortine 4, mais aussi des gènes codant pour l'histone H4 et la protéine HSP70 sont tous des gènes non épissés et ne sont pas dégradés par le NMD (Brocke and al., 2002; Maquat and Li, 2001).

D'autres équipes de recherche ont démontré ce lien, à l'aide de mutations des sites donneur et accepteur d'un intron dans le gène codant le récepteur  $\beta$  des lymphocytes T (TCR- $\beta$ ). Ces mutations qui entraînent l'inhibition de l'épissage de l'intron muté, conduisent à stabiliser l'ARNm en prévenant l'action du NMD, validant la relation entre l'épissage et le NMD (Carter et al., 1996).

Ce premier modèle d'activation du NMD se base sur la localisation et la distance entre le PTC et la jonction exonique, qui doit être supérieure à 50-55 nucléotides, puisqu'une distance plus courte détourne le système de surveillance, entraînant la synthèse d'une protéine tronquée et l'apparition de pathologies associées.

Néanmoins, comme toute règle, il existe des exceptions qui vont être exposées dans un deuxième temps.

#### d) Activation du NMD par le mécanisme dépendant de l'EJC

Lors de la maturation de l'ARN pré-messager en ARN messager dans le noyau, le complexe de l'EJC est déposé 20 à 24 nucléotides en amont des jonctions exoniques. L'EJC s'enrichit par le recrutement des facteurs périphériques. Les divers facteurs périphériques tels que les facteurs d'épissage, d'export nucléaire et impliqués dans le NMD vont s'interchanger jusqu'à l'événement de traduction dans le cytoplasme. Dans le noyau, la première protéine du NMD à se fixer sur l'ARNm au niveau de l'EJC est la protéine UPF3X, et une fois dans le cytoplasme, la protéine UPF2 va être recrutée et interagir avec UPF3X (Yasuhito Ishigaki et al., 2001; Le Hir et al., 2000a; Lejeune et al., 2002).

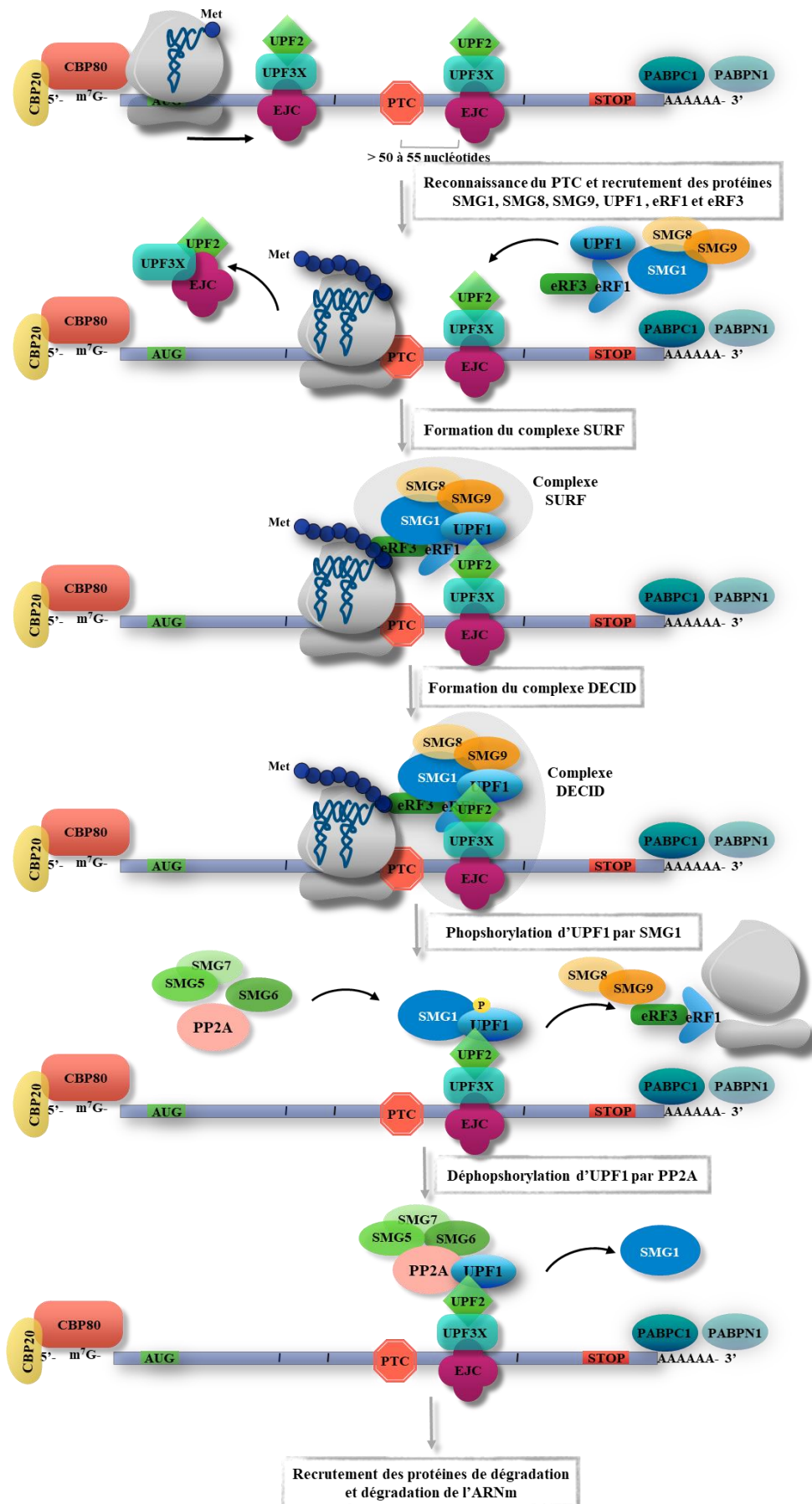


Figure 28 : Activation du NMD dépendant de l'EJC. Dès que le ribosome reconnaît le PTC, les

protéines du NMD sont recrutées telles que SMG1, SMG8, SMG9, UPF1 et les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3. Le complexe SURF est alors formé. L'interaction entre SURF et l'EJC forme le complexe DECID où la phosphorylation d'UPF1 par SMG1 aura lieu. Le recrutement des protéines SMG5, SMG6, SMG7 et la phosphatase PP2A conduisent à la déphosphorylation de UPF1 et au recrutement des enzymes de dégradation.

Au cours du premier tour de traduction et dès que le ribosome reconnaît le codon d'initiation, il commence à lire la séquence en la traduisant en polypeptide au fur et à mesure que la lecture avance. Tout le long de l'ARNm, le ribosome ôte successivement tous les complexes EJC présents sur la phase ouverte de lecture jusqu'au codon stop physiologique où la protéine est entièrement synthétisée et relarguée dans le cytoplasme. Néanmoins, lorsque l'ARNm porte un PTC qui possède les caractéristiques nécessaires pour être reconnu par le NMD, celui-ci s'active, interrompt la traduction et déclenche la dégradation de l'ARN (Maquat et al., 2010).

Lorsque le ribosome reconnaît un PTC, il pause sur ce dernier entraînant le recrutement de différentes protéines. Les premières protéines arrivent sous la forme d'un complexe pré-formé appelé SURF, nom donné par les initiales des protéines qui le compose, c'est-à-dire les protéines SMG1, SMG8 et SMG9, la protéine UPF1 et les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3. L'assemblage de ce complexe est indépendant de l'EJC, puisqu'il peut avoir lieu lorsque UPF2 et Y14 sont déplétées. D'ailleurs, la coimmunoprécipitation des protéines UPF1, SMG1 et les eRF augmente en absence de UPF2 et Y14, ce qui laisse suggérer que UPF1 rejoint le complexe SURF avant son dépôt sur l'EJC (Kashima, 2006).

Une fois le complexe SURF recruté sur l'EJC, une des étapes cruciales du NMD s'engage avec la phosphorylation de la protéine UPF1 par la kinase SMG1. Bien que UPF1 et sa kinase soient en interaction dans le complexe SURF, ce n'est que lorsque ce dernier interagit avec un EJC que la phosphorylation de UPF1 peut avoir lieu. En effet, différentes études ont tenté d'élucider le mécanisme et de comprendre si l'interaction entre le complexe SURF et la protéine UPF2 est la cause de la phosphorylation de UPF1 en raison de la capacité d'UPF2 à interagir simultanément avec la région N-terminale de UPF1 et la région C-terminale de SMG1. Dans un premier temps, la déplétion de UPF2 par siRNA a montré qu'effectivement, l'interaction entre SURF et l'EJC était absente, indiquant que la protéine UPF2 agissait comme intermédiaire entre les deux complexes (Kashima et al., 2006). Néanmoins, cette hypothèse a été rejetée dans un deuxième temps avec la démonstration qu'une protéine UPF1 mutante ne pouvant plus interagir avec UPF2, subit toujours la phosphorylation (Ivanov et al., 2008) (*Figure 28*).

Une autre protéine joue un rôle primordial dans l'établissement de l'interaction entre SURF et l'EJC. C'est la protéine CBP80 qui fait partie avec CBP20 du complexe CBC (*Cap-Binding Complex*) ancré sur la coiffe lors de la maturation de l'ARN pré-messager en ARN messager. CBP80 est présente sur la

coiffe jusqu'au premier tour de traduction et est ensuite remplacée par eIF4E pour les autres tours de traduction si aucun PTC n'est détecté sur l'ARNm (Ishigaki et al., 2001). Le laboratoire du Pr. Maquat a montré que la protéine CBP80 interagit de façon directe avec UPF1 ce qui stimule le NMD. En effet, CBP80 semble augmenter l'interaction entre UPF1 et UPF2 (Hosoda et al., 2005). De plus, Hwang et ses collègues ont démontré qu'une inhibition de l'interaction entre CBP80 et UPF1 entraînait non seulement l'abolition des interactions entre SMG1-UPF1 et eRF1-eRF3 empêchant la formation du complexe SURF, mais aussi la suppression des interactions entre SMG1-UPF1 et l'EJC. L'absence de CBP80 impacterait négativement la phosphorylation de UPF1 par SMG1 (Hwang et al., 2010).

L'interaction entre les complexes SURF et EJC compose un nouveau complexe appelé DECID (*Decay inducing complex*). C'est au sein de ce complexe DECID que la phosphorylation de UPF1 a lieu. La protéine UPF1 phosphorylée interagit plus spécifiquement avec les protéines UPF2 et UPF3X avec comme conséquence la stimulation de son activité hélicase. La kinase SMG1, qui est la seule kinase identifiée aujourd'hui dans le mécanisme du NMD, phosphoryle UPF1 sur plusieurs sites. De manière intéressante, les protéines SMG1, SMG8, SMG9 et les *release factors* perdent leur affinité pour la protéine UPF1 phosphorylée entraînant leur départ du complexe DECID (Kashima, 2006).

Le départ de ces protéines va avoir plusieurs conséquences. La première est le recyclage des facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3, ainsi que de la machine traductionnelle. Une autre conséquence observée est bien évidemment la répression de la traduction puisque le ribosome n'est plus présent sur l'ARNm. De plus, il a été démontré que la protéine UPF1 phosphorylée interagit et se lie au facteur d'initiation de la traduction eIF3 du complexe 40S de pré-initiation, empêchant ainsi le recrutement de la sous-unité 60S et la formation du complexe d'initiation de la traduction (Isken et al., 2008). Il est important de savoir que le NMD est actif et présent seulement lors du premier tour de traduction, et cela sera expliqué plus dans le détail un peu plus tard.

Une dernière caractéristique de la protéine UPF1 phosphorylée est qu'elle présente plus d'affinité pour certaines protéines, entraînant ainsi leur recrutement. Tout d'abord, les protéines SMG5, SMG6 et SMG7 vont être recrutées, et de façon spécifique SMG6 va reconnaître et se positionner sur la Th28 phosphorylée d'UPF1, et l'hétérodimère SMG5-SMG7 sur la Ser1096 d'UPF1.

Avant la formation de l'hétérodimère SMG5-SMG7, il a été proposé que SMG5 forme un complexe avec la protéine PNRC2 (*Proline-Rich Nuclear Receptor Coactivator 2*) (Cho et al., 2009). Plus précisément, il a été suggéré qu'UPF1 phosphorylée est capable de lier le complexe SMG5-PNRC2 qui recrute à son tour la protéine DCP1a (*decapping mRNA enzyme 1a*), enzyme impliquée dans le décoiffage des ARNm destinés à la dégradation. L'interaction entre SMG5 et PNRC2 semble plus puissante que l'interaction entre SMG5 et SMG7 (Cho et al., 2013; Nicholson et al., 2018) et PNRC2 et SMG7 seraient mutuellement exclusives pour l'interaction avec SMG5. Si d'un côté des études confirment la prévalence de cette voie de dégradation par l'implication de PNRC2, de l'autre côté,

d'autres études s'opposent ou montrent que la voie préférentielle est représentée par les protéines SMG7/CCR4-NOT et que la voie dépendante de PNRC2 apparait uniquement en absence de SMG7 (Boehm et al., 2021; Nicholson et al., 2018). Nous allons ainsi nous focaliser sur l'implication de SMG7 dans le mécanisme de dégradation par NMD en raison du nombre d'évidences plus importantes que pour la protéine PNRC2.

Le lien des trois protéines SMG5, SMG6 et SMG7 sur UPF1 permet de promouvoir la déphosphorylation d'UPF1 en recrutant la protéine phosphatase PP2A, et les enzymes de dégradation tels que XRN1 et RRP4 (Isken et al., 2008; Ohnishi et al., 2003; Schell et al., 2003).

Une fois que UPF1 est déphosphorylée par la phosphatase PP2A, la protéine SMG6, avec son activité endonucléolytique, est stimulée et induit le clivage de l'ARNm au voisinage du PTC générant des extrémités 5' et 3' accessibles pour les exoribonucléases (Huntzinger et al., 2008; Popp and Maquat, 2013).

La déphosphorylation de UPF1 et le clivage de l'ARNm par SMG6 entraîne simultanément le détachement de certaines protéines présentes sur l'ARNm telles que SMG5, SMG7, SMG6 même mais aussi le complexe EJC en proximité, et le recrutement de complexes de décoiffage et de déadénylation. De ce fait, l'ARNm pourra être dégradé par l'exoribonucléase XRN1 à partir de l'extrémité 5' et par les protéines de l'exosome à partir de l'extrémité 3' (Lejeune et al., 2003; Okada-Katsuhata et al., 2012). Il faut cependant se rappeler que la majorité des ARNm porteurs d'un PTC sont dégradés par le NMD mais qu'une partie peut échapper à la dégradation. La question s'intéressant à savoir si ces ARNm porteurs d'un PTC qui échappent au NMD sont traduits ou non en une protéine tronquée reste sans réponse claire puisqu'une étude a montré qu'ils ne sont pas traduits (You et al., 2007) et deux études semblent avoir réussi à détecter des protéines tronquées à partir d'un ARNm porteur d'un PTC (Anczuków et al., 2008; Dorard et al., 2011).

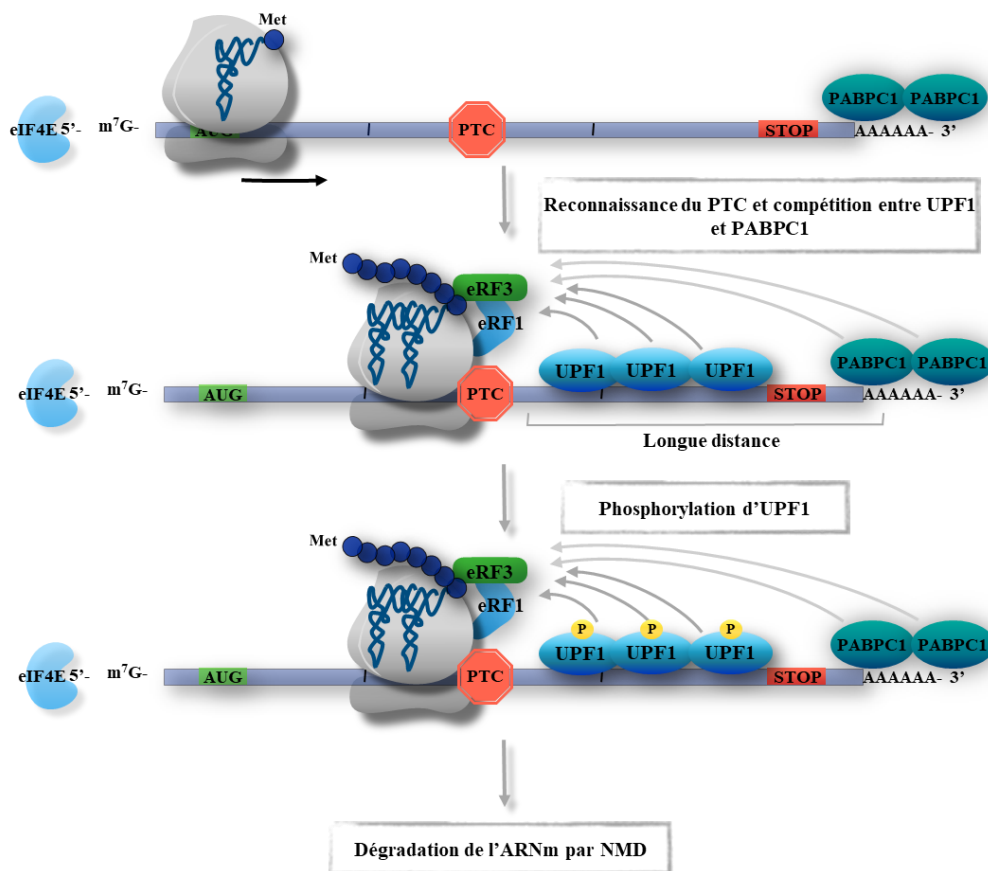
Il a été démontré que certains organismes ne possèdent pas de EJC, et auront ainsi une autre voie de reconnaissance d'un PTC et d'activation du NMD qui sera illustrée de suite (Le Hir et al., 2000a; Tange et al., 2004).

- Le deuxième modèle proposé : dépendant de la distance entre le PTC et la protéine PABP

La « règle des 50 à 55 nucléotides » n'est pas le seul modèle proposé aujourd'hui concernant l'activation du NMD notamment dans les cellules de mammifères. En effet, lorsque l'on parle d'activation du NMD, on ne peut mettre de côté le deuxième modèle décrit, lié à la distance entre le PTC et la protéine PABP située sur la queue poly-A à l'extrémité 3'-UTR (Behm-Ansmant et al., 2007) (*Figure 29*).



Ce modèle a été postulé en raison du fait que certains organismes tels que les champignons unicellulaires *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe* mais aussi organismes tels que la mouche *Drosophila melanogaster* ou le ver *Caenorhabditis elegans* ne présentent pas de EJC et pourtant les ARNm sont soumis au mécanisme du NMD. En effet, le NMD semble bel et bien actif et serait donc activé d'une façon alternative (Amrani et al., 2004; Conti and Izaurralde, 2005; Fatscher and Gehring, 2016; Wen and Brogna, 2010). De manière intéressante, la partie 3'UTR dans ces organismes est assez constante d'un ARN à un autre et assez courte permettant d'appréhender la notion de distance « normale » entre le codon stop et la PABP dans le cas d'un codon stop physiologique, et de distance « anormale » entre un PTC et la PABP. Néanmoins, ce modèle EJC-indépendant a été proposé aussi chez les mammifères qui possèdent des ARNm avec une partie 3'UTR très variable d'un ARNm à un autre pouvant aller de quelques nucléotides à plusieurs kilobases (Eberle et al., 2008; Silva and Romão,



2009).

Figure 29 : L'activation du NMD indépendant de l'EJC. La distance entre le ribosome et les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3 avec la protéine PABPC1 est fondamentale pour la reconnaissance du PTC comme tel.

Chez la levure, ce deuxième modèle porte le nom de « faux 3' UTR » et dépend de la distance entre la protéine Pabp1 et le PTC. Plus précisément, son nom est dû à la séquence qui entoure le PTC et qui mime ainsi la partie 3'UTR, donc « faux 3'UTR », afin de déclencher le signal pour la dégradation de l'ARN. En effet, lors de la terminaison de la traduction au codon stop physiologique, le ribosome

interagit avec des protéines spécifiques, notamment la protéine Pabp1 mais lorsqu'un PTC est présent sur la séquence, le ribosome sera incapable d'interagir avec Pabp1 considérant la distance qui les sépare comme anormalement longue (Amrani et al., 2004; Conti and Izaurrealde, 2005).

Chez les mammifères, des petites variations sont visibles mais le mécanisme est globalement similaire. En effet, l'activation du NMD par ce modèle se focalise sur la compétition entre les protéines UPF1 et PABPC1, c'est-à-dire PABP cytoplasmique sur la région 3'-UTR. Ces protéines sont en compétition pour interagir avec la protéine eRF3 située au niveau du ribosome. eRF3 est un facteur de terminaison de la traduction et l'interaction qu'il va établir avec UPF1 ou avec PABPC1 va modifier les conséquences de la terminaison de la traduction. Lorsqu'un ARNm ne présente pas de PTC et doit ainsi être traduit en protéine, le ribosome lit la séquence jusqu'au codon stop physiologique. Lorsque le ribosome arrive au codon stop physiologique, il recrute le complexe de terminaison de la traduction dont eRF3 grâce notamment à PABPC1. La conséquence sera un arrêt de la traduction et un recyclage des deux sous-unités du ribosome pour initier un nouveau tour de traduction sur le même ARNm. Au contraire, lorsqu'un ARNm porte un PTC, cela augmente la distance entre le ribosome pausant sur le codon stop et la PABPC1. Par conséquent, c'est UPF1 qui va venir aider au recrutement de eRF3 pour terminer la traduction mais dans ce cas, il y aura aussi activation du NMD suite au recrutement des différents facteurs de NMD. Avec ce modèle, la protéine PABPC1 peut être perçue comme un antagoniste de l'activation du NMD puisque plus la distance qui la sépare du PTC est importante, plus le NMD sera efficace (Singh et al., 2008).

Différentes études ont montré que ce modèle d'activation du NMD n'opère pas exclusivement lors du premier tour de traduction, mais peut apparaître lors des différents tours de traduction (Durand and Lykke-Andersen, 2013; Metze et al., 2013).

Une caractéristique commune aux deux modèles est que l'état de phosphorylation de la protéine UPF1 est très important. En effet, plus la région 3'UTR est longue, plus les protéines UPF1 fixées sur l'ARNm sont phosphorylées, ce qui indique au NMD d'être activé. Les protéines UPF2, UPF3X mais aussi la kinase SMG1 n'ont pas tout à fait pris place dans ce modèle. Néanmoins, il a été démontré que la phosphorylation de UPF1 par SMG1 ainsi que la déphosphorylation est nécessaire dans l'activation du NMD chez le ver *Caenorhabditis elegans* (Metze et al., 2013; Ohnishi et al., 2003).

Des études soutiennent l'idée que l'activation du NMD par ce modèle est gouvernée par la compétition entre les protéines UPF1 et PABP et que UPF1 interagit avec eRF1 et eRF3, démontré par des expériences de co-immunoprécipitation (Ivanov et al., 2008; Singh et al., 2008; Wang and al., 2001).

En revanche, une autre proposition a été faite, et se focalise sur le rôle et l'importance de la protéine UPF3X dans la terminaison de la traduction (Neu-Yilik et al., 2017). Neu-Yilik et ses collègues ont montré qu'UPF3X se situe sur l'ARNm en proximité du site A du ribosome et recrute les protéines

eRF1-eRF3 afin de déclencher l'arrêt de la traduction. La protéine UPF1 est située dans la région 3'-UTR et peut, elle aussi, interagir avec le ribosome en phase de terminaison de la traduction mais dans un deuxième temps. Après que la protéine néo-synthétisée se détache du ribosome, UPF3X peut éventuellement changer de conformation ou de position au niveau du ribosome afin d'induire le recyclage du complexe post-TC. La protéine UPF2 n'est pas détectée dans le complexe UPF3X et eRF3, indiquant que probablement UPF2 est recruté après la libération d'eRF3 et de la machinerie ribosomique. Puis, UPF1, à l'aide des protéines UPF2, UPF3X et d'autres protéines, permettrait le remodelage de la région 3'-UTR ainsi que le recrutement des enzymes de dégradation afin de dégrader l'ARNm en question (Neu-Yilik et al., 2017).

- Comparaison des deux modèles connus

Les deux modèles coexistent probablement puisqu'il a été démontré que selon le transcrit en question, une voie d'activation du NMD peut être préférentielle par rapport à une autre. La nature du substrat peut ainsi influencer sa propre dégradation (Conti and Izaurralde, 2005).

Par exemple, il a été démontré qu'en présence d'un PTC dans le gène codant pour la triosephosphate isomérase (TPI), ou bien dans le gène codant pour la  $\beta$ -globine, la voie majoritairement activée du NMD est la voie dépendante de l'EJC, et donc le premier modèle énoncé. En revanche, chez la mouche *Drosophila Melanogaster*, il semblerait que l'activation du NMD serait faite en suivant le deuxième modèle (Behm-Ansmant et al., 2007).

La caractéristique du modèle lié à la protéine PABPC1 est que le NMD n'est pas forcément activé lors du premier tour de traduction, chose indispensable pour la règle des 50 à 55 nucléotides. En effet, chez la levure, les protéines de la coiffe telles que celles composant le complexe CBC (CBP80 et CBP20), ainsi que la protéine eIF4E qui est déposée après le premier tour de traduction, sont présentes sur les ARNm soumis au NMD (Gao et al., 2005).

Néanmoins, il se peut que les deux modèles prennent le relais l'un sur l'autre ou agissent en combinaison afin de permettre une dégradation plus efficace des ARNm. En effet, les ARNm échappés au NMD lors du premier tour de traduction, pourraient être reconnus et dégradés par leur distance du PTC par rapport à la longueur de la région 3'-UTR.

Certains ARNm ne sont pas soumis au NMD malgré la présence d'un PTC dans leur séquence, tels que le gène de la  $\beta$ -Globine qui n'est pas dégradé et permet la synthèse d'une protéine tronquée causant la  $\beta$ -thalassémie. Malgré la partie 3'-UTR assez longue qui permet donc d'avoir une distance importante entre le PTC et la protéine PABP, le NMD n'est pas activé (Thein et al., 1990). La raison pour laquelle le PTC n'est pas reconnu par le ribosome et ne peut être dégradé par le NMD est qu'il ne suit pas la règle des 50 à 55 nucléotides puisqu'il se situe dans le dernier exon et est donc privé d'EJC en proximité.

Le NMD ne pouvant être actif, une protéine tronquée est synthétisée et sera la cause de la  $\beta$ -thalassémie de forme dominante. Mais la présence de l'EJC n'est pas la seule condition pour l'activation du NMD puisque nous pouvons prendre l'exemple d'un PTC dans le premier exon, qui lui aussi n'est pas reconnu comme tel par le NMD. En effet, une petite protéine tronquée est produite. Pour l'activation du NMD et la dégradation de cet ARNm en question, tout dépend donc de la position du PTC dans la séquence. Plus précisément, la  $\beta$ -Globine présente trois exons et il a été démontré qu'uniquement des PTC ayant une localisation bien précise, par exemple dans le deuxième exon et en ayant une distance supérieure de 50 à 55 nucléotides en amont de la jonction exonique, est reconnu par le NMD et permet l'activation de la dégradation. Une mutation souvent retrouvée chez des patients et qui voit une activation du NMD est la mutation non-sens UAG présente dans le codon en position 39, située dans l'exon 2 (Baserga and Benz, 1988; Humphries et al., 1984; Zhang et al., 1998b). C'est pour cette raison que nous avons décidé de la choisir comme modèle dans notre étude puisqu'il a été démontré que, par rapport à un ARNm sauvage, la Globine avec le PTC appelée Globine Ter, active le NMD de façon importante par rapport à d'autres mutations.

- La traduction dans le mécanisme du NMD

Le NMD est un système de contrôle-qualité mis en place après les événements de maturation de l'ARN pré-messager en ARN messager qui permet de détecter la présence d'un codon stop prématuré.

Le lien entre le NMD et la traduction est relativement bien documenté et a fait l'objet de plusieurs publications (Carter et al., 1995; Thermann et al., 1998). En effet, le rapprochement entre les deux mécanismes a été souvent formulé, laissant transparaître que le ribosome est capable de reconnaître un PTC lors du premier tour de traduction, et par conséquent d'activer le NMD (Isken et al., 2008; Isken and Maquat, 2008).

Les mRNP, présentent des différences dans leur composition protéique lors du premier tour de la traduction et lors des tours qui suivent (Chiu et al., 2004; Ishigaki et al., 2001; Lejeune et al., 2004, 2002). La première différence est visible sur la coiffe de l'ARNm, avec la présence du complexe protéique CBC, composé des protéines CBP80 et CBP20. Ce complexe CBC sur la coiffe est remplacé après le premier tour de traduction par la protéine eIF4E.

Comme déjà exposé lors de l'explication de la reconnaissance des PTC, il a été démontré que les ARNm associés au complexe CBC de la coiffe étaient sensibles au NMD, contrairement aux ARNm associés aux protéines de la coiffe qui sont interchangeables lors des tours suivants de la traduction (Yasuhito Ishigaki et al., 2001; Lejeune et al., 2002; Maquat et al., 2010). Cette reconnaissance du PTC dès le premier tour évite la synthèse d'une protéine qui serait tronquée mais aussi une dépense énergétique inutile.

Différentes équipes ont démontré cette forte liaison, notamment après l'inhibition de la traduction qui induisait des modifications dans l'efficacité du NMD. Les approches inhibant la traduction qui ont été utilisées sont par exemple l'insertion d'une tige-boucle dans la région 5'-UTR de l'ARNm (Belgrader et al., 1993), mais aussi l'utilisation de composés chimiques tels que la cycloheximide, la puromycine ou l'anyosomicine (Carter et al., 1995), et l'utilisation d'ARNt suppresseurs de codons non-sens. Les résultats obtenus ont montré un impact de l'inhibition de la traduction sur le NMD, et plus précisément une inhibition du mécanisme du NMD. En effet, la traduction inhibée conduisait à une stabilisation des ARNm.

Des travaux de Maquat et de ses collègues ont mis en évidence par la technique d'immunoprécipitation que le NMD est capable de reconnaître uniquement les ARNm où la protéine CBP80 est présente sur la coiffe, et non les ARNm présentant sur leur extrémité 5' la protéine eIF4E. La même équipe a démontré que les protéines UPF2 et UPF3X, fondamentales pour le mécanisme du NMD, sont détectées sur les mRNP immunopurifiées uniquement avec l'utilisation d'un anticorps anti-CBP80 et non pas un anticorps anti-eIF4E (Yasuhito Ishigaki et al., 2001). Ces observations confirment à nouveau que le NMD est activé lors du premier tour de la traduction.

Une autre caractéristique des ARNm qui subissent le premier tour de traduction est qu'ils présentent en amont de chaque jonction exon-exon le complexe EJC. Ce complexe est retiré de l'ARNm lors du passage de la machinerie ribosomique. En effet, les composants de l'EJC tels que Y14, SRm160, RNPS1, TAP et Aly/REF ont été retrouvés dans les mRNP portant la protéine CBP80, mais pas sur les ARNm portant eIF4E (Lejeune et al., 2002). De plus, selon la règle des 50 à 55 nucléotides, le PTC est reconnu comme tel seulement s'il respecte des caractéristiques bien précises, notamment la distance entre la position du PTC et la jonction exonique en raison de la présence de l'EJC.

Mais comme toute règle, il existe des exceptions selon les situations et selon les organismes considérés. Chez la levure ou dans certaines situations chez les eucaryotes, il a été démontré que la reconnaissance des PTC ne suivait pas la condition du premier tour de traduction, mais au contraire que les ARNm portant la protéine eIF4E sur la coiffe étaient tout aussi aptes à subir la dégradation par le NMD (Durand and Lykke-Andersen, 2013; Gao et al., 2005; Rufener and Mühlemann, 2013).

### **3) La localisation du NMD : la dégradation des ARNm dans le cytoplasme et le rôle des *P-bodies***

- La dégradation dans le cytoplasme

Suite aux explications précédentes, il a déjà été démontré que le mécanisme du NMD est lié à la traduction puisque la reconnaissance des ARNm porteurs d'un PTC survient lors du premier tour de traduction.

La machinerie traductionnelle qui conduit à la synthèse des peptides se situe de façon exclusive dans le cytoplasme. Cela a été renforcé par Singh et ses collègues qui ont démontré que les ARNm avec PTC sont reconnus au niveau cytoplasmique. De façon plus détaillée, des peptides qui localisent uniquement dans le cytoplasme et dirigés contre les protéines UPF ont la capacité de bloquer les interactions protéiques et d'inhiber le NMD. Cependant, ces peptides avec cette fois un adressage exclusivement dans le noyau n'ont aucune conséquence sur le NMD. Entre autres, la même équipe a démontré qu'une forme mutée de la protéine UPF1 qui est retenue dans le noyau en raison d'un signal de rétention nucléaire, a la capacité d'inhiber le NMD. Cela met donc en évidence que UPF1 doit être présente dans le cytoplasme afin de promouvoir le mécanisme du NMD (Singh et al., 2007).

Dans les années 1990, différentes théories avaient été proposées concernant la localisation du mécanisme de dégradation des ARNm aberrants. En effet, différents modèles avaient été proposés, notamment celui d'export co-traductionnel, le modèle cytoplasmique mais aussi les modèles de *scanning* nucléaire et de *cytonuclear feedback* (Maquat, 1995). Dans le noyau, deux modèles avaient été proposés, celui du *scanning* nucléaire et de l'export co-traductionnel.

Le modèle de *scanning* nucléaire implique la présence de ribosomes dans le noyau capables de traduire la séquence d'ARN. Le système serait dans ce cas relié à l'événement d'épissage et la dégradation des ARN apparaîtrait en même temps que la traduction de l'ARN en question.

Cependant, l'hypothèse que le NMD soit localisé dans le noyau a très vite été exclue puisque cela semblait contradictoire en raison du lien entre le NMD et la traduction. Le NMD nécessite le ribosome et les ARN de transfert pour le déclenchement du signal de dégradation des ARN, et les études sur le mécanisme de traduction nucléaire ont été inconcluantes (Maquat, 1995; Wilkinson and Shyu, 2002).

En revanche, le modèle d'export co-traductionnel s'appuie bien sur une traduction cytoplasmique mais qui apparaît au cours de l'export des ARNm. Pour cela, en phase d'export nucléaire lorsque l'ARNm est encore en partie lié au pore nucléaire, les ribosomes commencent la traduction avec un arrêt au niveau du PTC. Cela a été démontré par microscopie électronique chez le *Chironomus tentans*, avec la visualisation de la protéine Hrp86 au niveau de ce qu'on appelle le *Balbani ring mRNA*, un ARNm qui a été suivi le long de son export et de la traduction. La protéine Hrp86 a été retrouvée fixée sur l'ARNm même après l'export et après l'assemblage de polyribosomes (Visa et al., 1996).

Le modèle de *cytonuclear feedback*, qui propose une reconnaissance des ARNm porteurs d'un PTC lors de la traduction dans le cytoplasme, se base sur la capacité des ribosomes à transmettre un signal de contrôle négatif dans le noyau afin de permettre la dégradation par NMD (Maquat, 1995).

Au fil du temps, des études ont confirmé que le mécanisme du NMD est un événement exclusivement cytoplasmique (Belgrader et al., 1994; Cheng and Maquat, 1993; Maquat, 2004; Singh et al., 2007; Trecek et al., 2013).

- Les *P-bodies* (*Processing Bodies*)

Les *P-bodies* ou *Processing Bodies* sont des petites structures dynamiques qui ont été identifiées pour la première fois dans des fibroblastes murins (Bashkirov et al., 1997). En effet, c'est en étudiant la localisation cellulaire de l'exoribonucléase XRN1 que les *P-bodies* ont pu être décrits. La protéine XRN1 formait ces petites structures dont la nature était inconnue et c'est seulement en 2003 par le groupe de Roy Parker qu'une caractérisation a été faite et que le terme de *P-bodies* a été utilisé (Sheth and Parker, 2003).

Etant décrits comme des foyers ou granules cytoplasmiques, ils sont composés d'ARNm et de protéines intervenant dans la dégradation des ARNm en 5' ou 3' et dans la répression traductionnelle. Le rôle des *P-bodies* a suscité de la curiosité de la part de plusieurs équipes qui ont tenté d'élucider la vraie activité de ces foyers présents dans le cytoplasme (Eulalio et al., 2007a; Franks and Lykke-Andersen, 2008; Luo et al., 2018; Parker and Sheth, 2007).

La présence des *P-bodies* a été confirmée chez tous les eucaryotes avec une composition qui varie selon l'espèce. Les protéines suivantes ont été retrouvées dans les *P-bodies* : l'exoribonucléase 5'→3' XRN1 (Bashkirov et al., 1997; Sheth and Parker, 2003), les protéines du *decapping* ou décoiffage DCP1 et DCP2 (Ingelfinger et al., 2002; Sheth and Parker, 2003; van Dijk et al., 2002), les co-activateurs du *decapping* Ge-1/Hedls et EDC3 (Decker and Parker, 2012; Fenger-Grøn et al., 2005; Yu et al., 2005), l'ARN hélicase p54/RCK (Sheth and Parker, 2003; Wilczynska et al., 2005), le complexe LSM1-7 (Ingelfinger et al., 2002; Sheth and Parker, 2003), et les complexes de déadénylation CCR4-CAF1 et PAN2-PAN3 (Cougot et al., 2004; Zheng et al., 2008). Toutes ces protéines sont impliquées dans la dégradation des ARNm.

Si certaines protéines impliquées dans la dégradation des ARNm sont présentes dans les *P-bodies*, cela n'est pas le cas pour l'exosome qui ne présente aucune localisation dans les foyers cytoplasmiques. Cela laisse donc penser que les protéines impliquées dans les voies de dégradation ne transitent pas toutes dans les *P-bodies* (Kulkarni et al., 2010) ou que les *P-bodies* ne sont pas le lieu de dégradation des ARN.

Des protéines ayant des rôles distincts ont été identifiées dans les *P-bodies*, telles que des protéines impliquées dans la répression traductionnelle, dans la voie de régulation des microARN, dans la réponse antivirale mais aussi des protéines impliquées dans le mécanisme du NMD (Eulalio et al., 2007a). Un exemple sur l'implication des *P-bodies* dans la régulation des microARN est que la protéine Argonaute, qui fait partie du complexe RISC (*RNA-induced silencing complexe*) et qui s'associe avec les miRNA en interférant sur leur fonction, a été retrouvée dans les *P-bodies*. En effet, la protéine Argonaute interagit avec les protéines GW182, DCP1, DCP2 et d'autres, déjà présentes dans les *P-bodies*, confirmant un rôle des foyers cytoplasmiques dans le *RNA silencing* (Ding et al., 2005; Liu et al., 2005; Meister et al., 2005). Une autre protéine retrouvée dans les *P-bodies* est APOBEC3G, une déoxycytidine

déaminase avec une activité antivirale, indiquant une possible activité des *P-bodies* dans la réponse aux virus (Wichroski et al., 2006).

La fonction des *P-bodies* reste aujourd'hui un mystère puisque deux théories s'opposent et leur rôle doit encore être élucidé. La première hypothèse est que les *P-bodies* fonctionneraient comme lieu de stockage des ARNm qui ne doivent pas être traduits en protéine tels que les ARNm aberrants ou les ARNm qui doivent être régulés physiologiquement. La deuxième hypothèse est que les *P-bodies* représenteraient le compartiment où la dégradation des ARNm a lieu puisqu'on y retrouve à l'intérieur des ARNm qui sont soumis au NMD et des protéines du NMD.

Chez la Levure, il a été démontré par l'équipe de Roy Parker que la dégradation des ARNm est bien effectuée dans les *P-bodies* et que la localisation de la protéine UPF1 doit être dans ces foyers cytoplasmiques afin de permettre l'activation du NMD (Parker and Sheth, 2007; Sheth and Parker, 2006). Entre autres, la même équipe a démontré que la présence d'ARNm dans les *P-bodies* est dépendante de la protéine Upf1p et de son état de phosphorylation. La protéine Upf1p ne fait pas de distinction entre les ARNm aberrant et sauvages. De plus, Parker et collègues ont démontré que la mutation des protéines Upf2 et Upf3 mais aussi l'inactivité de l'activité ATPase de la protéine Upf1p entraînaient une augmentation du nombre et de la taille des *P-bodies* (Sheth and Parker, 2006).

Des études ont montré qu'au niveau microscopique, la présence ou l'absence de *P-bodies* dans les cellules n'impactait pas l'efficacité du NMD. De plus, l'accumulation de *P-bodies* et ainsi un nombre plus important de *P-bodies* dans les cellules, ne causait aucune amplification ou augmentation des événements de dégradation des ARNm (Eulalio et al., 2007b; Fenger-Grøn et al., 2005).

Autre particularité qui a été observée chez les mammifères est l'accumulation des facteurs du NMD et des ARNm portant un PTC dans les *P-bodies* après inhibition du NMD par l'utilisation d'une molécule chimique inhibitrice, appelée NMDI-1. De ce fait, les protéines UPF1, UPF3 et UPF3X ont été retrouvées accumulées dans les *P-bodies* (Durand et al., 2007). En revanche, une surexpression des protéines SMG5, SMG6 et SMG7 ont montré une accumulation importante de ces dernières dans les *P-bodies*, suggérant que probablement la suractivation du NMD conduit à un acheminement des protéines du NMD dans les foyers cytoplasmiques (Durand et al., 2007; Unterholzner and Izaurralde, 2004). Il n'y a aucune preuve qui démontre une possible dégradation des ARNm dans les *P-bodies* dans les cellules de mammifères.

Les facteurs du NMD ainsi que les substrats soumis au NMD transitent par les *P-bodies*. Afin de permettre cette transition, il est possible que des structures soient impliquées, telles que le cytosquelette permettant la régulation des mouvements intracellulaires (Kulkarni et al., 2010). En effet, il a été démontré que la déstabilisation du cytosquelette et de manière plus prépondérante, l'utilisation de perturbateurs des microtubules, notamment la colchicine ou le taxol, entraîne une concentration des facteurs du NMD mais aussi des substrats dans les *P-bodies* (Jia et al., 2017).



#### 4) Les substrats naturels du NMD : la régulation physiologique des ARNm

Le mécanisme de NMD permet de reconnaître et de dégrader des ARNm porteurs d'un codon stop prématuré dans leur séquence. La dégradation de ces ARNm aberrants évite l'apparition d'erreur qui pourrait avoir comme conséquence le développement de différentes pathologies telles que les cancers (Neu-Yilik et al., 2004). Néanmoins, le NMD est capable de réguler de façon post-transcriptionnelle le niveau d'expression de certains gènes afin d'éviter des niveaux protéiques excessivement élevés pouvant être délétères pour la cellule. Ces ARNm régulés physiologiquement par le NMD sont considérés comme étant des substrats naturels de ce mécanisme de dégradation spécifique (Mendell et al., 2004; Neu-Yilik et al., 2004).

Afin d'élucider au mieux le rôle du NMD dans la régulation des ARNm physiologiques, il a été démontré par analyse transcriptomique que l'inhibition du NMD conduit à une variation de 5% de l'expression de certains gènes humains (Mendell et al., 2004). Cette inhibition a été effectuée à l'aide de siRNA dirigés contre certains facteurs du NMD tels que UPF1 et UPF2. Cette variation dans l'expression génétique indique une corrélation entre des transcrits « normaux » et le mécanisme du NMD qui agit méticuleusement de régulateur afin de permettre le bon fonctionnement cellulaire.

- L'influence de l'épissage alternatif sur le NMD

On estime qu'un tiers des isoformes épissées alternativement sont dégradées par NMD. Le mécanisme qui fait le lien entre l'épissage et le NMD s'appelle RUST (*Regulated Unproductive Splicing and Translation mechanism*) et s'appuie sur la régulation par le NMD couplé à l'épissage (Lewis et al., 2003).

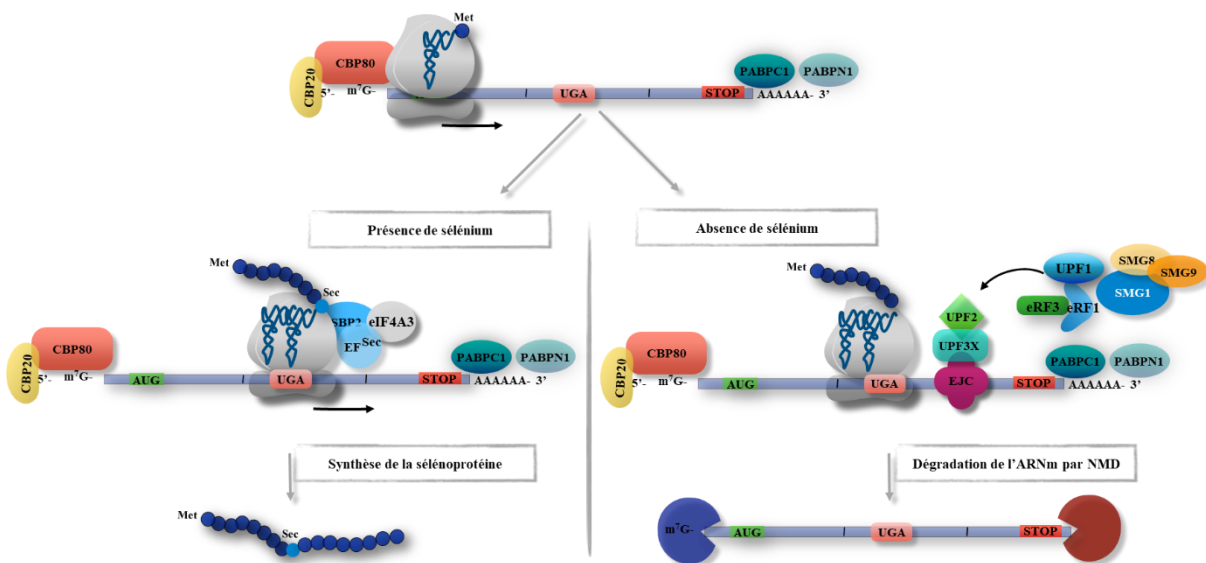
Comme déjà évoqué, l'épissage alternatif touche plus de 95% des transcrits humains (Pan et al., 2008). De ce fait, il est tout à fait possible que l'épissage soit à l'origine de PTC. En effet, environ 35% des produits d'épissage alternatif sembleraient devenir des substrats du NMD (Green et al., 2003; Lewis et al., 2003; Pan et al., 2008). Ainsi de nombreux facteurs d'épissage s'autorégulent via RUST. Par exemple, les membres de la famille des protéines SR, riches en sérine/arginine, ont été montrés pour subir le RUST. Le premier membre de cette famille à avoir été clairement identifié comme subissant le RUST est le facteur SC35 (SRSF2) (Sureau et al., 2001). Sureau et ses collègues ont montré que l'épissage est régulé selon l'expression de SC35 dans la cellule. En effet, lorsque son expression est anormalement élevée, SC35 déclenche des événements d'épissages alternatifs cryptiques dans sa partie 3'UTR. La conséquence est le dépôt d'EJC en aval du codon stop physiologique qui est alors reconnu comme un PTC. L'ARNm SC35 est alors dégradé par NMD ce qui conduit à diminuer la quantité de protéine SC35 dans la cellule pour retrouver un niveau physiologique. Plus généralement, RUST conduit à introduire par épissage alternatif une séquence exonique, appelée aussi *exon cassette poison*, une

séquence intronique ou un épissage dans la région 3'-UTR, avec comme conséquence l'apparition d'un PTC (Lareau and Brenner, 2015; Lejeune et al., 2001; Sureau et al., 2001).

Le deuxième facteur d'épissage qui a été montré pour s'autoréguler par NMD est la protéine PTB (*polypyrimidine tract binding*), qui cause le saut de l'exon 11 si la protéine est surexprimée en introduisant ainsi un PTC dans l'exon 12 du fait d'un décalage du cadre de lecture. Le PTC introduit sera ainsi reconnu par le ribosome, et l'ARNm dégradé par le NMD (Wollerton et al., 2004).

- Le cas des sélénoprotéines

Une autre catégorie de protéines faisant appel au NMD comme mécanisme d'autorégulation est la famille des sélénoprotéines. Les ARNm codant pour ces protéines présentent un codon UGA dans leur séquence en phase avec le codon d'initiation de la traduction (Moriarty et al., 1998; Sun and Maquat, 2002). La traduction en sélénoprotéine ou bien la dégradation du transcrite dépend de la présence de sélénium dans la cellule (*Figure 30*).



*Figure 30 : La régulation de l'expression de la sélénoprotéine.* La présence de sélénium dans la cellule permet la synthèse de la sélénoprotéine. En revanche, l'absence de sélénium conduit à la reconnaissance du PTC et à la dégradation de l'ARNm.

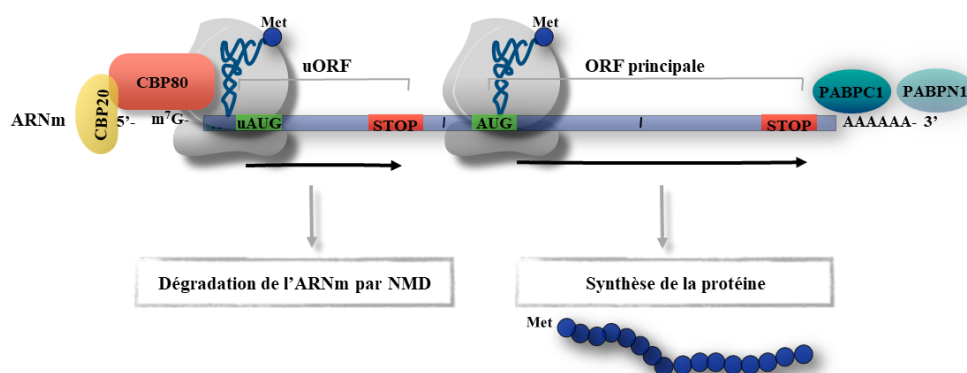
En effet, lorsque le sélénium est présent dans la cellule, un ARNt chargé d'une sélénocystéine (ARNt<sup>(ser)<sup>sec</sup></sup>) qui a été transformée à partir de la sérine (<sup>Ser</sup>), reconnaît le codon UGA de façon spécifique en permettant l'incorporation dans la protéine de la sélénocystéine (<sup>Sec</sup>). Cette incorporation permet de synthétiser la sélénoprotéine. Le recrutement de cet ARNt spécifique est facilité par différents facteurs

protéiques tels que le facteur d'élongation eucaryote spécifique de la sélénocystéine (EF<sup>Sec</sup>) et la protéine SBP2 (*SECIS binding protein 2*) qui sont les deux principaux acteurs. D'autres facteurs peuvent jouer un rôle dans le recrutement de l'ARNt, notamment la phosphoprotéine nucléoline, la protéine ribosomale L30 et le facteur eIF4A3 (*eukaryotic initiation factor A3*) (Labunsky et al., 2014).

En revanche, l'absence de sélénium laisse le codon UGA « découvert » puisque l'ARNt n'est pas recruté sur l'ARNm, et conduit le ribosome à le reconnaître comme un PTC. Le mécanisme de NMD est à cet instant activé en dégradant la séquence d'ARNm qui ne donnera pas de protéine synthétisée (Labunsky et al., 2014; Sun and Maquat, 2002; Zupanic et al., 2016).

- Les ARNm contenant de petites phases ouvertes de lecture dans leur partie 5'UTR :  
uORF

Le NMD est capable de réguler l'expression de certains gènes qui présentent des séquences particulières, notamment la présence d'une petite phase ouverte de lecture dans la partie 5' UTR de l'ARN, appelée aussi uORF (*upstream open reading frame*) (Yepiskoposyan et al., 2011).



*Figure 31* : Les ARNm qui possèdent deux phases ouvertes de lecture. La traduction de la uORF entraîne la dégradation de l'ARNm par le NMD. En revanche, la traduction de l'ORF principale conduit à la synthèse protéique.

Ces ARNm présentent deux phases ouvertes de lecture (ORF) : la principale qui code pour une protéine avec une fonction bien précise, et en amont une deuxième plus petite en 5' (uORF). Les deux phases ouvertes de lecture peuvent être reconnues et traduites par le ribosome mais les destins seront différents et contraires selon l'ORF choisie. En effet, la traduction de la principale phase ouverte de lecture conduit à la synthèse de la protéine en question. Inversement, la traduction de la petite phase ouverte de lecture uORF en 5' fait que le ribosome en arrivant sur le codon stop de cette ORF va le reconnaître comme un PTC du fait de la présence d'EJC en aval, activant ainsi le NMD (von Arnim et al., 2014). L'activation du NMD permet la diminution des niveaux de la protéine principale codée par l'ARNm (*Figure 31*).

- Les transcrits présentant un épissage en 3'

Les transcrits qui présentent un épissage dans la partie 3'UTR sont eux aussi des substrats naturels du NMD (Kalyna et al., 2012; Yepiskoposyan et al., 2011).

Si aucun épissage n'a lieu dans la partie 3'UTR, le NMD ne sera pas activé. Au contraire, si un événement d'épissage a lieu dans la partie 3'UTR, un complexe EJC sera déposé 20-24 nucléotides en amont de l'événement d'épissage et en aval du codon stop physiologique. La présence d'au moins un EJC en aval du codon stop physiologique conduira à activer le NMD sur cet ARNm. Un exemple de ce type de régulation a déjà été décrit puisqu'il s'agit du cas du transcrit codant pour SRSF2 (SC35).

## **5) Les différents facteurs intervenant dans la régulation du NMD**

Les mécanismes moléculaires permettant une régulation du NMD dans des contextes physiologiques sont variés, tels que la présence et l'influence de microARN, mais peuvent aussi être spécifiques à la localisation cellulaire et tissulaire. Une régulation adéquate du NMD est indispensable au bon fonctionnement des organes et également lors des premières étapes du développement embryonnaire (Huang and Wilkinson, 2012; Karam et al., 2013).

- Le cas du microARN-128 régulant le NMD

Un exemple de mécanisme permettant la régulation du NMD est celui lié à des microARN qui agissent sur les séquences codant les facteurs du NMD. Les microARN (*miRNA*) sont de petites séquences d'ARN non codant de 22 nucléotides qui reconnaissent et se fixent sur des séquences précises en interférant ainsi sur le destin de l'ARNm. En effet, les microARN répriment la traduction de ces ARNm et/ou les dirigent vers une possible dégradation. Bruno et ses collègues ont identifiés un microARN capable de réguler l'expression de certains facteurs impliqués dans le NMD, en influençant de cette façon le mécanisme de dégradation (Bartel et al., 2009; Bruno et al., 2011; Karam et al., 2013).

Le microARN en question est le miRNA-128 (ou miR-128), capable d'influencer l'expression génique de façon directe de deux facteurs du NMD dans les cellules humaines et de souris. Ces deux facteurs sont les protéines UPF1 et MLN51, l'une étant la protéine fondamentale à l'activation du NMD et l'autre étant un composant du cœur de l'EJC (Bruno et al., 2011). En effet, la répression de l'expression de UPF1 et de MLN51 cause l'inhibition du mécanisme du NMD. Il a été démontré que le NMD n'est pas tout à fait supprimé mais que des niveaux basaux sont présents, indiquant que le NMD peut continuer son rôle de contrôle-qualité.

Lors du développement embryonnaire, et en particulier pendant le développement cérébral et la maturation neuronale, le miRNA-128 atteint des niveaux très élevés et réprime le NMD afin de permettre la stabilisation des ARNm, cruciaux pour le bon développement du cerveau (Bruno et al., 2011; Sempere et al., 2004).

Le rôle du miRNA-128 n'est pas restreint au développement neuronal car son expression dans le thymus a été démontrée. Le miRNA-128 pourrait ainsi être impliqué dans le développement des lymphocytes T (Bruno et al., 2011).

- Une régulation à feedback du NMD (ou autorégulation)

Les protéines impliquées dans le NMD sont capables de réguler leur expression par autorégulation (ou *feedback*). En effet, il a été démontré que les gènes codants pour les facteurs du NMD étaient capables de provoquer une réponse « négative » sur la transcription et la traduction en présence de quantités importantes de protéines du NMD (Karam et al., 2013).

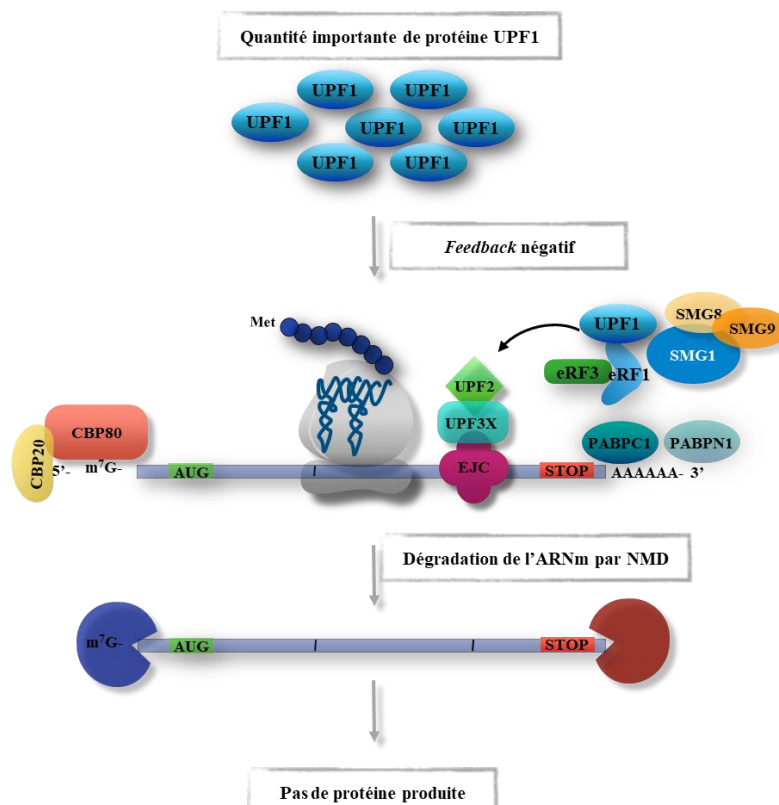


Figure 32 : L'autorégulation de certains ARNm. Un exemple peut être représenté par une quantité importante de protéine présente qui régule négativement l'expression de l'ARNm. Le NMD est alors activé.

Après analyse à l'aide de *microarray*, Mendell et ses collègues ont montré que la déplétion de UPF1 entraînait notamment une dérégulation de certains facteurs, tels que SMG5, et plus précisément une augmentation de la quantité de certains transcrits mais aussi une diminution d'autres transcrits. Cela

indique un lien direct entre les différentes protéines du NMD puisque l'expression d'une protéine peut modifier l'expression d'un autre gène du NMD (Karam et al., 2013; Mendell et al., 2004) (*Figure 32*).

L'ARNm de SMG5 a été entre autres retrouvé surexprimé en réponse à la déplétion d'un autre facteur, la protéine UPF3X, en montrant une nouvelle fois le lien entre les protéines du NMD. Deux équipes, Yepiskoposyan et ses collègues ainsi que Huang et ses collègues, ont montré que le NMD est finement régulé par un système à *feedback* assez complexe. En effet, si le mécanisme du NMD est par exemple bloqué pendant un certain temps dans la cellule, il est possible que les ARNm des protéines telles que les UPF mais aussi les SMG, puissent augmenter en quantité afin de répondre à cet événement et rétablir une activation correcte du NMD (Huang et al., 2011; Yepiskoposyan et al., 2011).

- La compétition entre le NMD et le *STAUFEN-mediated mRNA decay* (SMD)

La régulation du NMD et le correct fonctionnement de ce mécanisme de contrôle-qualité permet de surveiller l'apparition de transcrits aberrants mais aussi de réguler physiologiquement l'expression de certains gènes.

D'autres mécanismes de dégradation des ARN sont présents dans les cellules et il a été démontré que certains d'entre eux peuvent être liés et avoir des rôles complémentaires ou bien entrer en compétition l'un envers l'autre. Un exemple est le *Staufen-mediated mRNA decay* ou *STAUFEN-mediated mRNA decay* (SMD) qui a comme protéine centrale la protéine STAU1 (Staufen-1). La protéine STAU1 se fixe sur les ARNm dans la partie 3'-UTR, plus précisément sur les sites SBS (*Stau1-binding sites*). Fixée sur l'ARNm, elle interagit avec la protéine UPF1 lors de la terminaison de la traduction (Karam et al., 2013; Kim et al., 2005).

UPF1 est donc une protéine commune aux deux mécanismes de dégradation, et pour cette raison, une compétition des événements peut s'instaurer. En effet, Gong et ses collègues ont démontré que les sites d'interaction entre la protéine UPF1 et les deux protéines en question, STAU1 et UPF2, se chevauchent. Le facteur qui interviendra en faveur de l'activation d'un mécanisme par rapport à l'autre, sera uniquement le niveau protéique présent à cet instant. De plus, les deux protéines STAU1 et UPF2 sont mutuellement exclusives, et par conséquent, si l'une est fixée sur UPF1, l'autre ne pourra en aucun cas interagir au même instant. L'abondante présence de la protéine UPF2 permettra de favoriser l'activation du NMD en dépit du SMD, et vice versa, une quantité élevée de STAU1 conduit à une activation de SMD entraînant une inhibition du NMD (Gong et al., 2009).

La compétition entre les mécanismes de dégradation SMD et NMD a été retrouvée dans différents événements physiologiques tels que la myogenèse, mais aussi l'adipogenèse (Cho et al., 2012; Gong et al., 2009).

- L'importance de la phosphorylation dans le mécanisme du NMD

Comme déjà énoncé lors de l'explication et la caractérisation des différents facteurs du NMD, UPF1 et UPF2 sont deux phosphoprotéines, avec une activité dans le NMD qui est dépendante de leur état de phosphorylation. En effet, il a déjà été démontré que l'activation du NMD est déclenchée par la phosphorylation suivie de la déphosphorylation de la protéine UPF1 par les protéines SMG (Chiu et al., 2003; Yamashita et al., 2001).

La phosphorylation de ces deux facteurs du NMD est ainsi fondamentale pour la régulation du NMD puisque l'absence de ce phénomène ne va pas activer la voie de dégradation par NMD du transcrit en question (Okada-Katsuhata et al., 2012). Par rapport à UPF2, nous avons aujourd'hui de nombreuses informations concernant la phosphorylation de UPF1. Ceci a déjà été décrit dans ce même chapitre lors de l'explication des facteurs UPF.

- Le NMD spécifique aux transcrits, aux cellules et aux tissus

Selon le transcrit et la localisation, le NMD sera régulé de façon différente et spécifique. En effet, il a été démontré que le NMD permet de diminuer l'expression de certains ARNm avec une efficacité différente selon le transcrit considéré (Huang and Wilkinson, 2012). C'est l'exemple des ARNm codant les immunoglobulines et le récepteur aux lymphocytes T (TCR) puisque lors du développement lymphocytaire, des PTC peuvent être introduits avec une fréquence très importante (Lambert et al., 2019). Cela est causé par les réarrangements programmés au niveau de l'ADN. En effet, les gènes possèdent des segments V (variable), J (jonction) mais aussi des segments D (diversité) qui peuvent subir une recombinaison aléatoire appelée recombinaison V(D)J et qui peut être la cause de l'apparition de PTC (Connor et al., 1994; Huang and Wilkinson, 2012; Lambert et al., 2020; Li and Wilkinson, 1998b).

Un autre exemple de spécificité dans la régulation du NMD en fonction des cellules et des tissus est l'ARNm codant pour le collagène X chez les patients atteints de chondrodysplasie métaphysaire de Schmid. En effet, le transcrit présente une mutation non-sens qui permet l'activation du NMD et la dégradation de celui-ci uniquement dans les cellules du cartilage mais n'est pas dégradé dans les cellules non cartilagineuses pour une raison qu'il reste encore à déterminer (Bateman et al., 2003).

Les exemples sont nombreux et variés, tels que la différence d'efficacité du NMD dans les tissus de la souris pour l'ARNm possédant le gène *Men1*. Le ratio de transcrits présentant des PTC par rapport aux formes sauvages est très variable selon la localisation tissulaire, suggérant une efficacité du NMD dépendante de la localisation. Plus précisément, une étude a montré que sur 13 tissus de souris, 4 d'entre

eux dont les ovaires, le cerveau, le testis et le cœur présentent une efficacité du NMD très forte pour la dégradation du mutant *Men1* par rapport au transcrit sauvage (avec 16-20% d'efficacité du NMD pour le mutant). En revanche, trois tissus parmi les 13, dont les poumons, l'intestin et le thymus, ont un NMD un peu moins efficace, avec 34-36% de transcrits mutants par rapport au transcrit sauvage (Zetoune et al., 2008).

- La régulation du NMD en réponse à un stress

Différentes études ont montré une corrélation entre la présence d'un stress et l'inhibition du NMD (Gardner, 2010, 2008; Harding et al., 2003; Mendell et al., 2004; Wang et al., 2011a). En effet, Mendell et ses collègues ont montré pour la première fois un lien entre la privation des acides aminés et la répression du mécanisme du NMD. Cet effet a été retrouvé dans plusieurs conditions de stress cellulaire, notamment la privation nutritionnelle, les infections, la privation d'oxygène (ou hypoxie), la présence de ROS (*reactive oxygen species*) et la présence de structures tels que le double brin d'ARN. Tous ces événements sont capables d'induire une inhibition du NMD comme réponse au stress (Gardner, 2010; Karam et al., 2013; Mendell et al., 2004).

Un des mécanismes de stress bloquant l'activation du NMD est la capacité de différentes kinases à phosphoryler un facteur particulier, plus précisément le facteur d'initiation de la traduction eucaryotique eIF2 $\alpha$ .

En effet, le facteur eIF2 $\alpha$  est phosphorylé en réponse à des stimuli variés, notamment la privation des acides aminés à l'aide de la kinase GCN2, mais aussi au stress oxydatif avec les kinases PERK et HRI, l'infection virale avec la kinase PKR. La phosphorylation de cette protéine lors d'un stress a des conséquences sur la modulation du NMD. La cause de cette inhibition par la simple phosphorylation de eIF2 $\alpha$  n'a pas été encore élucidée. La seule information connue est que la protéine eIF2 $\alpha$  phosphorylée entraîne une inhibition globale de la traduction, que ce soit au premier tour de traduction ou les tours suivants (Chiu, 2004; Gardner, 2008; Harding et al., 2003; Karam et al., 2013; Wang et al., 2011a).

- La régulation du NMD durant l'apoptose

Pendant l'apoptose, il a été démontré que les caspases clivent deux facteurs du NMD en les rendant ainsi complètement inactifs. Les protéines clivées sont UPF1 et UPF2 et le clivage entraîne une inhibition du NMD, montrant l'importance des protéines de taille sauvage dans la reconnaissance des PTC et l'activation du mécanisme de dégradation. Toutes ces études ont commencé par l'identification d'un nouvel inhibiteur du NMD, plus précisément un inducteur d'apoptose très utilisé, la staurosporine (Jia et al., 2015).



Des fragments issus des protéines UPF1 et UPF2 sont générés par le clivage induit par les caspases. Entre autres, la surexpression de la région N-terminale de la protéine UPF2 cause une amplification de l'apoptose, et par conséquent une inhibition plus importante du NMD (Jia et al., 2015). Ces observations pourraient donc signifier que la protéine UPF2 possède un lien direct avec l'apoptose, et que la partie N-terminale pourrait permettre l'interaction avec des protéines différentes de celles qui interviennent dans le mécanisme du NMD (Jia et al., 2015; Popp and Maquat, 2015a).

## **6) Les pathologies associées au NMD**

Le mécanisme du NMD est capable de reconnaître un PTC présent dans une séquence d'ARNm et de dégrader ce dernier afin d'éviter la production de protéines tronquées. Selon la localisation du PTC dans la séquence d'ARNm, la protéine, si synthétisée, pourrait être partiellement ou totalement fonctionnelle. En effet, la perte de la partie C-terminale peut entraîner des modifications conformationnelles qui impactent la fonction de la protéine. Dans un certain nombre de cas, la protéine tronquée peut acquérir une nouvelle activité qui peut se révéler être toxique pour la cellule.

La dérégulation ou la perturbation de ce mécanisme de contrôle-qualité peut être à l'origine de pathologies génétiques telles que des maladies neurologiques, des maladies du système immunitaire, des pathologies métaboliques et les cancers. Selon le « défaut » du NMD, c'est-à-dire si l'activation du NMD est trop importante ou bien absente, des pathologies variées vont voir leur apparition (Khajavi et al., 2006; Miller and Pearce, 2014). En effet, il a été montré que l'invalidation des protéines UPF1 et UPF2 est létale au cours du développement embryonnaire chez la souris, démontrant le rôle essentiel du NMD au cours de l'embryogénèse (Medghalchi et al., 2001; Weischenfeldt et al., 2008). La protéine UPF3X apparaît elle-aussi comme une protéine essentielle au bon fonctionnement d'un organisme puisque son absence conduit à des retards dans le développement cérébral (Nguyen et al., 2012; Tarpey et al., 2007; Tzschach et al., 2015). Des retards mentaux ont aussi été rapportés dans des situations d'altérations génomiques impliquant les gènes UPF2, SMG6, eIF4AIII et RNPS1 (Nguyen et al., 2012). Les mutations dans le gène UPF3X/3B entraînent l'apparition de dysmorphisme facial, de problèmes neurologiques tels que l'autisme et la schizophrénie et la sévérité de la pathologie dépend aussi de la quantité de protéine UPF3 produite, puisqu'il a été démontré qu'il peut y avoir une compensation de la protéine UPF3X par la protéine UPF3 (Alrahbeni et al., 2015; Chan et al., 2009).

Les PTC sont retrouvés dans environ 30% des maladies génétiques et peuvent être la conséquence de la présence de mutations non-sens dans 11% des cas, de décalages du cadre de lecture, de la rétention d'une partie ou de la totalité d'un intron (Frischmeyer, 1999; Miller and Pearce, 2014; Mort et al., 2008).

Dans les paragraphes suivants, je vais présenter une partie des pathologies liées au NMD. D'un côté seront décrites des pathologies qui échappent au mécanisme du NMD selon la position du PTC dans la

séquence d'ARNm et de l'autre côté seront exposées des pathologies où le NMD est activé de façon excessive et qui ne présentent aucune protéine synthétisée. Entre autres, l'implication du NMD dans le cancer sera décrite avec son double rôle selon le type de mutation et de cancer (Frischmeyer and Dietz, 1999; Holbrook et al., 2004).

- Les maladies qui « échappent » au NMD : importance de la localisation du PTC et action bénéfique du NMD

Concernant les pathologies génétiques, le NMD peut avoir deux rôles dans la dégradation des transcrits. D'une part, il peut avoir un effet bénéfique et avantageux puisqu'il permet la dégradation d'un ARNm qui pourrait produire une protéine tronquée délétère pour l'organisme, en limitant ainsi les effets d'une mutation négative dominante. Au contraire, si le NMD dégrade l'ARNm qui aurait pu produire une protéine tronquée qui conserve partiellement sa fonctionnalité, cela peut dans certains cas augmenter la sévérité de la maladie (Khajavi et al., 2006; Miller and Pearce, 2014). Des exemples vont être décrits de suite.

Les pathologies échappant à la reconnaissance du PTC par le NMD et la dégradation de l'ARNm sont nombreuses. Afin d'être reconnu comme tel, le PTC doit suivre certaines règles de reconnaissance, et plus précisément doit respecter la règle des 50 à 55 nucléotides en amont d'une jonction exonique. Pour cette raison, sa position est très importante puisqu'elle déterminera la dégradation ou la stabilisation de l'ARNm (Nagy and Maquat, 1998).

C'est le cas de la  $\beta$ -thalassémie, une pathologie génétique liée à un défaut dans le gène de la  $\beta$ -globine souvent lié à la présence de mutations non-sens (Baserga and Benz, 1988). Selon la position du PTC, la sévérité de la maladie sera différente. En effet, les mutations non-sens situées de façon centrale à la séquence d'ARN, et plus précisément dans le deuxième exon de la  $\beta$ -globine, peuvent être reconnues comme PTC par le NMD. Néanmoins, la règle des 50 à 55 nucléotides doit être respectée. L'activation du NMD prévient la synthèse protéique et donne une forme de  $\beta$ -thalassémie autosomique récessive.

Les personnes porteuses de ces mutations ne présentent pas de symptôme. C'est le même cas pour les hétérozygotes dont l'allèle muté n'est pas exprimé, ne manifestent pas de symptôme pathologique en raison de la quantité suffisante de  $\beta$ -globine synthétisée à partir de l'allèle sauvage.

En revanche, lorsque le PTC se situe dans la partie 3' de l'ARNm telle qu'au niveau du dernier exon, le PTC ne sera pas reconnu par le mécanisme de NMD. Une forme tronquée de la protéine  $\beta$ -globine sera produite, qui s'associe à l' $\alpha$ -globine et sera la cause d'une forme d'hémoglobine non fonctionnelle, incapable de transporter correctement l'oxygène au niveau des tissus. Cette forme autosomique dominante est une forme sévère de la  $\beta$ -thalassémie (Baserga and Benz, 1988; Forget et al., 1974; Khajavi et al., 2006; Miller and Pearce, 2014; Thein et al., 1990). Un PTC présent aussi dans le premier

exon de la  $\beta$ -globine permet la synthèse d'un tout petit fragment protéique, mais il semblerait que les conséquences de cette synthèse soient moins critiques par rapport au PTC dans le dernier exon de la  $\beta$ -globine (Figure 33).

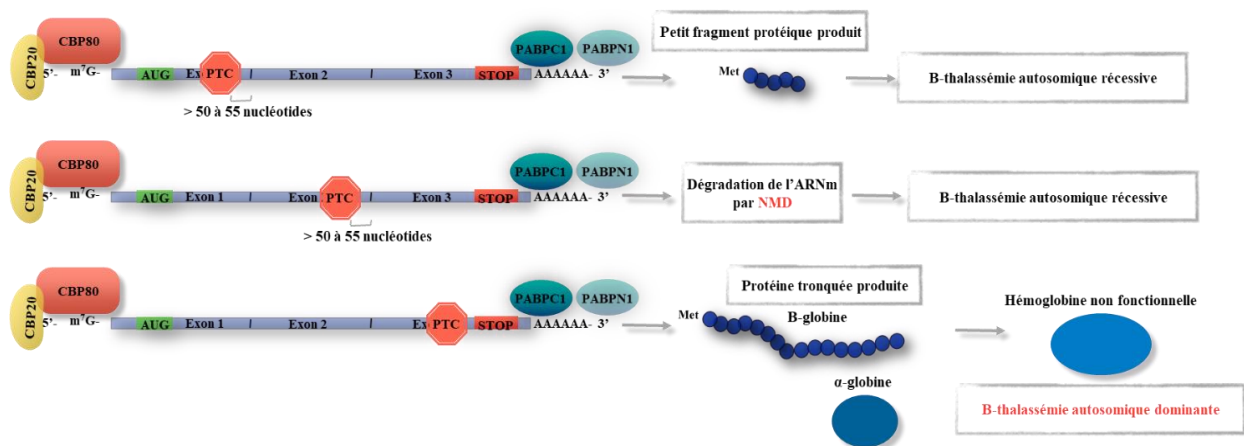


Figure 33 : Le positionnement du PTC sur l'ARNm de la  $\beta$ -globine conduit à une forme de  $\beta$ -thalassémie.

Une autre pathologie qui implique l'apparition d'un PTC causé par une mutation non-sens et qui présente un phénotype différent selon la localisation du PTC dans la séquence, est une maladie causée par une mutation dans le gène SOX10 (SRY-box 10). Le gène SOX10 code pour un facteur de transcription important lors du développement neuronal (Inoue et al., 2004). Comme pour les cas précédents, selon le positionnement du PTC dans la séquence d'ARNm, le NMD peut être plus ou moins actif et être la cause de phénotypes plus ou moins sévères. En effet, lorsque le PTC se situe dans la partie 3' de l'ARN et plus précisément sur le dernier exon, le NMD est incapable de le reconnaître comme tel puisqu'il ne respecte pas les règles établies pour sa reconnaissance. De cette façon, une protéine tronquée est synthétisée en provoquant l'apparition d'une maladie dominante négative très complexe et sévère appelée PCWH caractérisée par une neuropathie périphérique, une leucodystrophie centrale dysmyélinisante, le syndrome de Waardenburg et la maladie de Hirschsprung (Inoue et al., 2004). Au contraire, la localisation du PTC dans la région 5' de l'ARNm entraîne sa reconnaissance par le NMD et la dégradation de l'ARN en question. Le phénotype qui en découle est plus favorable, avec l'apparition d'une pathologie appelée WS4 et caractérisée par la présence du syndrome de Waardenburg et la maladie de Hirschsprung uniquement (Inoue et al., 2007, 2004). Dans ce cas de figure, la protéine codée par SOX10 peut être synthétisée par le seul allèle sauvage mais malheureusement est insuffisante à remplir toutes les fonctions de la protéine. On peut ainsi parler de phénomène d'haploinsuffisance.

- Les maladies causées par l'activation du NMD : action défavorable du NMD

Jusqu'à présent, certaines pathologies ont été décrites dans lesquelles l'inactivation du NMD entraînait l'apparition de phénotypes plus sévères. Dans ces cas, l'activation du NMD selon les règles de reconnaissance des PTC, a une action favorable puisqu'il évite la synthèse d'une protéine qui pourrait avoir des caractéristiques néfastes pour les cellules.

Néanmoins, il existe une classe de pathologies où l'activation du NMD est défavorable au pronostique. En effet, généralement le système du NMD évite la synthèse d'une protéine tronquée pouvant être délétère pour la cellule. Mais dans certains cas, selon la position du PTC dans la séquence et selon le domaine manquant, la protéine tronquée pourrait garder une partie ou la totalité de sa fonction. L'activité du NMD aggrave ainsi le phénotype puisqu'aucune protéine n'est synthétisée (Khajavi et al., 2006; Miller and Pearce, 2014). C'est le cas de pathologies telles que la mucoviscidose, la dystrophie musculaire de Duchenne mais aussi certains cancers où les gènes suppresseurs de tumeurs présentent une mutation (Crawford et al., 2000; Sheppard et al., 1994).

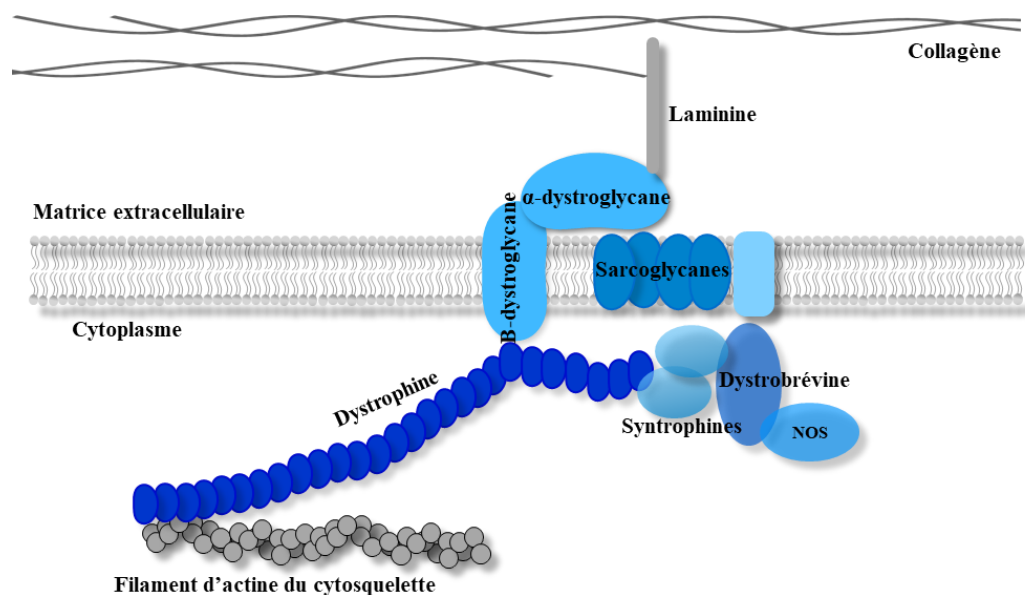
a) Les dystrophinopathies

Certaines dystrophinopathies sont causées par des défauts dans la machinerie du NMD. Ces pathologies représentent une famille de maladies liées à la mutation de la dystrophine, protéine fondamentale pour le fonctionnement musculaire correct.

La dystrophinopathie plus sévère est la dystrophie musculaire de Duchenne, appelée aussi DMD, qui représente une pathologie dégénérative liée au chromosome X (Guiraud et al., 2015; Tuffery-Giraud et al., 2009).

Les mutations de ce gène sont variées mais dans 11% des cas, les mutations non-sens sont retrouvées, entraînant l'apparition d'un PTC dans la séquence. Les trois codons stop prématurés peuvent être retrouvés avec une fréquence différente. En effet, le PTC le plus présent est UGA, suivi de UAG et enfin de UAA (Bladen et al., 2015). Le PTC est à l'origine de l'activation du NMD et de la dégradation de l'ARNm, avec comme conséquence l'absence totale de protéine. Le manque de traduction, et donc de la dystrophine, est la cause d'une importante dégénération musculaire. De façon plus détaillée, l'atrophie, la dégénérescence et la nécrose des muscles squelettiques sont une partie des symptômes qui s'installent progressivement (Guiraud and Davies, 2017).

La dystrophine est une très grande protéine de 427 kDa située juste en dessous de la membrane cellulaire dans les cellules musculaires et de façon minoritaire dans le cerveau. Cette protéine interagit avec différents partenaires tels que les dystroglycane, les syntrophines, les dystrobrevines et les filaments d'actine. A l'aide de ses interactions, elle sert d'intermédiaire entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire stabilisant ainsi le sarcolemme, c'est-à-dire la membrane plasmique des fibres musculaires (Koenig et al., 1988). La dystrophine est composée de 4 principaux domaines : un domaine amino-terminal interagissant avec l'actine, un domaine central *rod* composé de 24 répétitions du motif *spectrin like*, un domaine riche en cystéines possédant des sites d'interactions avec le dystroglycane et un domaine carboxy-terminal interagissant avec la dystrobrevine et la syntrophine (Pichavant et al., 2011). La dégénération musculaire est accompagnée par des déficits intellectuels dus à la dystrophine présente dans le cerveau. Une insuffisance cardiaque et/ou respiratoire apparaît aussientrainant une espérance de vie réduite (*Figure 34*).



*Figure 34* : Complexe des protéines associées à la dystrophine. La dystrophine interagit avec avec les dystroglycane, les syntrophines, les dystrobrevines et les filaments d'actine du cytosquelette.

Les stratégies thérapeutiques actuelles telles que l'utilisation de corticoïdes n'ont malheureusement pas d'évolution positive dans la pathologie (Guiraud and Davies, 2017). Afin de faire face à cette problématique, de nouvelles approches thérapeutiques sont proposées. Concernant les patients atteints de cette pathologie et possédant une mutation non-sens, donc dans 11% des cas, l'inhibition du NMD représente une stratégie prometteuse. En effet, il a été démontré par Chamberlain et ses collègues sur des souris transgéniques qu'une partie de la protéine dystrophine n'est pas nécessaire au bon fonctionnement protéique dans le muscle. La partie manquante entre les exons 70 et 79 est ainsi non indispensable pour la protéine. Cela suggère que l'inhibition du NMD pour les cas où une mutation non-

sens est présente dans les exons 70 à 78 entrainerait la synthèse d'une protéine tronquée de ce domaine mais fonctionnelle. Cette partie manquante contient des sites d'interaction entre la dystrophine et les protéines syntrophine et dystrobrevine (Crawford et al., 2000; Harper et al., 2002). Ces deux protéines peuvent tout aussi bien se localiser à la membrane cellulaire, malgré l'absence du domaine de la dystrophine, probablement grâce aux interactions directes entre la dystrobrevine et les sarcoglycanes (Crawford et al., 2000).

#### b) La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive causée par différents types d'altérations du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Trans-membrane conductance Regulator*) (Harris and Argent, 1993).

Ce gène code pour la protéine CFTR, un canal ionique permettant les échanges des ions Chlorure en gardant le bon équilibre ionique dans la cellule (McCarthy and Harris, 2005). Cette protéine de 170 kDa est présente dans différentes muqueuses telles que la muqueuse respiratoire mais aussi digestive (Paranjape and Mogayzel, 2018). Cette protéine est dépendante de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et présente deux domaines transmembranaires, deux domaines NBD (*nucleotide-binding domains*) qui interagissent avec les nucléotides et un domaine cytoplasmique de régulation R qui peut être phosphorylé (*Figure 35*).

Plus de 1900 mutations de CFTR ont été identifiées aujourd'hui, et elles peuvent être classées en six catégories (Fanen et al., 2014). La plus caractérisée avec 66% des cas est une délétion d'un triplet nucléotidique codant pour la phénylalanine, nommée  $\Delta F508$  et qui conduit à un défaut dans le repliement de la protéine avec pour conséquence sa rétention dans le réticulum endoplasmique (Bobadilla et al., 2002).

Les mutations non-sens représentent environ 10% des cas avec une fréquence différente selon le codon stop prématuré en question (Kerem et al., 1997; Rowntree and Harris, 2003). Les phénotypes qui en découlent sont généralement les plus graves car la protéine est totalement absente puisque le NMD dégrade l'ARNm correspondant.

La mucoviscidose est connue pour l'épaississement et la viscosité importante du mucus au niveau des poumons causés par l'absence de transport des ions Chlorure mais elle représente une problématique importante aussi pour d'autres organes tels que le pancréas, le foie ou le système reproducteur. Généralement s'en suit une réaction inflammatoire importante puisque des infections bactériennes s'installent facilement à cause de la forte viscosité du mucus qui s'accumule de façon progressive dans les voies respiratoires et digestives. Ces infections peuvent être causées par la présence de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et d'autres encore, et sont généralement la cause d'insuffisance respiratoire (Huang and LiPuma, 2016; Lund-Palau et al., 2016).

Concernant les patients atteints de mucoviscidose causée par une mutation non-sens, il n'existe toujours pas de thérapie qui puisse faire face à la faible espérance de vie et à la qualité de vie très difficile. En effet, les seuls traitements disponibles permettent d'améliorer et de soulager la qualité de vie mais beaucoup de limitations sont présentes. Une des premières molécules proposées est l'Ivacaftor. Puis, d'autres molécules sont apparues telles que le Lumacaftor, cette fois-ci pour la délétion  $\Delta F508$ . La combinaison de le Lumacaftor et de l'Ivacaftor a donné un nouveau traitement pour la mucoviscidose chez les patients atteints de la délétion 508 dans le gène CFTR, appelé *Orkambi* ("New drug," 2019) (site du clinicaltrials.gov).

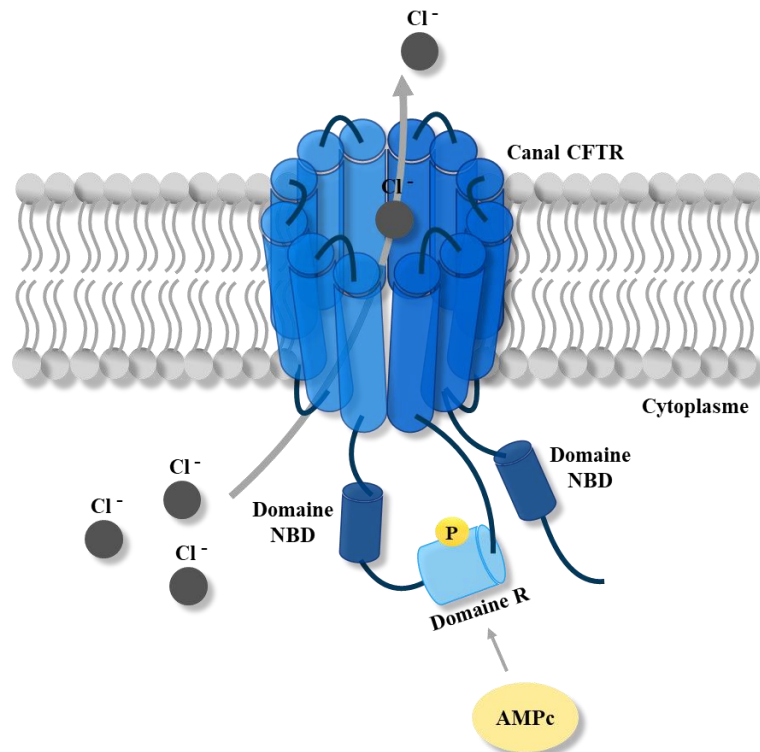


Figure 35 : Représentation du canal CFTR. La protéine CFTR est un canal ionique qui permet les échanges des ions Chlorure afin de garder le bon équilibre ionique dans la cellule.

- Le double rôle du NMD dans le cancer

Le rôle du NMD dans la tumorigenèse est très complexe. En effet, selon la nature de la mutation mais aussi selon le type de tumeur, le NMD peut accroître l'agressivité cancéreuse, ou bien au contraire avoir un rôle protecteur contre le développement de la pathologie (Pawlicka et al., 2020).

Certains cancers ont la capacité d'exploiter le NMD, notamment avec la diminution de l'expression de gènes bien précis tels que les gènes suppresseurs de tumeurs dégradés par le NMD. Physiologiquement, les gènes suppresseurs de tumeurs possèdent la capacité de ralentir la croissance et la division cellulaire, de réparer des erreurs dans l'ADN ou bien d'induire l'apoptose lorsque l'erreur ne peut être corrigée.

Ils protègent ainsi de l'apparition d'un cancer. Mais le développement de mutations dans ces gènes conduit à une progression tumorale (Wang et al., 2018).

Dans d'autres cas, les cancers peuvent réguler l'activité du NMD afin de permettre une adaptation au microenvironnement tumoral. En effet, l'augmentation de l'expression de gènes liés à la réponse au stress entraîne une meilleure adaptation de la tumeur et de la progression tumorale. Dans ce dernier cas, le NMD peut avoir une action protectrice puisqu'il peut dégrader des ARNm aberrants qui pourraient conduire à l'apparition de nouvelles mutations ou bien à produire une protéine tronquée conduisant à des phénomènes de chimiorésistance (Pawlicka et al., 2020).

Aujourd'hui, une meilleure compréhension de l'implication du NMD dans la tumorigenèse permettrait une prise en charge plus adéquate et surtout une meilleure intervention thérapeutique (Popp and Maquat, 2018).

- L'activité du NMD contre la tumorigenèse

L'activité bénéfique du NMD au sein de la tumorigenèse a été montrée après des études sur des mutations invalidantes de gènes codant pour les facteurs du NMD identifiées dans différents types de cancers. De façon spécifique, pour les carcinomes adénocarcinomes du pancréas (ASC) et les tumeurs myofibroblastiques inflammatoires du poumon (IMTs), il a été démontré que des mutations entraînant des altérations de l'épissage dans le gène UPF1 compromettent l'activité du NMD. De plus, certains gènes généralement régulés par le NMD sont retrouvés surexprimés et contribuent au phénotype sévère cancéreux (Liu et al., 2014; Lu et al., 2016; Nogueira et al., 2021).

C'est le cas du gène codant pour MAP3K14 (*mitogen activated protein kinase kinase kinase 14*), impliqué dans la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (*activator of the proinflammatory nuclear factor-kappa B*) et faisant partie des substrats naturels du NMD, qui est surexprimé lorsque le gène codant la protéine UPF1 est muté. Les conséquences de cette surexpression sont la production de chémokines et des infiltrations immunitaires qui caractérisent le type de cancers (Lu et al., 2016). Ces observations cliniques ont été validées par des données expérimentales où la surexpression de UPF1 réduit le nombre et la taille des cellules tumorales en culture par rapport aux lignées contrôles. En effet, une analyse d'expression par *microarrays* dans des cellules d'ostéosarcome humain (U2OS) présentant une inhibition du NMD a démontré que le NMD a la capacité de contrôler l'expression d'une très grande variété de gènes impliqués dans les processus de tumorigenèse, tels que la croissance cellulaire, l'apoptose, la migration cellulaire mais aussi la signalisation de facteurs de croissance (Wang et al., 2011b).

Le processus métastatique pourrait être favorisé par une surexpression de la protéine UPF3 comme cela a été rapporté dans plusieurs cancers (Bao et al., 2020; Shum et al., 2016). En effet, UPF3 en



interagissant avec le facteur UPF2 conduit à inhiber le NMD ce qui entraîne a priori l'expression de gènes oncogéniques réprimés par le NMD.

Cette capacité du NMD à protéger de l'agressivité de la tumeur est visible non seulement par la régulation de l'expression de certains gènes mais aussi par la dégradation de transcrits porteurs de PTC pouvant codés pour des protéines tronquées dominantes négatives favorisant la progression tumorale. C'est le cas du gène suppresseur de tumeurs BRCA1 (*breast and ovarian cancer-susceptibility gene 1*) qui présente des mutations germinales entraînant des cancers mammaires et ovariens. Dans le cas de mutations hétérozygotes dominantes négatives, l'expression d'une forme tronquée du gène BRCA1 cause l'apparition d'un phénomène de chimiorésistance, mais aussi une incapacité à induire l'apoptose et des conséquences négatives. Ces observations suggèrent que la protéine tronquée BRCA1 masque l'activité de la forme sauvage de BRCA1 (Fan et al., 2001; Pawlicka et al., 2020; Perrin-Vidoz, 2002).

Le rôle du NMD dans la tumorigenèse reste encore controversé puisque son action dépend du type cancéreux mais aussi des gènes impliqués.

- L'implication du NMD dans l'agressivité et la progression cancéreuse

Si d'un côté l'activité du NMD peut avoir des effets bénéfiques contre la progression tumorale, de l'autre côté le NMD peut dégrader des transcrits dont le produit conduirait à interférer avec le développement tumoral. C'est le cas général des gènes suppresseurs de tumeurs qui peuvent garder une partie de leur fonctionnalité même si un PTC est présent dans leur séquence (Nogueira et al., 2021; Pawlicka et al., 2020). Des exemples vont être décrits de suite.

Généralement, lors de la tumorigenèse, certaines mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs conduisent à une perte de fonction. La conséquence qui en suit est que le gène est incapable de réguler la croissance cellulaire et ne peut éviter la transformation néoplasique (Wang et al., 2018).

Un exemple de gène suppresseur de tumeurs où l'on peut voir l'apparition de PTC dans la séquence est le gène TP53 codant pour la protéine p53. Le gène TP53 est muté dans plus de 50% des cancers. Parmi ces mutations, les mutations non-sens représentent environ 8% des mutations (Carson and Lois, 1995; Petitjean et al., 2007; Soussi and Wiman, 2015; M. Zhang et al., 2018).

Physiologiquement, la protéine p53 est un facteur de transcription qui assure l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à un stress cellulaire tel qu'un dommage de l'ADN ou à l'apparition d'un phénomène d'hypoxie. En effet, p53 s'accumule dans la cellule et permet la transactivation de gènes cibles tels que CDKN1A (p21), GADD45, Bax, PUMA et d'autres encore, afin d'assurer la pause correcte du cycle cellulaire. Cet arrêt est nécessaire pour la correction du défaut de l'ADN et inhibe la prolifération cellulaire, afin d'éviter la transmission d'erreurs. Si l'erreur ne peut être corrigée, p53 se charge de

conduire la cellule vers l'apoptose (Harris and Levine, 2005). En absence de stress, l'expression de p53 est réduite due à sa dégradation par le protéasome après ubiquitination par la protéine E3 ubiquitine ligase Mdm2. L'inactivation du gène TP53, et plus précisément la dégradation des transcrits codant la protéine p53, favorisent la progression tumorale puisqu'aucune protéine p53 n'est présente. En effet, une possible thérapie contre les cancers dus aux mutations non-sens du gène TP53 serait d'induire une inhibition du NMD afin de rétablir l'expression d'une protéine p53 tronquée. Cette protéine tronquée pourrait être partiellement ou totalement fonctionnelle, afin de faire face à l'agressivité de la tumeur (Harris and Levine, 2005; Martin et al., 2014). La mutation doit néanmoins avoir une position spécifique afin de permettre la synthèse d'une protéine tronquée, manquante d'une petite partie ou bien d'une partie non nécessaire à la fonction.

Un autre exemple est donné par la protéine d'adhésion E-cadhérine qui retient partiellement sa fonction lorsqu'elle est sous forme tronquée et manquante de sa partie C-terminale, plus précisément manquante des derniers 73 acides aminés. Les mutations non-sens dans le gène CDH1 codant pour la E-cadhérine représentent un pourcentage très élevé. En effet, 80% des mutations provoquant l'apparition de cancers gastriques tels que le cancer gastrique héréditaire diffus HDGC sont dû à l'apparition de PTC (Karam et al., 2008; Kaurah et al., 2007; Sasaki et al., 2000). Il a été démontré que les mutations entraînant l'activation du NMD avec comme conséquence la dégradation de l'ARNm de l'E-cadhérine 1 induisaient un développement précoce de la tumeur par rapport aux mutations échappant au NMD. En effet, le NMD est incapable de reconnaître les mutations présentes à l'extrémité 3' de l'ARNm avec comme conséquence la production d'une protéine tronquée. Les patients présentant ce cas de figure ont des risques réduits de développer la pathologie. Ces observations suggèrent que la présence d'une éventuelle protéine tronquée codée par un gène suppresseur de tumeurs est capable de limiter les effets néfastes de la tumeur par rapport à l'absence totale de la protéine en question. La perte de contrôle dans les processus apoptotiques mais aussi dans la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN entraîne l'apparition et la transmission d'erreurs conduisant à une transformation maligne (Karam et al., 2008; Kaurah et al., 2007; Sasaki et al., 2000).

Les approches thérapeutiques pour la correction des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs ont vu un développement récent avec différentes stratégies proposées. Par exemple, l'inhibition du NMD serait une stratégie non négligeable puisqu'elle permettrait de réexprimer des gènes suppresseurs de tumeurs capables d'avoir une partie de leur fonctionnalité et faire face à la progression tumorale. Ces approches vont être traitées dans un deuxième temps (Pawlicka et al., 2020).

- La modulation du NMD dans le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral semblerait induire une atténuation du NMD afin d'augmenter la progression cancéreuse mais aussi son adaptation. En effet, pendant la croissance incontrôlée de la

tumeur, les nutriments, les vaisseaux sanguins ainsi que l'environnement autour des cellules cancéreuses devient « insuffisant », c'est-à-dire que l'environnement n'est plus capable de subvenir aux besoins des cellules. Cette situation donne naissance à un environnement hypoxique, déprivé de nutriments, avec la production de ROS mais aussi la présence de stress du réticulum endoplasmique (ER), entraînant ainsi la phosphorylation de la protéine eIF2 $\alpha$  et causant l'inhibition du NMD (Gardner, 2008; Giampietri et al., 2015; Karam et al., 2015; Nogueira et al., 2021; Wang et al., 2011b). L'inhibition du NMD causée par les stress permet une stabilisation et une expression importante de différents transcrits codant pour des facteurs répondant aux stress, fondamentaux pour les cellules cancéreuses à survivre aux conditions adverses de l'environnement tumoral (Wang et al., 2011b).

Un exemple de réponse au stress avec comme conséquence l'inhibition du NMD est la surexpression de l'ARNm du gène ATF4 dans des tumeurs solides. L'ARNm en question est généralement une cible du NMD mais la déprivation de nutriments ainsi que le stress oxydatif entraîne l'expression de ATF4 permettant aux cellules cancéreuses de proliférer malgré les conditions désavantageuses (Shi et al., 2019).

Il reste encore beaucoup à découvrir de cette relation entre le NMD et l'adaptation des cellules au microenvironnement tumoral.

## **7) Les stratégies proposées pour restaurer l'expression d'un ARNm porteur d'un PTC**

Environ 30% des maladies génétiques sont causées par l'apparition d'un PTC dans la séquence d'ARN, dont 11% des cas sont dues à des mutations non-sens et beaucoup d'entre elles ne possèdent pas encore de traitements satisfaisants (Frischmeyer, 1999; Miller and Pearce, 2014; Mort et al., 2008).

Afin de trouver une possible voie thérapeutique, la première possibilité est d'interférer avec la reconnaissance des PTC sur les ARNm. Cette interférence permettrait d'un côté de restaurer l'expression d'un gène dont l'absence est la cause de la pathologie tel que les gènes suppresseurs de tumeurs ou bien le gène CFTR dans la mucoviscidose. D'un autre côté, l'inactivation du NMD permettrait l'expression aussi de substrats naturels nécessaires au bon fonctionnement de la cellule mais aussi à l'activation de processus biologiques tels que l'apoptose (Martin et al., 2014; Nogueira et al., 2021).

Dans l'intention de corriger les mutations non-sens, différentes approches thérapeutiques ont été proposées. La première stratégie est celle d'induire un saut d'exon à l'aide d'oligoribonucléotides anti-sens afin d'exclure l'exon contenant le PTC de l'ARNm (Dominski and Kole, 1993; Kole and Krieg, 2015; Sierakowska et al., 1996; Wilton et al., 1999). Une autre approche est l'inhibition du NMD permettant la synthèse d'une protéine tronquée qui pourrait garder une partie ou la totalité de son activité, en faisant bien attention que la protéine n'ait pas d'effets toxiques pour la cellule. Enfin, une autre

technique est l'activation du mécanisme de translecture, notamment à l'aide de molécules permettant la synthèse d'une protéine de taille sauvage (Bordeira-Carriço et al., 2012; Martins-Dias and Romão, 2021; Palma and Lejeune, 2021; Trzaska et al., 2020).

Les trois stratégies thérapeutiques pour la correction des mutations non-sens vont être décrite de suite.

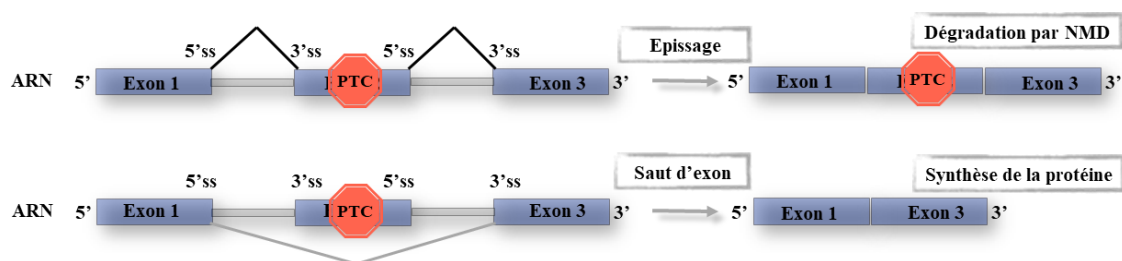
- Induire le saut de l'exon ou *exon skipping*

Après la transcription, l'ARNm doit subir différentes étapes de maturation et doit être exporté dans le cytoplasme afin d'être traduit en protéine. Un des événements de la maturation de l'ARN pré-messager en ARN messenger est l'épissage qui conduit à l'élimination de séquences introniques. Différentes isoformes peuvent être produites à partir d'une même séquence d'ARN pré-messager selon les régions présentes au final dans l'ARNm.

Une stratégie thérapeutique proposée est l'induction du saut de l'exon, plus précisément faire en sorte que lors de l'épissage, l'exon où se trouve la mutation soit exclus de l'ARNm. La particularité de cette approche est qu'elle ne vise pas uniquement les mutations non-sens, mais aussi d'autres types de mutations pouvant avoir les mêmes conséquences comme des insertions, des délétions, ou des mutations faux sens (Dominski and Kole, 1993; Sierakowska et al., 1996; Wilton et al., 1999).

Afin de moduler les profils d'épissage, des oligonucléotides antisens sont utilisés. Ces petites séquences d'acide nucléique viennent masquer les sites d'épissage entourant l'exon dans lequel se trouve le PTC (Takeshima et al., 2006).

Le masquage peut se faire soit en 3' soit en 5' (3'ss ou 5'ss) soit sur les deux sites entourant l'exon à exclure. Le site « masqué » ne sera plus reconnu par le spliceosome conduisant au saut de l'exon (Li et al., 2018) (*Figure 36*).



*Figure 36* : Induire le saut de l'exon comme stratégie pour l'expression de l'ARNm. L'épissage constitutif a comme produit final un ARNm porteur d'un PTC qui est dégradé par le NMD. Le saut de l'exon conduit à un ARNm qui ne porte plus le PTC et pourra être traduit en protéine.

Il est très important que la région manquante ne soit pas fondamentale au rôle de la protéine, puisque cela entraînerait des conséquences désastreuses. Dans le cas de la myopathie de Duchenne, il a été montré que la partie centrale correspondant au domaine *rod* qui est composé de 24 répétitions du motif

*spectrin like* peut être amputé de plusieurs répétitions sans que cela n'affecte la fonction de la dystrophine (Aartsma-Rus and van Ommen, 2010; Lu et al., 2003; Wilton et al., 1999). Par conséquent, le saut d'un ou plusieurs exons codant ces répétitions peut être envisagé comme approche thérapeutique.

Un autre critère à prendre en compte pour définir une approche par saut d'exon est que l'exon qu'on veut exclure doit avoir un nombre de nucléotides qui est un multiple de trois afin de ne pas induire un décalage du cadre de lecture.

De nombreuses industries pharmaceutiques ont réussi à développer des oligonucléotides antisens ou molécules capables d'induire un saut de l'exon. C'est le cas pour la dystrophie musculaire de Duchenne où le premier oligonucléotide a été développé, le *Drisapersen*, par l'industrie *Propensa Holding*. Cet oligonucléotide est un 2'O-méthyl-phosphorothioate (2'OMePS) qui assure le saut de l'exon 51 de la dystrophine (Kole and Krieg, 2015; Voit et al., 2014).

Aujourd'hui, contre la dystrophie musculaire de Duchenne, trois traitements induisant le saut de l'exon ont été approuvés. C'est le cas de *Exondys 51*, appelé aussi *Eteplirsén*, développé par *Sarepta Therapeutics*, sous forme de phosphorodiamidate oligomère morpholino (PMO), qui permet le saut de l'exon 51 (Kole and Krieg, 2015; Lim et al., 2017).

Puis, pour le saut de l'exon 53, le *Vyondys 53*, appelé aussi *Golodirsén*, a été proposé par encore une fois *Sarepta Therapeutics* et enfin le *Viltepro* ou *viltolarsén*, développé par *Nippon Shinyaku*, a été récemment approuvé par NS Pharma (Heo, 2020; Scaglioni et al., 2021).

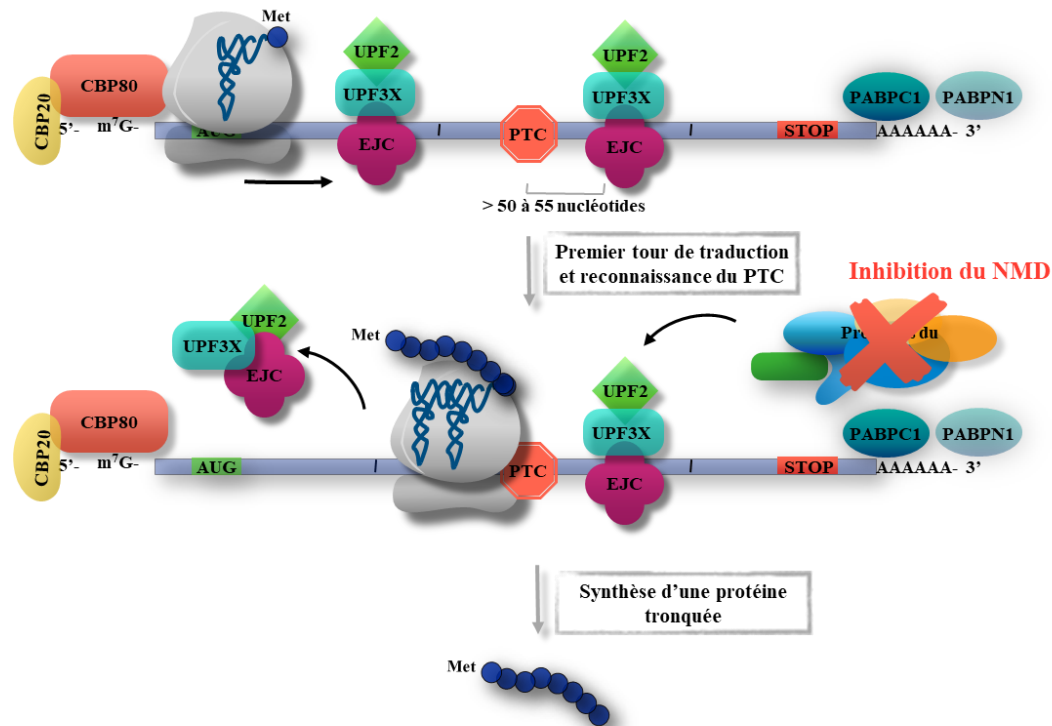
Il existe néanmoins différentes problématiques non négligeables. En effet, le saut de l'exon doit permettre de récupérer la phase ouverte de lecture originale et éviter à tout prix le décalage du cadre de lecture qui causerait des problématiques supplémentaires.

Un autre désavantage est qu'il est impossible de maîtriser le nombre d'exons qui sont éliminés, et de ce fait, la région manquante peut être plus ou moins importante. En effet, la protéine synthétisée doit conserver partiellement ou totalement sa fonction malgré la région absente afin que cette stratégie puisse garder son intérêt (Aartsma-Rus and van Ommen, 2010).

- Inhibition du mécanisme de NMD

Certaines pathologies sont causées par la présence d'un PTC dans la séquence d'ARNm qui est reconnu comme tel par le NMD et aucune protéine n'est alors synthétisée. Dans certaines situations, une quantité minimale de protéine synthétisée, même tronquée, pourrait être suffisante à diminuer la sévérité de la pathologie. Pour cela, l'inhibition du NMD représente une stratégie convenable pour l'expression d'une protéine tronquée. Cette approche cependant ne peut être limitée qu'à un nombre restreint de patients car la position de la mutation non-sens doit permettre la synthèse d'une protéine tronquée fonctionnelle

après inhibition du NMD. Cela signifie que la partie C-terminale manquante doit être aussi courte que possible et ne pas être absolument requise pour la fonction de la protéine (*Figure 37*).



*Figure 37* : L'inhibition du NMD conduit à la synthèse d'une protéine tronquée.

L'inhibition du NMD présente principalement trois intérêts thérapeutiques dans le cancer (Lejeune, 2016; Nogueira et al., 2021). Le premier intérêt de cette stratégie est la capacité à réexprimer des gènes suppresseurs de tumeurs porteurs d'un PTC. En effet, c'est le cas de nombreux cancers présentant des mutations non-sens avec l'absence d'expression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53, PTEN mais aussi BRCA1 par exemple. La possible synthèse d'une protéine tronquée telle que p53, qui pourrait garder une partie de sa fonctionnalité, conduirait à des événements de protections tels que l'activation de l'apoptose en présence d'un inducteur et faire face aux événements favorisant la progression tumorale. Les inducteurs d'apoptose pouvant être utilisés sont par exemple le 5-fluorouracil, la staurosporine ou d'autres tels que la doxorubicine (Lejeune, 2016; Nogueira et al., 2021).

Le NMD ne dégrade pas uniquement les transcrits aberrants mais possède aussi la capacité de réguler l'expression de substrats naturels. Parmi ces substrats naturels, des protéines apoptotiques ou toxiques sont retrouvées telles que GADD45 et CDKN1A/p21. L'inhibition du NMD conduit ainsi à la stabilisation de ces substrats naturels et donc à leur expression ce qui pourrait entraîner un effet anti-tumoral (Lejeune, 2016; Nogueira et al., 2021; Pawlicka et al., 2020).

Une autre caractéristique intéressante dans l'inhibition du NMD est l'activation du système immunitaire. L'expression d'ARNm porteurs d'un PTC peut entraîner une réponse antigénique. En effet, il a été démontré que l'accumulation de nombreuses mutations dans les cellules cancéreuses entraînent

l'apparition de PTC et lorsque le NMD est inhibé, les protéines synthétisées se retrouvent dégradées en petits peptides et présentés à la surface des cellules par le complexe majeur d'histocompatibilité I. Dans ce cas, les peptides correspondant aux parties C-terminales aberrantes seront alors reconnus par les cellules T comme des peptides du non-soi induisant une activation du système immunitaire (Gilboa, 2013; Lejeune, 2016; Pastor et al., 2010).

L'inhibition du NMD peut être réalisée par exemple à partir de siRNA dirigés contre les gènes codant pour les facteurs du NMD ou bien par l'utilisation de molécules chimiques inhibitrices du NMD.

Parmi les molécules inhibitrices du NMD, des inhibiteurs de la traduction sont retrouvés, ce qui n'est pas si étonnant vu le lien entre le NMD et la traduction (voir partie 2 de ce même chapitre). Certains inhibiteurs de la traduction possédant une influence sur l'efficacité du NMD sont par exemple la cycloheximide (CHX), l'émétine, la puromycine, et la patéamine A (PatA) (Carter et al., 1995; Dang et al., 2009; Durand et al., 2007; Lejeune, 2016; Pawlicka et al., 2020; Popp and Maquat, 2015b). Le mécanisme d'action de ces inhibiteurs est variable selon la molécule en considération, mais un exemple est celui de la cycloheximide qui rend le ribosome incapable de continuer la phase d'élongation de la traduction et le PTC ne peut être reconnu par la machinerie traductionnelle (Carter et al., 1995).

Avec un regard thérapeutique, il est difficile de croire à l'utilisation d'inhibiteurs de traduction pour des cas cliniques puisque l'arrêt de la traduction entrainerait des effets secondaires non négligeables. La toxicité causée par ces molécules avec une faible efficacité rend ainsi ces inhibiteurs non utilisables.

Mais les inhibiteurs de la traduction ne sont pas les seules molécules à avoir un effet sur la régulation du NMD. D'autres molécules ont été identifiées, telles que la wortmannine et la caféine présentant un mode d'action similaire (Usuki et al., 2004). Dans ce cas, l'inhibition du NMD est la conséquence de l'inhibition de la protéine kinase SMG1. Certains composants de la famille des antibiotiques aminoglycosides tels que la généticine (G418) ont été identifiées comme étant des inhibiteurs du NMD (Correa-Cerro et al., 2005; Gonzalez-Hilarion et al., 2012).

D'autres classes de molécules ont été étudiées au fil du temps avec l'identification d'une nouvelle molécule en 2007 faisant partie de dérivés d'indoles polycycliques. La molécule en question est appelée NMDI-1 (*NMD Inhibitor 1*). Durand et ses collègues ont démontré que l'inhibition du NMD était causée par la perte d'interaction entre la protéine UPF1 et SMG5, protéine impliquée dans la déphosphorylation de UPF1. Cette perte d'interaction entraîne une stabilisation de la forme hyperphosphorylée de UPF1 avec comme conséquence une concentration de cette dernière dans les *P-bodies* (Durand et al., 2007). Malheureusement, l'utilisation de NMDI-1 comme stratégie thérapeutique est limitée en raison de la structure de la molécule, caractéristique des agents intercalants de l'ADN (Hendry et al., 2007).

En 2012, l'équipe a découvert une molécule appelée Amlexanox permettant de stabiliser les ARNm porteurs d'un codon stop prématuré. Afin de tester son efficacité sur l'inhibition du NMD, différents

gènes porteurs de PTC ont été étudiés tels que les gènes TP53, CFTR et DMD. L'inhibition du NMD atteint une valeur deux fois plus élevée que pour les cellules contrôles (Gonzalez-Hilarion et al., 2012). Deux ans après, la molécule NMDI14 découverte par Martin et ses collègues montre une inhibition sept fois plus importante que le niveau basal (Martin et al., 2014).

Cette approche thérapeutique peut avoir des avantages tels que l'expression d'une protéine tronquée totalement absente pour certaines pathologies comme la mucoviscidose ou la DMD. Entre autres, le PTC doit être suffisamment localisé vers l'extrémité 3' afin que la protéine synthétisée ne présente pas de délétion importante de la région C-terminale.

Mais comme toute technique, elle présente aussi des inconvénients puisque l'inhibition du NMD n'est pas spécifique d'un seul ARNm. Les substrats naturels sont aussi la cible du NMD et la dérégulation de leur expression pourrait être la cause d'effets secondaires.

- Activation de la translecture

La translecture est un mécanisme conduisant le ribosome à ne pas reconnaître un codon stop prématuré afin de poursuivre la traduction de la phase ouverte de lecture originale. En effet, l'utilisation par exemple de molécules favorisant l'entrée d'un ARNt sur le site A du ribosome lorsque celui-ci pause sur un PTC conduit à la synthèse d'une protéine de taille sauvage qui diffère au maximum d'un acide aminé. Aujourd'hui, la translecture représente une approche thérapeutique innovante et prometteuse.

Cette approche sera traitée de façon détaillée dans le chapitre IV avec l'écriture de la revue (Palma and Lejeune, 2021).

En conclusion, toutes les stratégies évoquées pour la correction des mutations non-sens présentent des points faibles. Une des solutions pour surmonter ces problématiques pourrait être la combinaison de ces approches, telle que l'inhibition du NMD avec l'activation de la translecture. En effet, l'inhibition du NMD permettrait une stabilisation des ARNm porteurs d'un PTC, substrats pour la translecture. La translecture pourrait ainsi avoir lieu sur une quantité plus élevée d'ARNm conduisant à une synthèse de protéine transclue plus importante.



## IV. La traduction de l'ARNm et le mécanisme de translecture

Pour bien fonctionner, la cellule nécessite la synthèse de plusieurs milliers de protéines ayant un rôle bien précis. La production des protéines est l'aboutissement d'une expression génique constituée de plusieurs étapes finement régulées. La toute première étape consiste en la transcription de séquences d'ADN portant l'information génétique en un intermédiaire, c'est-à-dire l'ARN qui va subir des étapes de maturation et d'export vers le cytoplasme. Les phases de maturation ont été décrites dans le chapitre II. L'ARNm est alors reconnu par la machinerie ribosomique afin d'être traduit en protéine (Proudfoot et al., 2002).

### 1) La machinerie ribosomique

Le ribosome est l'élément principal permettant de lire la séquence de nucléotides et de la traduire en acides aminés composant la protéine. Le ribosome est constitué de deux sous-unités, une grande et une plus petite, appelées respectivement chez les eucaryotes 60S et 40S. Les deux sous-unités ont des fonctions différentes mais l'une ne peut fonctionner sans l'autre. La petite sous-unité 40S assure la reconnaissance exacte du codon sur l'ARNm par l'ARN de transfert (ARNt ou *tRNA*), et plus précisément avec l'anticodon correspondant. Cette interaction est fondamentale puisqu'elle assure l'insertion des acides aminés codés par l'ARNm selon un ordre bien défini. La grande sous-unité 60S se dédie à la formation des liaisons peptidiques entre l'acide aminé nouvellement recruté au ribosome et la séquence peptidique grâce au centre ribosomal de la peptidyl-transférase (*peptidyl-transferase centre*) (Jackson et al., 2010; Sonenberg and Hinnebusch, 2009; Steitz, 2008).

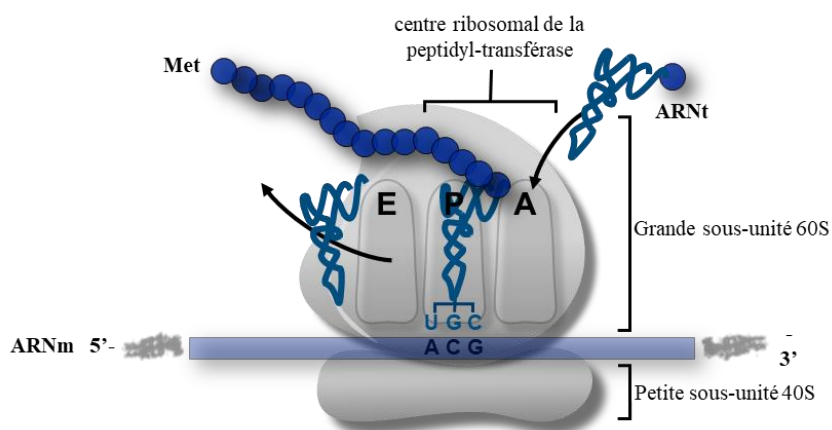


Figure 38 : La machinerie ribosomique. Le ribosome, composé des sous-unités 60S et 40S, scanne l'ARNm afin de le traduire en peptide. L'anticodon de l'ARNt chargé de l'acide aminé reconnaît le

codon présent sur l'ARNm dans le site A et insert l'acide aminé dans la chaîne polypeptidique naissante dans le site P du ribosome. Une fois que l'ARNt n'est plus chargé, il traverse le site E afin de pouvoir se détacher du ribosome et de l'ARNm.

L'assemblage des deux sous-unités donne naissance à la machinerie ribosomique et celle-ci présente trois sites de fixation des ARNt : le site A (site *Aminoacyl*) où l'ARNt-aminoacyl présentant l'acide aminé qui doit être incorporé au peptide se fixe initialement, le site P (site *Peptidyl*) qui représente le site intermédiaire où l'ARNt-peptidyl est positionné pour la liaison peptidique, et le site E (site *Exit*) où l'ARNt désacétylé se situe avant sa dissociation avec le ribosome (Steitz, 2008; Wilson and Doudna Cate, 2012) (*Figure 38*).

La synthèse protéique est composée de trois étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction. Les différentes étapes de la traduction chez les eucaryotes vont être décrites de suite.

## 2) Les étapes de la traduction

- L'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction nécessite au moins neuf facteurs d'initiation de la traduction (*eukaryotic initiation factors* ou eIFs), qui correspondent aux protéines eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4E, eIF4G et eIF5. L'initiation comprend deux grandes étapes subdivisées en plus petites au fur et à mesure des protéines qui sont recrutées. La première phase voit la formation du complexe d'initiation 48S où le premier ARNt chargé est positionné sur le site P de la petite sous-unité ribosomique 40S. Le positionnement de l'ARNt dans le site P est dû à la reconnaissance et à l'interaction entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'ARNt. La deuxième phase de l'initiation permet de relier le complexe d'initiation 48S avec la grande sous-unité ribosomique 60S, afin de former le ribosome 80S (Jackson et al., 2010).

Le premier tour de traduction, ou *pioneer round of translation*, a été décrit tardivement par rapport aux tours de traductions qui lui succèdent (*steady-state rounds*) (Y. Ishigaki et al., 2001).

En effet, si pour les tours qui suivent les informations sont nombreuses, pour le premier tour il reste encore des choses à découvrir. La première différence entre les deux est visible avec les protéines qui sont déposées au niveau de la coiffe et au niveau de la queue poly-A. Plus précisément, lors du premier tour de traduction se trouve le complexe protéique CBC sur la coiffe, composé des protéines CBP20 et CBP80 et on peut parler de tour de traduction « CBP80 dépendant ». En revanche, après le premier tour de traduction, le complexe CBC est remplacé par la protéine eIF4E, définissant les tours de traduction « eIF4E dépendants » (Maquat et al., 2010). Au niveau de la queue poly-A, après l'export de l'ARNm

sont présentes les protéines PABPN1 et PABPC1, où PABPN1 étant une protéine nucléaire sera remplacée par PABPC1 pour les tours de traduction suivants (*Figure 39*).

Lors du premier tour de traduction et avant le positionnement du ribosome sur la séquence d'ARNm, un premier complexe ternaire est formé, appelé complexe de pré-initiation 43S. Ce complexe 43S est constitué de la sous-unité 40S, des facteurs eIF1, eIF1A et eIF3, ainsi que du complexe eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> (Hashem et al., 2013; Jackson et al., 2010; Steitz, 2008).

Les protéines eIF4A (*DEAD-box RNA helicase*), eIF4B ainsi que eIF4G, qui constitue une plateforme d'ancrage pour d'autres protéines, ont été retrouvées fixées sur l'ARNm lors du premier tour. La protéine eIF4B interagit avec l'ARNm et a la capacité à stimuler l'activité hélicase de eIF4A, avec comme conséquence le déroulement de l'ARNm. Cet effet rend l'ARNm plus stable et « lisible » pour la machinerie ribosomique qui va y être déposée.

Le dépôt du complexe 43S sur l'ARNm dans la région 5'-UTR donne vie à un nouveau complexe, appelé complexe 48S. Ce nouveau complexe ribosomique formé commence à scanner l'ARNm, et plus particulièrement la région 5'-UTR vers l'extrémité 3' jusqu'à atteindre le codon d'initiation de la traduction (très souvent AUG) présentant un « environnement » ou contexte de séquence approprié (Eliseev et al., 2018; Kozak, 1986). Ce contexte nucléotidique favorable est représenté par la séquence de Kozak, une séquence consensus qui est la suivante : GCC(A/G)CCAUGG. Les facteurs eIF1, eIF2 et eIF5 ainsi que du tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, c'est-à-dire du premier ARNt qui compose les protéines, permettent la reconnaissance de cette séquence. Lorsque l'appariement codon-anticodon est validé entre le premier ARNt et le codon AUG, eIF5 hydrolyse le GTP d'eIF2, entraînant le détachement des facteurs eIF1, eIF3 et eIF5.

La phase de « *scanning* » présente deux processus connectés entre eux : le premier est le déroulement de possibles structures secondaires de l'ARNm dans la région 5'UTR et le deuxième permet le mouvement du ribosome tout le long de la séquence nucléotidique (Jackson et al., 2010; Pestova et al., 2001).

Une autre protéine intervenant dans la phase d'installation de la machinerie traductionnelle sur l'ARNm est la protéine DHX29 (*DExH-box helicase 29*) qui se fixe sur la sous-unité 40S et semble augmenter la processivité du ribosome, c'est-à-dire sa capacité à avancer et à lire la séquence d'ARNm (Hashem et al., 2013; Pisareva et al., 2008).

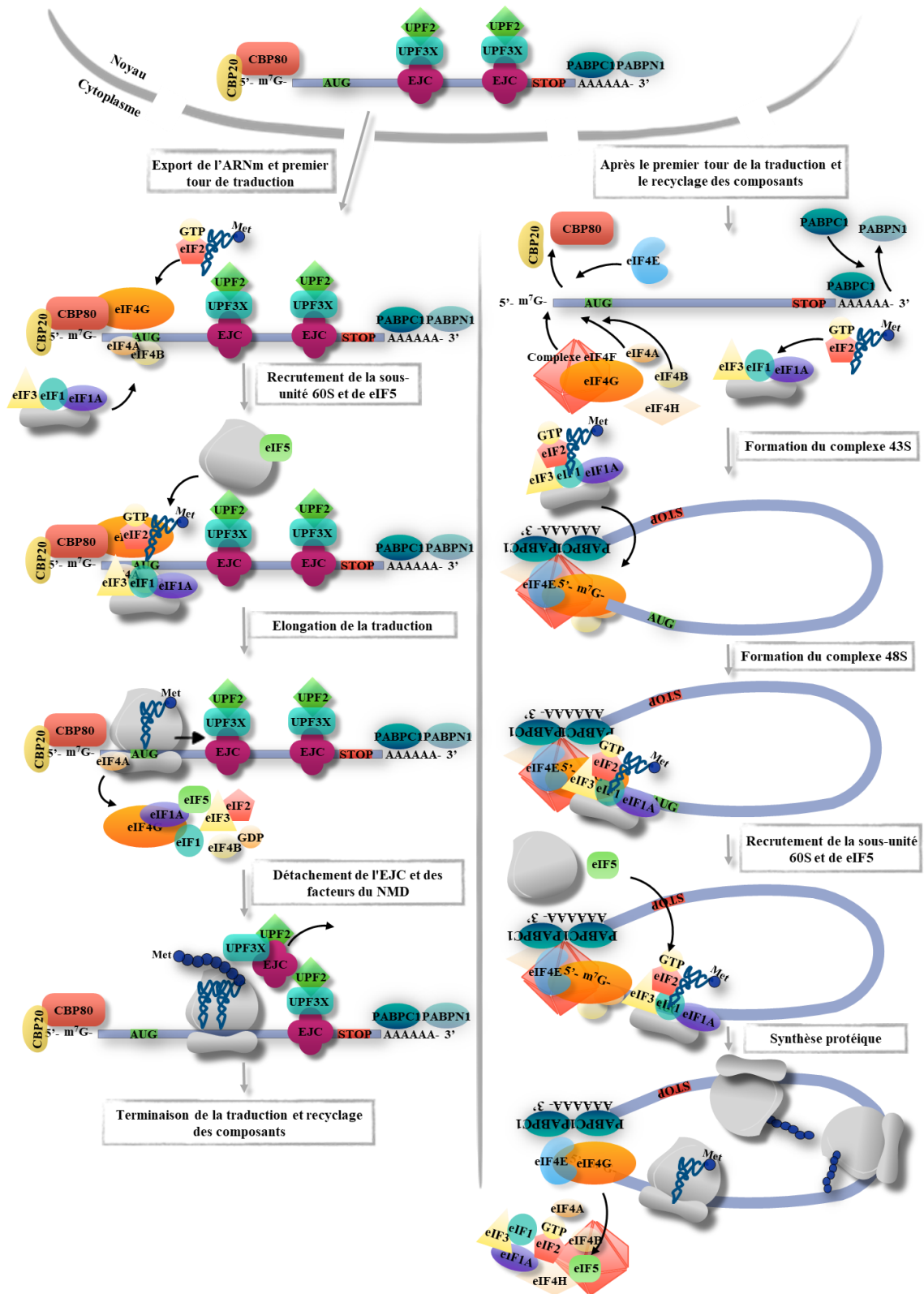


Figure 39 : L'initiation de la traduction. A gauche, le premier tour de traduction est représenté. A droite, les tours suivants de la traduction sont schématisés.

Lors de la lecture du ribosome, la particularité du premier tour de traduction est que la machinerie ribosomique est capable de détacher les EJC présents sur l'ARNm, déposés lors de l'épissage des exons au niveau des jonctions exoniques. Les tours suivants ne présenteront pas de complexes EJC.

Après la fin du premier tour de traduction et après le recyclage des différents composants qui sera détaillé lors de l'explication de la terminaison de la traduction, le nouveau tour peut avoir lieu. La seule particularité en plus des connaissances du premier tour de traduction est qu'après la formation du complexe 43S, l'ARNm est reconnu par le complexe eIF4F et par les protéines eIF4B et eIF4H au niveau de la coiffe en 5'-UTR de l'ARNm. L'action coopérative de ces différentes protéines favorise le dépôt du complexe 43S sur la séquence d'ARNm. Le complexe eIF4F est constitué de la protéine eIF4G qui permet de former une plateforme sur laquelle les autres protéines viennent se fixer, tels que la protéine de la coiffe eIF4E, l'hélicase eIF4A (*DEAD-box RNA helicase*), le facteur d'initiation eIF3 et la protéine PABP (Jackson et al., 2010; Pestova et al., 2001; Rogers et al., 2001). Lors du premier tour de traduction, il n'y a pas d'évidence que le complexe eIF4F soit composé des mêmes protéines que pour les tours suivants. La seule information connue est que eIF4G est présente lors du premier et des tours suivants et permet de former une plateforme d'interaction avec notamment la protéine CBP80 (Lejeune et al., 2004).

Lorsque le codon d'initiation est reconnu, les facteurs eIF5 et eIF5B permettent l'hydrolyse du GTP, précédemment fixé sur le facteur eIF2. Les deux facteurs eIF5 et eIF5B sont aussi importants dans la libération des facteurs d'initiation de la traduction et dans le recrutement de la grande sous-unité ribosomique 60S, afin de former le ribosome 80S. Ce complexe commence ainsi une nouvelle étape de la traduction : la phase d'élongation de la traduction (Pisareva and Pisarev, 2014).

- L'élongation de la traduction

Cette étape qui suit la phase d'initiation de la traduction permet de commencer la synthèse de la protéine à partir de la séquence d'ARNm et l'élongation de celle-ci sur la région C-terminale avec l'ajout consécutif des acides aminés correspondant à l'information génétique.

Le premier facteur à intervenir dans l'élongation du peptide est le facteur d'élongation de la traduction eucaryote eEF1A qui, après l'hydrolyse du GTP, recrute l'ARNt-aminoacyl sur le site A du ribosome (Andersen et al., 2003; Browne and Proud, 2002).

L'hydrolyse du GTP par eEF1A est effectuée uniquement après la reconnaissance du codon de l'ARNm par l'anticodon de l'ARNt. Successivement, eEF1A et le GDP formé sont libérés et recyclés par eEF1B afin d'être prêts pour le prochain ARNt chargé qui doit être positionné dans le site A du ribosome.

L'ARNt-aminoacyl dans le site A est ensuite décalé vers le site P où la liaison entre la séquence naissante du peptide et l'acide aminé devant être incorporé a lieu. Après la liaison peptidique, l'ARNt qui n'est plus chargé, c'est-à-dire qui est désacétylé, doit transloquer du site P vers le site E de sortie. Cette translocation est dirigée par la protéine eEF2 et l'hydrolyse d'une molécule de GTP assure l'avancement du ribosome sur la séquence d'ARNm en direction 3' (Dever et al., 2018; Dever and Green, 2012) (Figure 40).

L'ARNt-aminoacyl suivant va prendre la place dans le site A à l'aide de la protéine eEF1A avec une nouvelle molécule de GTP. L'insertion des acides aminés dans la séquence peptidique va continuer et la protéine va être synthétisée au fur et à mesure.

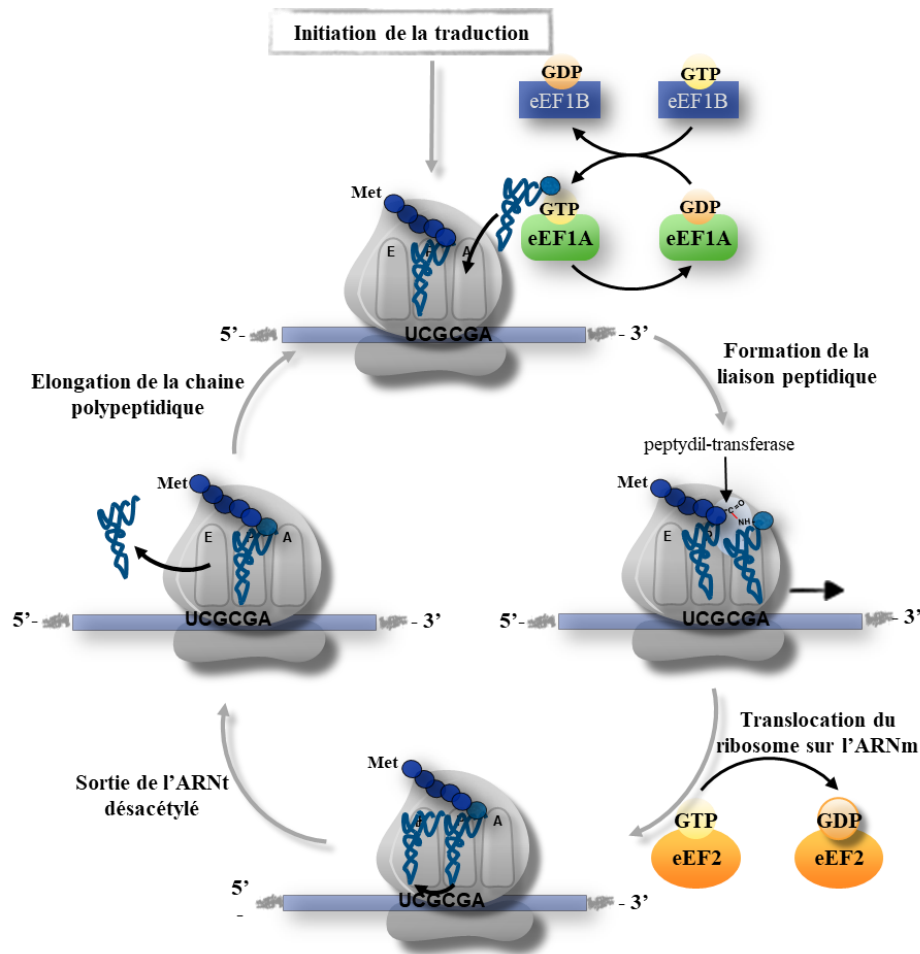


Figure 40 : Représentation de l'élongation de la traduction.

- La terminaison de la traduction et le recyclage des composants

La terminaison est la dernière étape de la traduction. C'est à cette étape que la protéine synthétisée est complète et doit se détacher de la machinerie ribosomique. Le codon stop physiologique terminant la phase ouverte de lecture peut être représenté sous trois formes : UGA, UAG et UAA. Lorsque ce codon

stop se situe dans le site A du ribosome, les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 sont recrutés (*eukaryotic release factors*), donnant naissance au complexe de terminaison (Alkalaeva et al., 2006; Dever and Green, 2012).

Le facteur eRF1 est composé de trois domaines présentant différentes caractéristiques. Le domaine N-terminal permet la reconnaissance du codon stop sur l'ARNm. Le domaine central est celui qui permet de mimer un ARNt et de permettre au facteur eRF1 de se localiser dans le site A du ribosome. En revanche, le domaine C-terminal interagit avec eRF3 (Dever and Green, 2012; Muramatsu et al., 2001; Palma and Lejeune, 2021; Song et al., 2000).

Le facteur eRF3 est une GTPase qui voit son activité stimulée suite à son interaction avec la protéine PABP, notamment en fin de traduction (Hoshino et al., 1999; Kozlov and Gehring, 2010).

La protéine ARN hélicase DDX19 interagit initialement avec le facteur eRF1 et a la capacité de permettre l'interaction entre eRF1 et eRF3 en formant un complexe afin de promouvoir la terminaison de la traduction (Palma and Lejeune, 2021). Suite au recrutement du complexe eRF1-eRF3-GTP sur la séquence d'ARNm, l'hydrolyse d'une molécule de GTP permet au facteur eRF1 de se fixer dans le centre ribosomique de la peptidyl-transférase, mimant ainsi un ARNt. Entre autres, l'hydrolyse du GTP libère le facteur eRF3 permettant l'accommodation de eRF1 dans le site A et le détachement de la chaîne peptidique (Dever and Green, 2012; Song et al., 2000) (*Figure 41*).

A la fin de la traduction, le ribosome 80S qui reste fixé sur l'ARNm et qui présente un ARNt désacétylé mais aussi les facteurs eRF1 et eRF3, vont être recyclés pour un nouveau tour de traduction. En effet, il faut savoir que la traduction est un processus cyclique où les sous-unités et certaines protéines impliquées dans la traduction sont recyclées après chaque terminaison de la traduction en présence du complexe ribosomal post-terminaison (*post-termination ribosomal complexe* ou post-TC) (Pisarev et al., 2007).

Une protéine nécessaire au recyclage est l'ATPase cytosolique ABCE1 (*ATP-binding cassette subfamily E member 1*), recrutée sur l'ARNm et remplace le facteur eRF3 (Pisarev et al., 2010). L'hydrolyse de l'ATP assure la dissociation des sous-unités, du dernier ARNt désacétylé et des protéines présentes. Certains facteurs d'initiation tels que eIF1, eIF1A et eIF3 interviennent dans le recyclage et restent liés à la sous-unité 40S afin d'empêcher la réassociation avec la sous-unité 60S lors du recyclage (Palma and Lejeune, 2021; Rees et al., 2009).

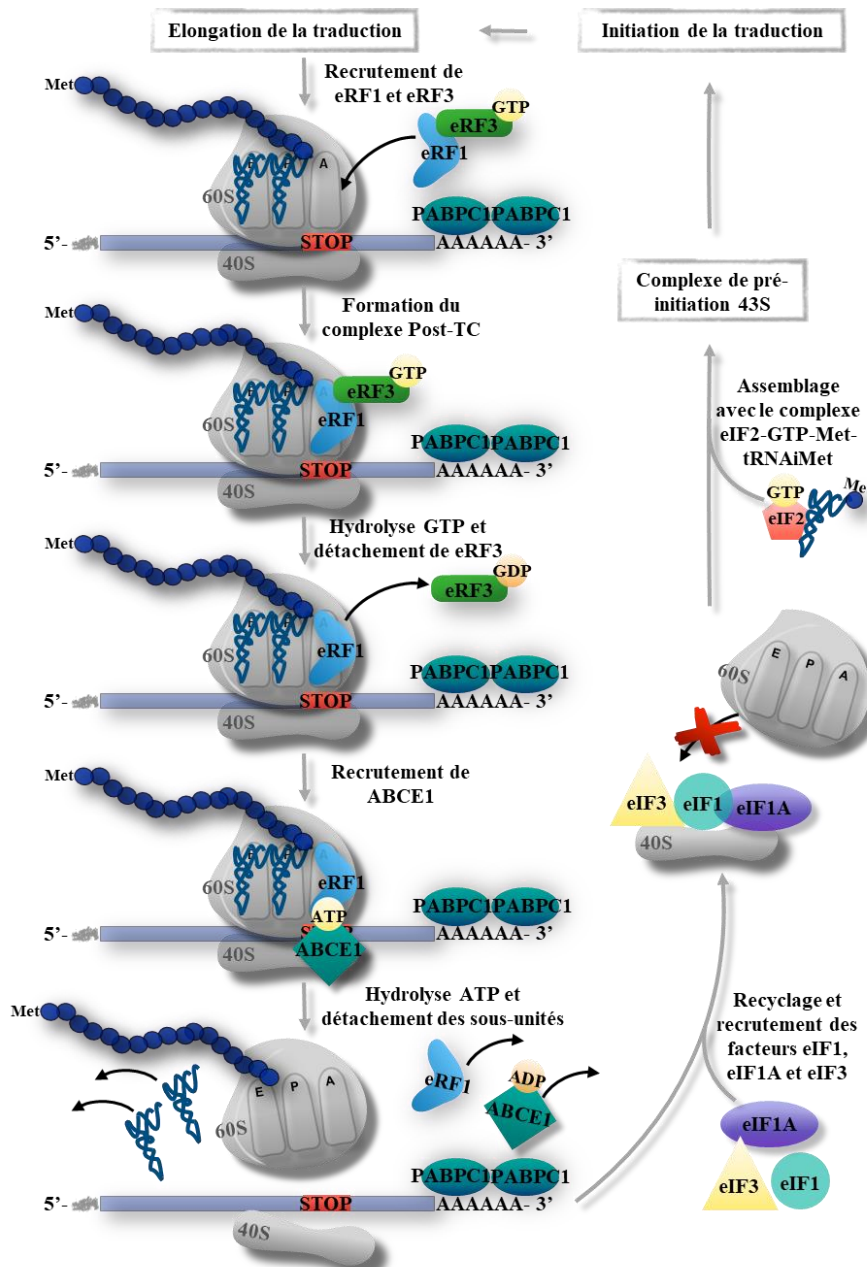


Figure 41 : La terminaison de la traduction et le recyclage des protéines impliquées dans la traduction.

### 3) Le mécanisme de la translecture

A partir d'un ARNm, la traduction de la séquence permet l'expression des informations portées par le gène en synthétisant une protéine ayant une fonction bien précise. La traduction passe par trois étapes déjà décrites, notamment l'initiation, l'élongation et la terminaison de la traduction avec comme produit final une protéine.

La reconnaissance du codon stop physiologique est fondamentale afin de synthétiser une protéine de taille sauvage mais parfois, le ribosome ne reconnaît pas le codon d'arrêt et continue à scanner et à



ajouter les acides aminés en allongeant la chaîne peptidique. Cet événement est appelé translecture et peut être de trois types selon son activation : programmée, non-programmée ou induite par des molécules.

Pour le traitement de certaines pathologies bien spécifiques, la translecture représente une stratégie thérapeutique envisageable.

Cette revue expose les événements liés à la translecture tels que les facteurs *cis* et *trans* impliqués dans le mécanisme, mais aussi les traitements et les nouvelles stratégies proposées aujourd'hui.

# Deciphering the molecular mechanism of stop codon readthrough

Martine Palma  and Fabrice Lejeune\* 

*Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR9020 – U1277 – CANTHER – Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France*

## ABSTRACT

Recognition of the stop codon by the translation machinery is essential to terminating translation at the right position and to synthesizing a protein of the correct size. Under certain conditions, the stop codon can be recognized as a coding codon promoting translation, which then terminates at a later stop codon. This event, called stop codon readthrough, occurs either by error, due to a dedicated regulatory environment leading to generation of different protein isoforms, or through the action of a readthrough compound. This review focuses on the mechanisms of stop codon readthrough, the nucleotide and protein environments that facilitate or inhibit it, and the therapeutic interest of stop codon readthrough in the treatment of genetic diseases caused by nonsense mutations.

*Key words:* stop codon readthrough, mechanism, translation termination, premature termination codon, readthrough activators, molecules, screening

## CONTENTS

|  |    |
|--|----|
| I. Introduction  | 2  |
| II. Translation termination  | 2  |
| III. Different types of stop codon readthrough                               | 4  |
| (1) Non-programmed translational readthrough                                 | 4  |
| (2) Programmed translational readthrough                                     | 4  |
| (3) Induced translational readthrough  | 6  |
| IV. Parameters influencing stop codon readthrough                            | 6  |
| (1) Cis elements activating stop codon readthrough                           | 6  |
| (2) Trans elements activating readthrough                                    | 7  |
| (a) <i>Proteins and RNAs</i>   | 7  |
| (i) <i>Factors involved in the general process of stop codon readthrough</i> | 7  |
| (ii) <i>Factors involved in specific stop codon readthrough events</i>       | 8  |
| (b) <i>Small molecules</i>   | 10 |
| (c) <i>Cell environment</i>  | 13 |
| V. Therapeutic interest of stop codon readthrough                            | 13 |
| VI. New developments and therapeutic targets                                 | 13 |
| VII. Conclusions   | 15 |
| Acknowledgements   | 16 |
| VIII. References   | 16 |

\* Address for correspondence (Tel: +33 320871059; E-mail: [fabrice.lejeune@inserm.fr](mailto:fabrice.lejeune@inserm.fr)).

## I. INTRODUCTION

For cells to function properly, genetic information must be faithfully expressed in RNAs or proteins. A key step in the gene expression pathway is translation from messenger RNA (mRNA) to protein. Translation obeys very specific rules, such as starting at an initiation codon (very often an AUG codon) and stopping at one of the three stop codons UAA, UAG, or UGA, in order to ensure accurate protein length. Sometimes, however, rules can be bypassed, and translation is no exception. Under specific conditions, ribosomes may ignore stop codons, continuing with translation and extending the C-terminal part of the nascent protein. The C-terminally extended protein may acquire a new functional domain in this way. The absence of termination codon recognition is called stop codon readthrough. Although this can constitute a decoding error, stop codon readthrough can also be a means of expressing different protein isoforms and may represent a therapeutic solution for some pathologies.

This review discusses the different molecular factors that regulate translation termination and stop codon readthrough, mainly in higher eukaryotes. It also outlines the potential of this mechanism in terms of basic science and clinical applications to advance understanding of pathways of gene expression and in the development of therapeutic approaches for nonsense-mutation-related genetic diseases. Potential clinical applications of a stop codon readthrough strategy have recently been discussed in several reviews (Dabrowski, Bukowy-Bieryllo, & Zietkiewicz, 2018; Bezzerri *et al.*, 2020; Morais, Adachi, & Yu, 2020; Sharma, Keeling, & Rowe, 2020), hence we focus here on the molecular mechanisms leading to stop codon readthrough.

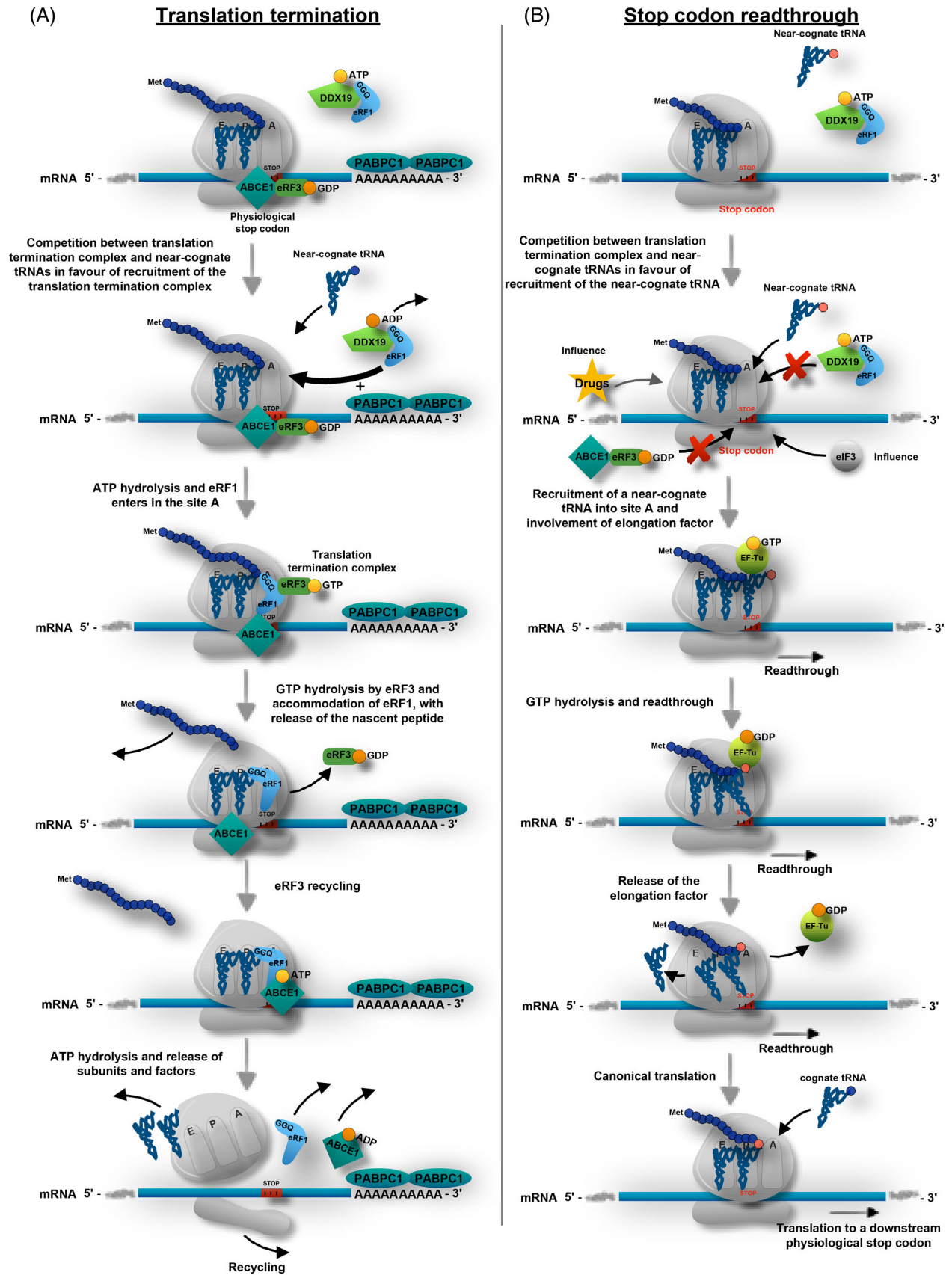
## II. TRANSLATION TERMINATION

Translation is a process that promotes amino acid polymerization leading to a peptide sequence based on an mRNA sequence. The ribosome carries out translation with the help of cofactors, ensuring accurate decoding of the open reading frame (ORF) (Merrick, 1992; Dever, Kinzy, & Pavitt, 2016; Kapur, Monaghan, & Ackerman, 2017). Misincorporation of an amino acid occurs at a very low rate. For example, misincorporation of a lysine instead of an arginine during translation of protamine mRNA has been estimated at only 0.06 to 0.2% (Mori *et al.*, 1985). Site A of the ribosome is where the transfer RNA (tRNA) carrying an amino acid hybridizes with a codon *via* its anticodon sequence, thus bringing to the growing polypeptide chain the next amino acid to be incorporated (Fig. 1A). tRNAs are subject to numerous post-transcriptional modifications that stabilize their tertiary and quaternary structures and also favour codon–anticodon interaction in the ribosome by changing the polarity of the modified base and allowing additional interactions with the ribosome (Grosjean & Westhof, 2016). It is established that post-transcriptional modifications of tRNAs play a role in the fidelity of codon recognition, and their absence can

lead to increased codon recognition by near-cognate tRNAs (Blanchet *et al.*, 2018).

Translation termination occurs when site A of the ribosome reaches one of three stop codons (UAA, UAG or UGA) in frame with the translation initiation codon (Fig. 1A). In human cells, the only tRNA to recognize these stop codons is tRNA<sup>[Ser]<sup>Sec</sup></sup>, which carries the amino acid selenocysteine and pairs with UGA stop codons in a dedicated environment such as a selenocysteine insertion sequence (SECIS) combined with the presence of SECIS binding-protein 2 (SBP2) (Labunskyy, Hatfield, & Gladyshev, 2014). When the ribosome reaches a stop codon, competition occurs between the translation termination complex and near-cognate tRNAs recognizing two of the three bases constituting the stop codon. Likely because of a lower energetic stability of stop codon recognition by a near-cognate tRNA, the translation termination complex is recruited in more than 99.9% of cases (Rajon & Masel, 2011; Floquet *et al.*, 2012). UAG and UAA stop codons share the same near-cognate tRNAs, which differ from those recognizing UGA stop codons. The amino acids glutamine, tyrosine, and lysine are incorporated during UAG or UAA readthrough, whereas arginine, cysteine, and tryptophan can be incorporated during UGA readthrough, consistent with their positions in the genetic code table (Feng *et al.*, 1990; Roy *et al.*, 2015). Yet our understanding of stop codon misdecoding by near-cognate tRNAs is far from complete, since other amino acids have also been found to be incorporated during readthrough, according to the nonsense mutation and its nucleotide context. In particular, leucine is the main amino acid incorporated during readthrough of the UGA nonsense mutation at position 1282 (mutation W1282X) of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene (Xue *et al.*, 2017). It is important to note that the protein synthesized may or may not be functional according to the amino acid incorporated at the site of the nonsense mutation, if this position is crucial for the function or stability of the protein.

The translation termination complex is composed of at least two subunits, called eukaryotic release factors (eRFs) 1 and 3 (Fig. 1A). The eRF1 subunit mimics a tRNA and enters the A site of the ribosome to recognize the stop codon (Song *et al.*, 2000; Muramatsu *et al.*, 2001). In eukaryotic cells, interestingly, eRF1 recognizes all three stop codons, whereas in prokaryotic cells, two release factors (RFs) are necessary: RF-1 recognizes UAA and UAG stop codons, whereas RF-2 recognizes UAA and UGA stop codons. To understand how eRF1 recognizes all three stop codons, Brown *et al.* (2015) used cryo-electron microscopy and a catalytically inactive eRF1 to show that glutamic acid at position 55 and tyrosine at position 125 of eRF1 discriminate between purines and pyrimidines at the second and third base positions of a codon. They thus play a crucial role in the ability of eRF1 to recognize stop codons (Brown *et al.*, 2015). The eRF3 subunit is a GTPase whose activity is stimulated mainly by interaction with either the polyA-binding protein (PABP), when translation termination occurs at the physiological stop codon, or



(Figure legend continues on next page.)

the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) factor UPF3X (also called UPF3B), when translation termination occurs at a premature termination codon (PTC) (Neu-Yilik *et al.*, 2017). When eRF3 catalyses conversion of GTP to GDP, it induces a conformational change in the structure of eRF1, promoting translation termination through release of the nascent peptide chain and replacement of eRF3 by the ATPase ABCE1 (ATP binding cassette subfamily E member 1). ABCE1 will then hydrolyse ATP to ADP to promote recycling of the two ribosomal subunits (Fig. 1A). In addition to the stop codon and to certain proteins located downstream of the stop codon (PABP or UPF3X for instance), the nucleotide environment around the stop codon, and particularly certain post-transcriptional modifications, may influence the translation termination process. A transcriptome-wide mRNA methylation analysis has revealed a high level of methylation at position 6 of adenosine (m6A) at the end of the ORF and the beginning of the 3' untranslated region (UTR), in the vicinity of the stop codon. This deserves further investigation and clarification, as it suggests a possible role of this mark in translation termination (Meyer *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014).

### III. DIFFERENT TYPES OF STOP CODON READTHROUGH

Although translation termination must be a very efficient process to ensure the correct protein size, under certain conditions or at a very low rate, a near-cognate tRNA can be recruited to the A site of the ribosome when the latter reaches a stop codon. The consequence of this is that translation continues until a later stop codon that promotes translation termination. This event is called stop codon readthrough (Fig. 1B). Several types of readthrough can occur at stop codons, depending on the presence of regulatory elements or of readthrough-promoting molecules (Fig. 2).

#### (1) Non-programmed translational readthrough

In the absence of any readthrough molecules, readthrough of any physiological stop codon or PTC can occur at a basal level. This readthrough can be considered a translation error

and is referred to here as non-programmed translational readthrough (Fig. 2A). This type of readthrough is a rare event, calculated as less than 0.1% in more than 80% of cases (Fearon *et al.*, 1994; Rajon & Masel, 2011; Floquet *et al.*, 2012). Interestingly, the likelihood of non-programmed translational readthrough depends on the identity of the stop codon. It is highest at the UGA stop codon, whereas translation termination is most efficient at the UAA stop codon. In the case of PTCs, this very low readthrough rate is partly due to competition between near-cognate tRNAs and release factors, in favour of the former, but it is also due in part to activation of the surveillance mechanism provided by NMD, which results in silencing of the gene (He & Jacobson, 2015; Kurosaki & Maquat, 2016; Lejeune, 2017; Gupta & Li, 2018). Non-programmed translational readthrough thus occurs on the fraction of PTC-carrying mRNAs that escape NMD (Kuzmiak & Maquat, 2006).

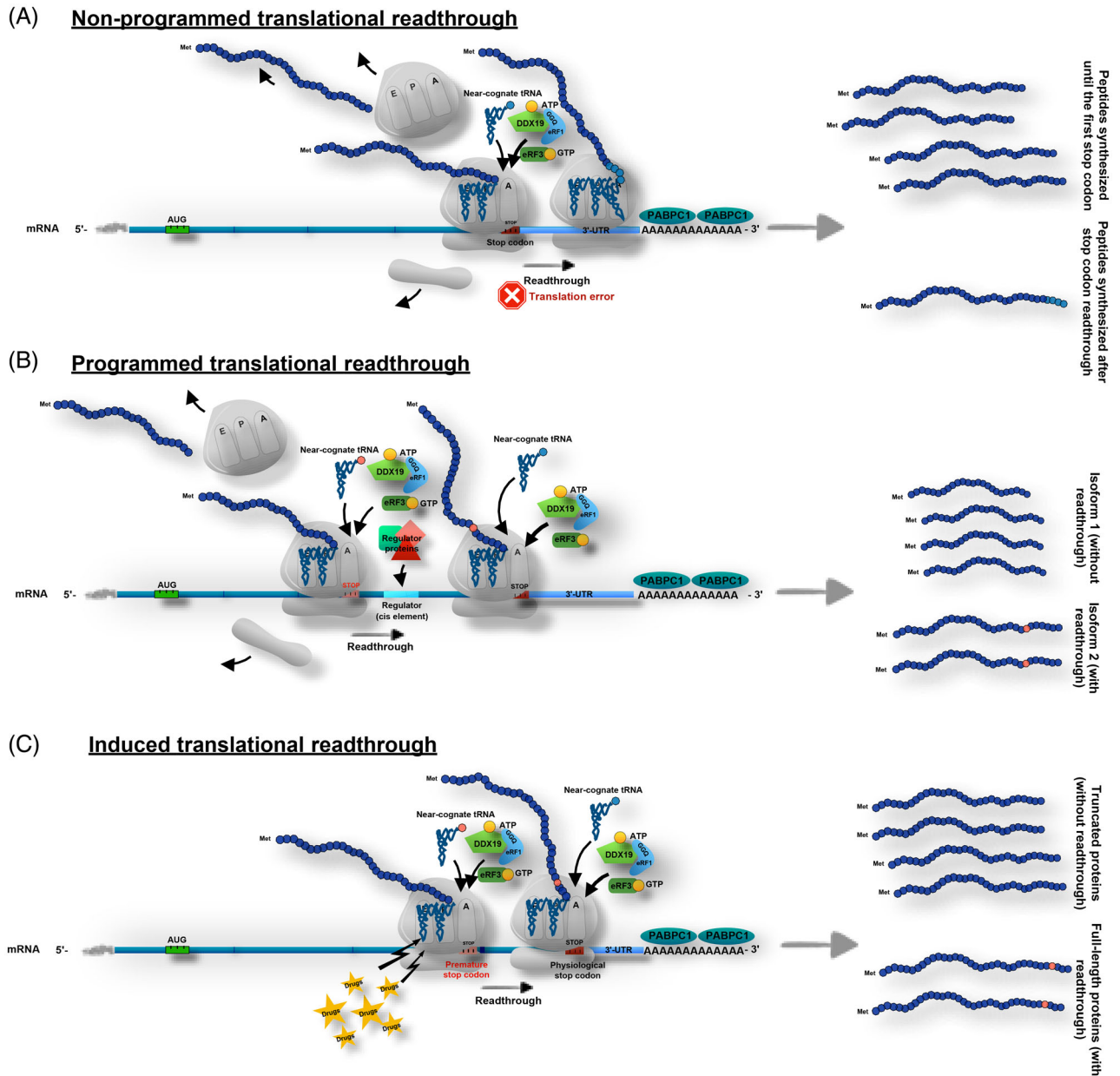
Although the amount of protein generated by non-programmed translational readthrough is minute compared to the amount of protein produced without readthrough of a physiological stop codon or from the wild-type mRNA in the case of a PTC, the consequences of non-programmed translational readthrough can be considerable. For example, the phenotypes of patients suffering from the same pathology and carrying the same nonsense mutation may vary even though they should be identical due to silencing of the mutant gene. Some cystic fibrosis patients with a nonsense mutation that one would assume to cause a severe phenotype due to the absence of the CFTR protein actually show mild pulmonary damage (Cutting *et al.*, 1990; Kerem *et al.*, 1990). The level of non-programmed translational readthrough has been proposed to explain this mild phenotype, allowing some functional full-length CFTR protein to be synthesized.

#### (2) Programmed translational readthrough

The second type of readthrough is called programmed translational readthrough (Fig. 2B). It targets specific mRNAs (Freitag, Ast, & Bolker, 2012; Dunn *et al.*, 2013; Loughran *et al.*, 2018) and is a proteome-expanding mechanism allowing synthesis of specific protein isoforms with particular

(Figure legend continued from previous page.)

**Fig. 1.** Comparison of translation termination and stop codon readthrough mechanisms. (A) Translation termination. When the ribosome reaches a stop codon, in most cases the translation termination complex is recruited. When the A site of the ribosome covers a stop codon, eRF3 and ABCE1 interact with the ribosome. ABCE1 recruits the Dbp5/DDX19-eRF1 complex, likely with the help of PABPC1. Dbp5/DDX19 then hydrolyses ATP to ADP, promoting its own departure. The energy supplied by eRF3-driven GTP hydrolysis favours a change in the conformational structure of eRF1, with subsequent dissociation of the synthesised peptide. ABCE1-driven ATP hydrolysis supplies energy for the release of the ribosome, which is then recycled. (B) Stop codon readthrough. At a very low rate or under certain conditions (drugs, eIF3, regulatory elements), a near-cognate tRNA, rather than the translation termination complex, is recruited when the ribosome reaches a stop codon. The elongation factor EF-Tu allows polymerization of the peptide, with GTP hydrolysis leading to continuation of translation to the next stop codon. ABCE1, ATP-binding cassette sub-family E member 1; DDX19, DEAD-box helicase 19B; EF-Tu, elongation factor thermo unstable; eIF3, eukaryotic initiation factor 3; eRF, eukaryotic release factor; GGQ, glycine-glycine-glutamine motif; mRNA, messenger RNA; PABP, polyA-binding protein; tRNA, transfer RNA.



**Fig. 2.** Different types of stop codon readthrough. (A) Non-programmed translational readthrough. This type of readthrough occurs at a basal level without any regulatory elements and without the presence of readthrough molecules. This readthrough happens at premature termination codons (PTCs) and physiological stop codons at a very low rate. (B) Programmed translational readthrough. Some mRNAs are subject to readthrough of the physiological stop codon, due to the presence of regulatory elements. This type of readthrough is more efficient than that shown in A. (C) Induced translational readthrough. The presence of molecules (aminoglycosides or non-aminoglycosides) promotes activation of readthrough. This type of readthrough is more efficient than that shown in A. DDX19, DEAD-box helicase 19B; eRF, eukaryotic release factor; GGQ, glycine-glycine-glutamine motif; mRNA, messenger RNA; PABP, polyA-binding protein; tRNA, transfer RNA; UTR, untranslated region.

functions. It is thus a way to synthesize two isoforms of a protein from one mRNA. A specific regulatory mechanism intervenes at the physiological stop codon either to terminate translation at the first stop codon in phase with the initiation codon starting the ORF or to promote its readthrough so as to terminate translation at one of the downstream stop codons in phase with the initiation codon. This type of

readthrough has been identified in viruses, fungi, *Drosophila* spp., and mammals. In human cells, programmed translational readthrough is thought to be a very rare event, reported to affect the expression of only a dozen genes: the opioid receptor Kappa 1 (OPRK1), opioid related nociceptin receptor 1 (OPRL1), aquaporin 4 (AQP4), mitogen-activated protein kinase 10 (MAPK10), peroxisomal lactate

dehydrogenase B (LDHB), malate dehydrogenase (MDH1), vitamin D receptor (VDR), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), myelin protein zero (MPZ), and beta-globin genes (Geller & Rich, 1980; Chittum *et al.*, 1998; Yamaguchi *et al.*, 2012; Eswarappa *et al.*, 2014; Loughran *et al.*, 2014, 2018; Schueren *et al.*, 2014). It appears more frequent in other species. In *Drosophila melanogaster*, for example, the expression of several hundred genes is regulated *via* this readthrough process (Lin *et al.*, 2007). Similarly, some 5% of yeast genes appear to be subject to programmed translational readthrough (Kleppe & Bornberg-Bauer, 2018). An *in silico* analysis aiming to identify physiological stop codons putatively subject to programmed translational readthrough suggests that this process may actually occur more frequently than previously thought in many species, including humans (Dunn *et al.*, 2013; Jungreis *et al.*, 2016). Consistent with these results, ribosome profiling performed on human foreskin fibroblasts revealed 42 genes as potentially subject to programmed translational readthrough. Interestingly, this process has been shown to generate C-terminally extended proteins very efficiently, with the amount of protein formed exceeding the amount of unextended product protein by up to 30% (Loughran *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2019). This suggests that specific translation termination regulation occurs at these physiological stop codons and that cis elements and trans-acting factors must be involved in promoting an exceptionally high rate of readthrough. Some such elements have been identified and are described in Section IV.

### (3) Induced translational readthrough

The third type of stop codon readthrough is PTC readthrough promoted by certain molecules (Fig. 2C), here termed induced stop codon readthrough. When the ribosome reaches a stop codon, the presence of such molecules favours recruitment of near-cognate tRNAs instead of the translation termination complex. In early studies, aminoglycosides were shown to facilitate this type of readthrough process in bacteria and yeast (Singh, Ursic, & Davies, 1979). The first evidence of induced nonsense mutation readthrough in mammalian cells was reported a few years later in a study of G418 and paromomycin aminoglycosides (Burke & Mogg, 1985). Since then, both aminoglycoside and non-aminoglycoside molecules have been identified as readthrough molecules (see Section IV) that might potentially be used to treat nonsense-mutation-related pathologies.

Several lines of evidence indicate that induced translational readthrough occurs at PTCs and not at physiological stop codons. The nucleotide and protein environments around physiological stop codons have been evolutionarily selected to facilitate translation termination. This is not true of PTCs, since they appear through mutation in an environment selected to promote translation and not translation termination. While PTCs do promote translation termination, they are more sensitive to readthrough than physiological stop codons. Although several studies using readthrough molecules have shown the absence of readthrough at

physiological stop codons (Welch *et al.*, 2007; Benhabiles *et al.*, 2017; Trzaska *et al.*, 2020), it remains necessary to demonstrate for each new molecule that it does not impact translation termination at physiological stop codons.

Interestingly, the efficiency of translational readthrough induced by a molecule may be related to the level of non-programmed translational readthrough (basal level of readthrough) occurring at the stop codon in the absence of that molecule: the higher the level of basal readthrough, the more efficient the readthrough promoted by molecules such as aminoglycosides (Floquet *et al.*, 2012), which should be taken into account when implementing a therapeutic approach for a given nonsense mutation.

## IV. PARAMETERS INFLUENCING STOP CODON READTHROUGH

The basal readthrough level varies from one stop codon to another, as shown in various studies (Fearon *et al.*, 1994; Rajon & Masel, 2011; Floquet *et al.*, 2012). The identity of the stop codon influences this level, but other elements acting in cis or trans can also modulate the efficiency of PTC or physiological stop codon readthrough. Such elements can influence all three types of stop codon readthrough.

### (1) Cis elements activating stop codon readthrough

Stop codon readthrough efficiency can be influenced by various factors, including the identity of the stop codon and the nucleotide sequence surrounding it (Howard *et al.*, 2000; Bidou *et al.*, 2004). Results from studies where a PTC was introduced into a reporter gene show that the UGA stop codon is the most permissive to readthrough and the UAA stop codon is the least permissive (Howard *et al.*, 2000; Manuvakhova, Keeling, & Bedwell, 2000; Bidou *et al.*, 2004; Floquet *et al.*, 2012; Wangen & Green, 2020). However, these properties can be altered by the nucleotide context of the stop codon (Bonetti *et al.*, 1995; McCaughan *et al.*, 1995; Cassan & Rousset, 2001). In particular, counting the first nucleotide of the stop codon as position +1, the nucleotide at position +4 strongly influences translation termination efficiency. It appears that a purine at this position, as found in about 90% of the most highly expressed human genes, favours translation termination (Tate & Mannering, 1996), whereas a pyrimidine facilitates readthrough (Brown *et al.*, 1990; McCaughan *et al.*, 1995; Tate & Mannering, 1996). In particular, the presence of a cytosine at position +4 has been shown to allow, in most cases, the most efficient stop codon suppression (Phillips-Jones, Watson, & Martin, 1993; Howard *et al.*, 2000; Floquet *et al.*, 2012; Wangen & Green, 2020), although this is not an absolute rule. The nucleotide environment most favourable to efficient readthrough also depends on the identity of the stop codon. Manuvakhova *et al.* (2000) found cytosine to be the most favourable nucleotide at position +4 for promoting readthrough of UGA and UAA stop

codons, but readthrough of UAG stop codons was most efficient when the other pyrimidine, uracil, is present at that position.

The nucleotide immediately following the stop codon is not the only nucleotide that can influence readthrough efficiency. Several studies have demonstrated that some downstream nucleotides can favour readthrough. Recently, a study measuring stop codon readthrough by ribosome profiling showed that the two nucleotides immediately downstream of the stop codon strongly influence readthrough efficiency (Wangen & Green, 2020). The authors concluded that enrichment in adenosines or uridines in the vicinity of the stop codon favours stop codon readthrough, whereas enrichment in guanosines or cytosines favours translation termination. Other studies have demonstrated that both upstream and downstream sequences influence the readthrough rate at a stop codon. In particular, CAA sequences upstream and downstream of a UAG stop codon in the *ste6* gene in yeast or in a reporter gene have been shown to act synergistically to promote readthrough (Fearon *et al.*, 1994; Bonetti *et al.*, 1995; Manuvakhova *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2014).

According to the reporter system used to investigate readthrough efficiency, the upstream and downstream consensus sequences favouring stop codon readthrough may differ slightly. For example, the downstream sequences CARYYA (where R is a purine and Y is a pyrimidine) and CARNBA (where N is any of the four nucleotides and B can be U, C or G) seem to favour stop codon readthrough (Beier & Grimm, 2001; Namy, Hatin, & Rousset, 2001; Harrell, Melcher, & Atkins, 2002). These hexanucleotide sequences are found in several virus and cell genes associated with the regulation of programmed translational readthrough (Skuzeski *et al.*, 1991). The upstream sequence can also affect readthrough efficiency. For example, one study found that the nucleotide sequence spanning positions  $-6$  to  $+9$  influences readthrough rate. In particular, positions  $-1$  and  $+4$  were crucial for readthrough activation, and the sequence U STOP C has been reported as the consensus sequence for efficient readthrough (Floquet *et al.*, 2012). Supporting the idea of involvement of the upstream sequence in promoting readthrough, a recent study on the glycosyltransferase gene *B4GALNT1* has demonstrated that the base triplet AGC, immediately upstream and downstream of the PTC, is required for efficient basal readthrough generated by the M4 nonsense mutation at amino acid 228 (Yesmin *et al.*, 2020). Overall, all these studies indicate that stop codon readthrough efficiency is modulated by cis elements that have not yet been clearly identified and that are likely to differ among genes. It remains very difficult to predict with certainty the rate of readthrough of a stop codon without additional experimental data. For instance, when attempting to explain why a given readthrough molecule has variable effects on the same nonsense mutation located at different positions in a gene, one must consider the influence of the stop-codon-surrounding sequence on readthrough efficiency. This is especially true when the goal is to develop a therapeutic approach (Martorell *et al.*, 2020).

Besides the immediate primary sequence surrounding the stop codon, some secondary structures have been shown to facilitate stop codon readthrough. In the Moloney murine leukemia virus, a pseudoknot located eight nucleotides downstream of the stop codon separating the gag and pol ORFs promotes readthrough by about 5% of the ribosomes reaching this stop codon (Wills, Gesteland, & Atkins, 1991). Since this discovery, efficient readthroughs have been found to require other secondary structures (e.g. conserved hairpins) occurring at stop codons from various virus genomes (Firth *et al.*, 2011). The exact mechanism remains obscure, but these results suggest that certain proteins could be recruited by these secondary structures to promote readthrough.

## (2) Trans elements activating readthrough

When the ribosome reaches a stop codon, it must terminate translation or ignore this translation termination signal by incorporating an amino acid and continuing translation of the ORF to a downstream stop codon. To understand the mechanisms underlying the 'decision' to stop translation or to continue, specific factors dedicated to stop codon readthrough have been sought. Some endogenous trans elements have been identified as proteins or RNAs required either for readthrough of specific stop codons or for the general readthrough mechanism. Molecules with the capacity to promote readthrough are of particular interest because of their potential in treating nonsense-mutation-related pathologies. Finally, the cell environment has been shown to influence readthrough efficiency, suggesting that regulation of the readthrough process may occur according to culture conditions.

### (a) Proteins and RNAs

To date, only a few factors have been implicated in the readthrough process, some affecting all stop codon readthroughs and some that are specific to readthrough of one particular stop codon.

(i) Factors involved in the general process of stop codon readthrough. As readthrough opposes translation termination and *vice versa*, it is not surprising that loss of function of proteins involved in translation termination leads to increased levels of stop codon readthrough. For example, the proteins termination and polyadenylation 1 (TPA1) and Ccr4 associated factor 1 (CAF1, also called POP2) involved in regulating the length of the poly(A) tail also participate in the translation termination process. In experiments using the firefly luciferase reporter gene carrying a PTC, loss of TPA1 or POP2 function in yeast resulted in increased basal readthrough levels (Keeling *et al.*, 2006). These proteins can thus be viewed as inhibitors of stop codon readthrough. However, in both yeast and human cells, the nucleotide context appears to determine whether TPA1 exerts a positive or a negative influence on stop codon readthrough (Loenarz *et al.*, 2014). In yeast, the balance between translation termination efficiency and stop codon readthrough efficiency can



be altered by the expression levels of the inhibitor of translation termination 1 (ITT1) gene. This was demonstrated in experiments using a PGK1-STOP-LacZ reporter construct, in which overexpression of ITT1 caused increased basal levels of readthrough (Urakov *et al.*, 2001).

Another example of the antagonism between translation termination efficiency and stop codon readthrough activation is illustrated by the dead-box RNA helicase Dbp5/DDX19, which is involved in translation termination. Dbp5/DDX19 interacts with eRF1, bringing it into contact with eRF3 so as to promote translation termination (Fig. 1). If the function of Dbp5/DDX19 is impaired, eRF1 interacts prematurely with eRF3 leading to failure of the translation termination process, thus allowing near-cognate tRNAs to enter the A site of the ribosome, recognize the stop codon, and promote readthrough (Gross *et al.*, 2007; Mikhailova *et al.*, 2017; Beissel *et al.*, 2019).

Although it makes sense that proteins involved in the translation termination process can interfere with stop codon readthrough, it is surprising to note the presence of translation initiation factors among the proteins that modulate stop codon readthrough. In both yeast and human cells, the eukaryotic initiation translation factor 3 (eIF3) seems to play a general role in programmed translational readthrough. The absence of functional eIF3 reduces the basal level of readthrough of all three stop codons, provided they are in a readthrough-favourable nucleotide context (Beznoskova *et al.*, 2015). To promote readthrough, eIF3 appears to act as an inhibitor of eRF1 by interacting with the pre-termination complex and interfering with pairing between eRF1 and the third base of the codon. By preventing recognition of the stop codon by eRF1, eIF3 favours recognition of the stop codon by a near-cognate tRNA, thus promoting stop codon readthrough.

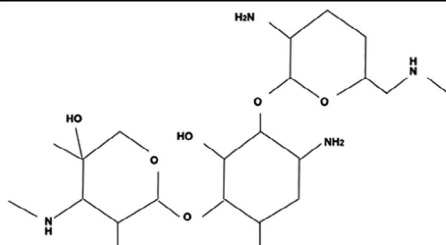
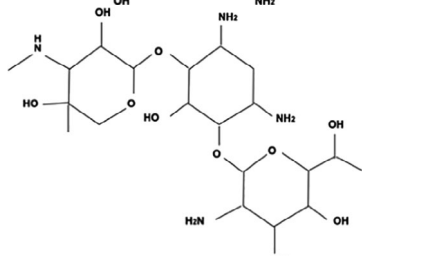
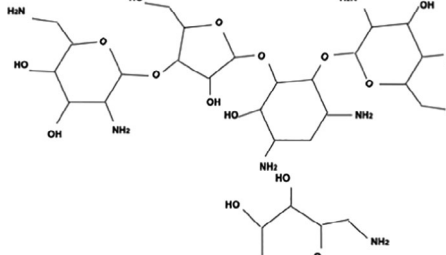
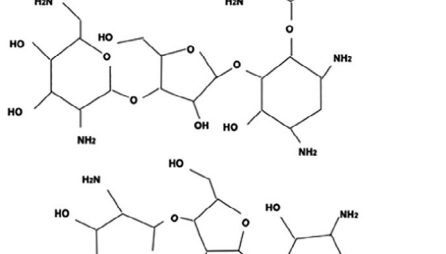
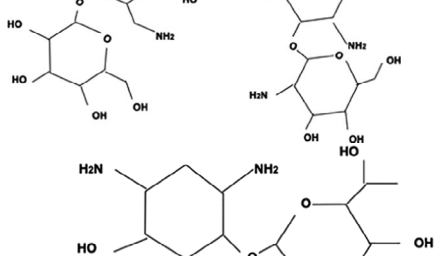
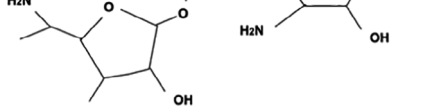
It is also possible to modulate the efficiency of stop codon readthrough by acting on the fidelity of the translation process. tRNAs are subject to various post-transcriptional modifications that prevent erroneous codon recognition by the tRNA. For example, the wobble effect, proposed to explain recognition of the first two bases of a codon by a near-cognate tRNA independently of the third nucleotide (Crick, 1966), is strongly increased when these post-transcriptional modifications are not present (Hagervall *et al.*, 1990; Duechler *et al.*, 2016; Agris *et al.*, 2017; Bednarova *et al.*, 2017). Interestingly, the rules governing recognition of a stop codon by a near-cognate tRNA appear less restrictive than proposed by the wobble effect, as more tRNAs than expected can recognize a stop codon (Roy *et al.*, 2015). Not only can codon recognition by a near-cognate tRNA occur *via* the first two bases of the codon independently of the third nucleotide, but it can also occur *via* the last two bases of the codon independently of the first. Similarly, the discovery that leucine is the amino acid most abundantly incorporated at the non-sense mutation W1282X in the CFTR gene suggests that a tRNA may recognize a stop codon with a mismatch at the central base of the triplet forming the codon (Xue *et al.*, 2017).

Note also that, before being substrates of stop codon readthrough, PTC-carrying mRNAs are substrates of NMD. It is therefore tempting to connect these two mechanisms and to hypothesize that they share factors in common. In humans at least, this is indeed the case for some NMD factors: down-regulation of the NMD factors Up frameshift (UPF) 1, 2, or 3X/3B impairs readthrough, indicating that these factors are necessary for this process (Ivanov *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2017). The exact roles of these NMD proteins in readthrough remain to be clarified, especially because contradictory reports have been published on this role of UPF proteins in other organisms such as yeast. It has notably been claimed that UPF proteins inhibit readthrough, since knockout of one UPF gene in yeast results in an increased readthrough rate (Wang *et al.*, 2001; Salas-Marco & Bedwell, 2005). However, another study failed to observe any effect of UPF gene knockout on the readthrough rate, suggesting that these proteins are not involved in readthrough (Harger & Dinman, 2004). The role of the UPF proteins in stop codon readthrough thus may differ between yeast and humans. This warrants in-depth investigations into the connection between NMD and stop codon readthrough.

Translation takes place *a priori* throughout the cytoplasm, and since stop codon readthrough shares the same translation machinery, it can be expected also to occur in the cytoplasm, without any dedicated sites. Yet a recent study demonstrated that the cytoskeleton influences PTC readthrough (Jia *et al.*, 2017). In particular, basal readthrough is activated when formation of actin filaments is impaired. It thus seems that actin filaments are neither required for readthrough nor favourable to it, meaning that they may participate in some form of readthrough inhibition. The same study showed that non-programmed translational readthrough occurs at specific cytoplasmic foci different from P-bodies and named readthrough bodies (Jia *et al.*, 2017). Their results suggest that PTC-containing mRNAs are actively targeted either to degradation by NMD or to undergo PTC readthrough. Although UPF proteins have been found in readthrough bodies [unlike the P-body marker decapping protein 1a (DCP1a), which is involved in NMD], readthrough body characterization remains poor and no specific proteins have been identified.

(ii) Factors involved in specific stop codon readthrough events. To explain programmed translational readthrough on an mRNA, *cis* elements have been identified (see Section IV.1). Often these *cis* elements work together with or recruit factors to promote readthrough of a specific stop codon. For example, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A2/B1, an RNA-binding protein involved in primary microRNA (pri-miRNA) processing and in the trafficking and assembly of the human immunodeficiency virus (HIV) genome (Beriault *et al.*, 2004; Levesque *et al.*, 2006; Alarcon *et al.*, 2015), is involved in programmed translational readthrough on VEGFA mRNA (Houck-Loomis *et al.*, 2011; Eswarappa *et al.*, 2014). HnRNP A2/B1 interacts with an A2 response element (A2RE) located downstream of the physiological stop codon to promote stop codon readthrough.

Table 1. Aminoglycoside molecules with known readthrough activity

| Compounds        | Formula   | References   |
|------------------|---|--|
| Gentamicin       |    |  |
| Geneticin (G418) |    | Wilhelm, Jessop, & Pettitt (1978)<br>Burke & Mogg (1985) |
| Paromomycin      |   |  |
| Neomycin         |  | Manuvakhova <i>et al.</i> (2000)                         |
| Lividomycin      |  |  |
| ELX-02/NB124     |  | Xue <i>et al.</i> (2014)                                 |

Mutating the A2RE sequence or downregulating hnRNP A2/B1 impairs readthrough of the physiological stop codon of VEGFA mRNA. Whether hnRNP A2/B1 interacts with VEGFA pre-messenger RNA (pre-mRNA) or mRNA only has not yet been investigated, but given the nuclear localization of this protein, it could be an early mark for specific programmed translational readthrough.

More recently, Lethal 7a (Let7a) microRNA (miRNA) has been shown to promote programmed translational readthrough on Argonaute 1 (Ago1) mRNA, generating a longer isoform called Ago1x. The miRNA binds a sequence downstream of the physiological stop codon and upstream of the subsequent in-phase downstream stop codon. This sequence is sufficient to promote readthrough when introduced into a heterologous 3' UTR (Singh *et al.*, 2019). This indicates that the mechanism is independent of the identity of the stop codon or of the mRNA, as long as a Let7a miRNA binding site is present downstream of the stop codon to be read through.

Both hnRNP A2/B1 and Let7a miRNA bind an RNA sequence located about 10 nucleotides downstream of the stop codon whose readthrough they promote. This suggests a possible interaction with the translation machinery pausing on the stop codon. In both cases, interestingly, the rate of translational readthrough of the canonical stop codon reaches at least 20%, which can be considered very efficient stop codon readthrough (Eswarappa *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2019). Unfortunately, the precise mechanism remains to be determined in order to understand how these trans elements impair translation termination and efficiently promote synthesis of a C-terminally extended protein.

All factors involved in translation termination or stop codon readthrough constitute targets for the development of therapeutic approaches to treating genetic diseases caused by nonsense mutations. By inhibiting the synthesis of these factors or in some cases by overproducing them, stop codon readthrough is activated. Readthrough activation could thus represent a potential way to correct a nonsense mutation responsible for a pathology. Molecules capable of targeting the trans factors described in this section could be sought in the framework of developing a therapeutic approach. Yet to date, as discussed in Section V, this is not yet a common approach to identify readthrough molecules. The strategy used focuses on searching for molecules that target the readthrough mechanism as a whole, rather than targeting a specific factor.

### (b) Small molecules

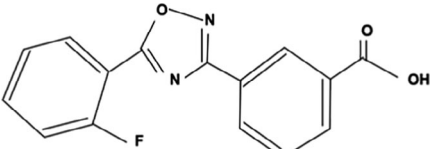
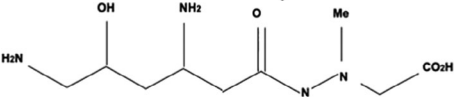
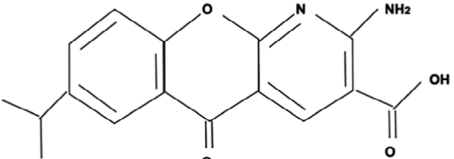
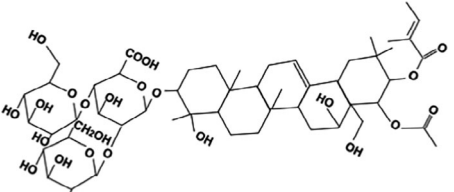
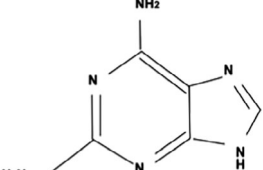
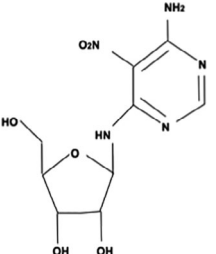
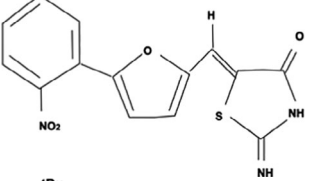
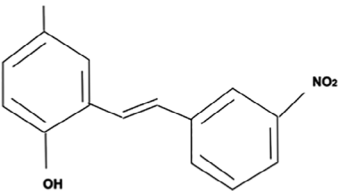
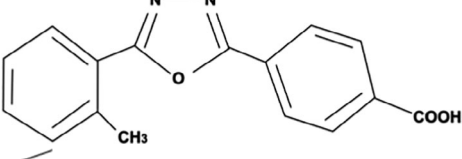
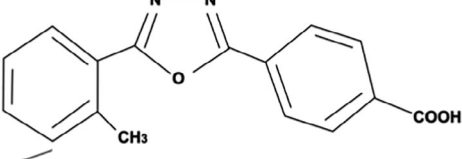
Because of their potential therapeutic interest, molecules activating PTC readthrough have been the focus of many studies. Historically, some members of the aminoglycoside family have shown the capacity to promote PTC readthrough (Burke & Mogg, 1985). This family of molecules is composed of a sugar substituted with one amino group. However, not all members of this family promote significant stop codon readthrough: gentamicin, geneticin (G418),

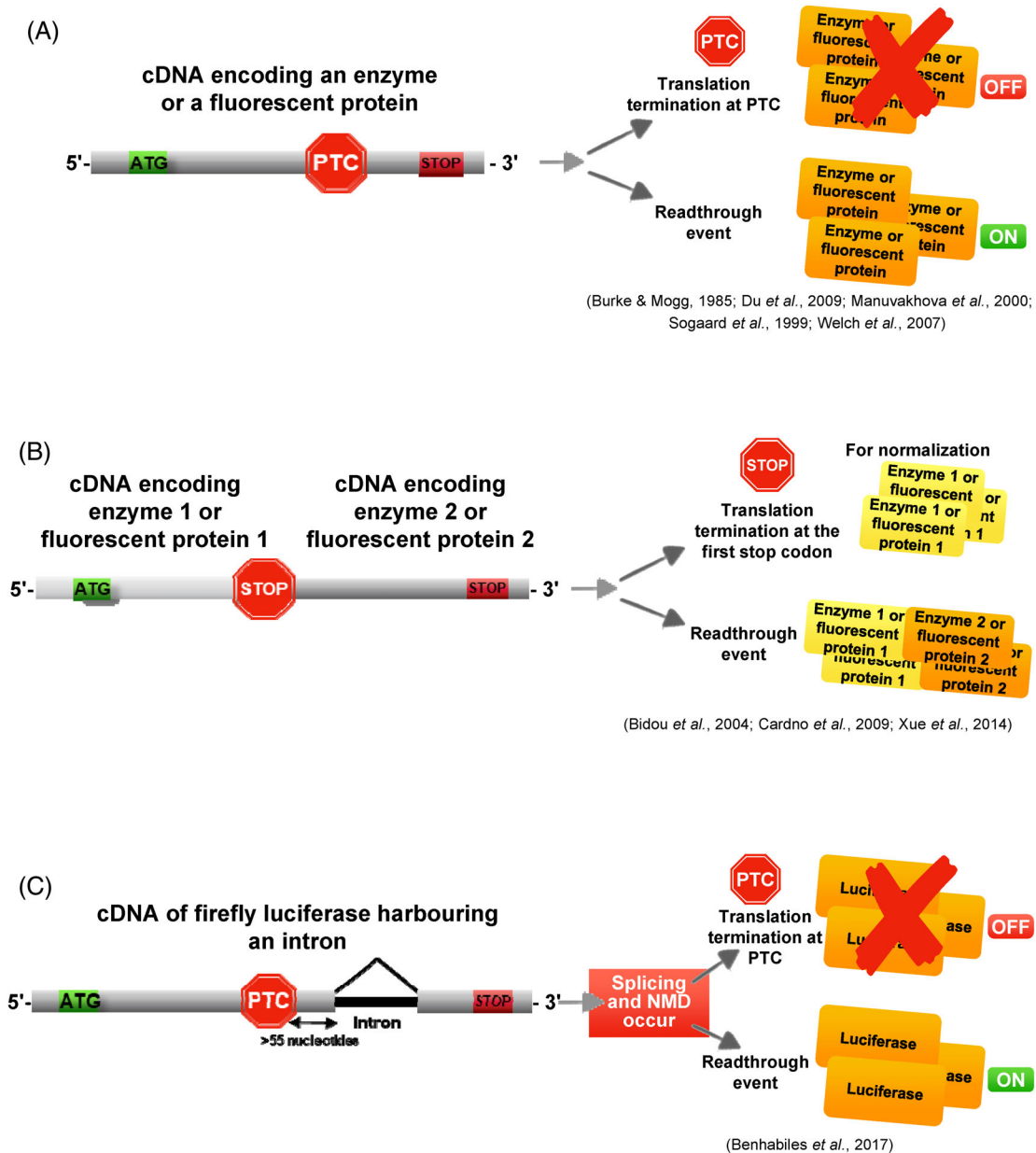
paromomycin, neomycin, and lividomycin do have this effect (Table 1), but hygromycin, streptomycin, kanamycin, tobramycin, and amikacin do not (Manuvakhova *et al.*, 2000). Aminoglycosides promote stop codon readthrough by interacting with the 16S ribosomal RNA located in the decoding centre of the ribosome (Carter *et al.*, 2000; Ogle, Carter, & Ramakrishnan, 2003; Zingman *et al.*, 2007; Prokhorova *et al.*, 2017). Besides aminoglycosides, several non-aminoglycoside molecules have also been shown to promote PTC readthrough (Table 2). PTC124/ataluren/translarna, an oxadiazole derivative, is the only molecule to have reached clinical phase II/III trials for the treatment of genetic diseases caused by nonsense mutations (Welch *et al.*, 2007; Kerem *et al.*, 2014). This molecule, which can rescue expression of genes carrying UGA, UAG, or UAA nonsense mutations, has a mode of action that remains to be clarified, but might either target the A site of the ribosome as do aminoglycosides or interact directly with the stop codon to promote readthrough (Roy *et al.*, 2016; Tutone *et al.*, 2019). Even though the efficacy of this molecule seems too low for clinical development aimed at treating, for example, cystic fibrosis or Duchenne muscular dystrophy (Kerem *et al.*, 2014; Haas *et al.*, 2015), it does illustrate the need to identify readthrough molecules that might enhance the treatment of nonsense-mutation-related genetic diseases (Kong *et al.*, 2019). Among other readthrough molecules, a dipeptide-like hydrazide antibiotic negamycin, originally purified from *Streptomyces purpeofuscus*, appears more potent than aminoglycosides and less toxic, as do negamycin derivatives (Arakawa *et al.*, 2003; Taguchi *et al.*, 2014; Hamada *et al.*, 2019) (Table 2).

For more than 10 years, various screening systems have been used to identify compounds more potent than aminoglycosides and ataluren (Fig. 3). The readthrough compounds (RTCs) RTC13, RTC14, RTC204, RTC219, GJ071, GJ072, NV2907, NV2909, NV2899 and NV2913 (Du *et al.*, 2009, 2013; Tutone *et al.*, 2020) (Table 2) have been identified and tested on different constructs and cell models of nonsense-mutation-related genetic diseases. In most cases, these molecules have shown a readthrough activity similar to that of ataluren or aminoglycosides such as gentamicin (G418) (Du *et al.*, 2009; Gomez-Grau *et al.*, 2015; Tutone *et al.*, 2020).

Among the compounds identified as promoting induced translational readthrough, some have remarkable characteristics. The anti-allergy and anti-asthma drug Amlexanox, for example, has shown the capacity to both inhibit NMD and activate readthrough of UGA, UAG, and UAA nonsense mutations (Gonzalez-Hilarion *et al.*, 2012; Atanasova *et al.*, 2017; Banning, Schiff, & Tikkanen, 2017). The clinically approved molecule Escin has also been shown to exert this dual action (Mutyam *et al.*, 2016). In theory, such molecules should be more effective than molecules that only activate readthrough, since inhibiting NMD leads to an increased amount of RNA substrates for readthrough (Linde *et al.*, 2007; Gonzalez-Hilarion *et al.*, 2012). It seems, however, that this is not an absolute rule, as some

Table 2. Non-aminoglycoside molecules with known readthrough activity

| Compounds                 | Formula  | References                             |
|---------------------------|--|--|
| PTC124/ataluren/translama |    | Welch <i>et al.</i> (2007)             |
| Negamycin                 |    | Arakawa <i>et al.</i> (2003)           |
| Amlexanox                 |    | Gonzalez-Hilarion <i>et al.</i> (2012) |
| Escin                     |    | Mutyam <i>et al.</i> (2016)            |
| 2,6-diaminopurine (DAP)   |    | Trzaska <i>et al.</i> (2020)           |
| Clitocine                 |   | Wilde <i>et al.</i> (2007)             |
| RTC13                     |   | Du <i>et al.</i> (2009)                |
| RTC14                     |   |  |
| NV2445                    |  | Pibiri <i>et al.</i> (2018)            |
| PTC414                    |  | Moosajee <i>et al.</i> (2016)          |



**Fig. 3.** Strategies used to screen molecules for readthrough-promoting activity. (A) A premature termination codon (PTC) is introduced into a cDNA encoding an enzyme or a fluorescent protein. Measurement of the enzymatic activity or fluorescence related to this protein will indicate that readthrough has occurred. (B) Use of two cDNAs encoding enzymatic activity or fluorescence separated by a stop codon. The product of the first cDNA is used to normalize the signal. Measurement of the product of the second cDNA will indicate that readthrough has occurred. (C) Screening system with an intron introduced into a cDNA to promote a splicing event. The PTC is introduced more than 55 nucleotides upstream of the intronic sequence to activate nonsense-mediated mRNA decay (NMD) of the corresponding mRNA.

readthrough activators with no NMD-inhibiting action promote greater synthesis of full-length proteins than do dual-action molecules. For instance, the readthrough activators *Lepista flaccida* extract H7 and 2,6-diaminopurine, which do not inhibit NMD, correct UGA and UAA (extract H7) or UGA only (2,6-diaminopurine) more effectively than dual-action G418 (Correa-Cerro *et al.*, 2005; Benhabiles *et al.*, 2017; Trzaska *et al.*, 2020).

Clitocine is another molecule with a high readthrough-promoting capacity. However, this molecule, found in various mushroom species (including *Leucopaxillus giganteus* and *Lepista flaccida*) (Kubo *et al.*, 1986; Fortin *et al.*, 2006; Wilde *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2008; Benhabiles *et al.*, 2017; Trzaska *et al.*, 2020) unfortunately shows high toxicity, which limits its potential therapeutic development (Fortin *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2012). The mode of action of clitocine has been

studied. Interestingly, this molecule, whose structure resembles that of a nucleoside, is incorporated into RNA molecules during transcription, substituting for adenosines. Like adenosine, clitocine can preferentially pair with uracil, but it has been proposed that the translation termination factor eRF1 weakly recognizes stop codons containing clitocine, increasing the chance of near-cognate tRNA recruitment (Friesen *et al.*, 2017).

### (c) Cell environment

Cell culture conditions can also influence readthrough efficiency. In ribosome profiling experiments performed on the neural cell line PC12, oxygen and glucose deprivation were shown to inhibit programmed translational readthrough of 18 mRNAs with a UGA physiological stop codon followed by a cytosine: *Fkbp1a*, *Hadhb*, *Hs1bp3*, *Klc1*, *LOC102554884*, *Mdh1*, *Mrto4*, *Nedd8*, *Nudcd2*, *Plat*, *Polr2l*, *Ppp4c*, *Rfc2*, *Rnf111*, *Sec13*, *Slc7a1*, *Ssnal* and *Thy1* (Andreev *et al.*, 2015). Interestingly, this regulation occurs very rapidly: less than 20 min after starting hypoxia and low glucose, programmed translational readthrough was strongly reduced. Although the mode of action is not clear, it could be related to the loss of protein hydroxylation at the decoding centre of the ribosome.

Other cell culture conditions that seem to potentiate PTC readthrough notably include serum starvation. In a medium containing 1% serum, the PTC-readthrough efficacy of aminoglycosides can increase two- to threefold without modifying the translation activity on the mRNA substrates, as demonstrated using a dual-reporter green fluorescent protein (GFP)-blue fluorescent protein (BFP) construct (Wittenstein *et al.*, 2019). How serum starvation potentiates the readthrough activity of aminoglycosides is not yet understood, but given the influence of serum on gene expression, it seems likely that specific gene products acting as cofactors are over-expressed or repressed.

## V. THERAPEUTIC INTEREST OF STOP CODON READTHROUGH

Favouring stop codon readthrough to correct a nonsense mutation represents an attractive approach to the treatment of certain genetic diseases. About 11% of patients with a genetic disease carry a nonsense mutation responsible for its pathology (Mort *et al.*, 2008). The use of readthrough molecules was first tested in patients with cystic fibrosis caused by a nonsense mutation in the *CFTR* gene. The aminoglycoside gentamicin was administered intravenously, at 2.5 mg/kg every 8 h for 7 days, to five patients carrying nonsense mutations and five patients without nonsense mutation in *CFTR* (Clancy *et al.*, 2001). The results showed a mild but encouraging rescue of *CFTR* expression and function. Another study on cystic fibrosis patients demonstrated that rescue of *CFTR* function depends strongly on the nonsense

mutation: patients with the Y122X nonsense mutation seemed to respond better than patients carrying G542X, R1162X, or W1282X (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2007). Aminoglycosides (particularly gentamicin) have also been tested in patients with Duchenne muscular dystrophy (DMD) carrying a nonsense mutation in the *DMD* gene encoding dystrophin. Gentamicin has been tested in several studies with different protocols. In one study, four DMD patients with a nonsense mutation in the *DMD* gene were treated daily for 14 days with gentamicin at 7.5 mg/kg (Wagner *et al.*, 2001). This study concluded that the administered gentamicin treatment was unable to promote the synthesis of full-length dystrophin protein. In another study, positive results were obtained by intravenous administration of 7.5 mg/kg gentamicin, once or twice a week for 6 months, to patients carrying a nonsense mutation in the *DMD* gene, as compared to control patients carrying a frameshift mutation in the *DMD* gene (Malik *et al.*, 2010). The treatment was well tolerated by patients, without any sign of toxicity. The level of dystrophin protein increased in gentamicin-treated patients carrying a nonsense mutation, indicating that readthrough of the nonsense mutation occurred. However, the physical strength of these patients was unaffected by the treatment, implying that dystrophin rescue was insufficient.

The non-aminoglycoside molecule ataluren has also been tested on cystic fibrosis and DMD patients carrying nonsense mutations. This molecule was well tolerated by patients. DMD patients received ataluren orally three times daily at 4–4–8 mg/kg, 10–10–20 mg/kg, or 20–20–40 mg/kg for 28 days. At the end of the study, dystrophin was detected in patients at the lowest and middle doses but not in patients at the highest dose (Namgoong & Bertoni, 2016). After a 48-week exposure to ataluren or placebo, drug-treated patients showed no significant improvement in a 6-min walking-distance test as compared to the placebo group (Finkel *et al.*, 2013; Bushby *et al.*, 2014). For patients with cystic fibrosis caused by nonsense mutations, several phase II and III clinical trials have been completed. Physical improvement was observed in patients having received ataluren *versus* placebo, although this improvement remained modest (Kerem *et al.*, 2008; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2010; Lee & Dougherty, 2012).

The results of the clinical trials performed with gentamicin or ataluren clearly demonstrate that it is possible to correct nonsense mutations by inducing PTC readthrough in patients. Although no cure for patients with nonsense-mutation-related genetic diseases is yet available, these encouraging results warrant both optimization of the tested protocols and a search for new therapeutic approaches.

## VI. NEW DEVELOPMENTS AND THERAPEUTIC TARGETS

As described below, aminoglycosides have high potential to correct nonsense mutations. Yet because of their oto- and

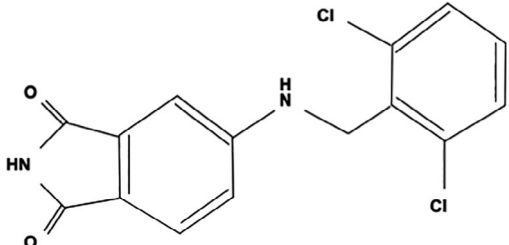
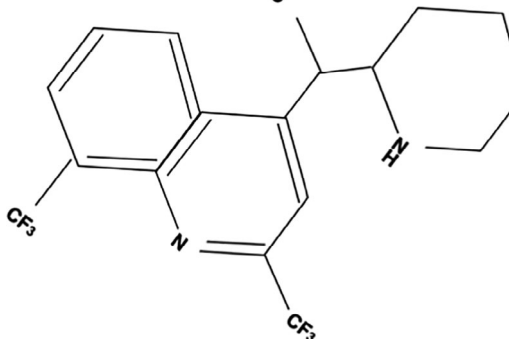
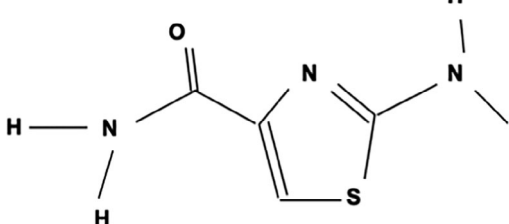
nephrotoxicity, their clinical development has been limited (Greenwood, 1959; Heck, Hinshaw, & Parsons, 1963; Matz, 1993; Hock & Anderson, 1995; Swan, 1997; Mingeot-Leclercq & Tulkens, 1999; Wu *et al.*, 2001). To address this issue, aminoglycoside derivatives have been synthesized and tested for the capacity to correct nonsense mutations while showing lower toxicity. Several molecules meeting these criteria appear to be good candidates for treating genetic diseases caused by nonsense mutations, their efficacy having been demonstrated on cell lines and *in vivo* mouse models (Nudelman *et al.*, 2006; Nudelman *et al.*, 2009; Goldmann *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Shulman *et al.*, 2014; Xue *et al.*, 2014). One of these molecules, named ELX-02 (from Eloxx Pharmaceuticals), has already successfully passed clinical phase I (Leubitz *et al.*, 2019), and clinical phase II is ongoing. ELX-02 is much less toxic than gentamicin or G418, and no nephrotoxicity has been detected. Its readthrough efficiency is similar to that of G418, making this molecule an excellent drug candidate (Brasell *et al.*, 2019).

Regarding ataluren (from PTC Therapeutics), the quest to identify derivative molecules with higher efficacy has already begun. Molecules such as NV2445 and PTC414 seem to offer a slightly higher readthrough efficiency. Provided their

toxicity is no higher than that of ataluren, they could represent optimized versions of this drug (Moosajee *et al.*, 2016; Pibiri *et al.*, 2018).

One of the biggest challenges is to identify low-toxicity molecules with a significantly higher readthrough efficiency than reference molecules such as G418. To identify readthrough molecules, many screening systems have been devised (Fig. 3). They are based on the use of either (i) one cDNA encoding a fluorescent protein or enzyme, in which a stop codon has been introduced to interrupt the ORF and prevent synthesis of the functional protein (Fig. 3A) (Burke & Mogg, 1985; Sogaard, Jakobsen, & Justesen, 1999; Manuvakhova *et al.*, 2000; Welch *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2009) or (ii) two cDNAs encoding fluorescent proteins or enzymes, separated by a stop codon (Fig. 3B) (Bidou *et al.*, 2004; Cardno *et al.*, 2009; Xue *et al.*, 2014). In the latter case, the level of protein produced from the first cDNA is used to normalize measurements between samples, and the level of protein produced from the second ORF reflects the readthrough efficiency. The advantage of these constructs is that they are not spliced downstream of the premature termination codon, so that the corresponding mRNA is not subject to NMD (Lejeune & Maquat, 2005). This makes it possible to identify

Table 3. Readthrough potentiator molecules

| Compounds  | Formula  | References                            |
|--|--|---------------------------------------|
| CDX5-1 (2-(2,6-dichlorobenzyl)isoindoline-1,3-dione) |  | Baradaran-Heravi <i>et al.</i> (2016) |
| Mefloquine   |  | Ferguson <i>et al.</i> (2019)         |
| 2-aminothiazole-4-carboxamides                       |  | Rabea <i>et al.</i> (2019)            |

molecules on the sole basis of their readthrough-promoting activity. However, with such constructs there is a risk of selecting molecules with low readthrough efficiency (and hence low therapeutic efficacy), as testing is done on mRNAs present in huge copy numbers. In addition, as the pre-mRNAs of more than 90% of human genes are subject to splicing, the corresponding PTC-carrying mRNAs will be substrates for NMD, which will strongly reduce the copy number of substrates for readthrough. It is important to bear in mind that this is the prevailing situation in patient cells. To identify molecules capable of correcting nonsense mutations in these cells, screening systems should be designed with constructs subject to NMD. Such a screening system has been described: it consists of a cDNA encoding the firefly luciferase interrupted by an intron and an upstream PTC (Fig. 3C) (Benhabiles *et al.*, 2017). It has been shown that the firefly luciferase pre-mRNA is spliced and the mRNA degraded by NMD. The luciferase activity measured in this screening system thus depends on the efficiency of readthrough occurring on the number of firefly luciferase mRNAs that have escaped NMD. This screening system has been used successfully to identify *Lepista flaccida* fungus extract H7 and 2,6-diaminopurine as two highly potent correctors of nonsense mutations in human cells (Benhabiles *et al.*, 2017; Trzaska *et al.*, 2020).

Studies aiming to increase the effectiveness of readthrough compounds have identified some molecules that potentiate the readthrough activity of aminoglycosides (Table 3). Interestingly, these molecules do not promote readthrough by themselves. For example, the phthalimide derivative CDX5-1 increases about 180-fold the readthrough efficiency of G418 in both yeast and human cells (Baradaran-Heravi *et al.*, 2016). More recently discovered potentiators of aminoglycosides include the antimalarial mefloquine (Ferguson *et al.*, 2019) and 2-aminothiazole-4-carboxamides (Rabea *et al.*, 2019). How these molecules improve the readthrough efficiency of aminoglycosides is unclear, but by making it possible to administer lower doses of aminoglycosides, they should reduce aminoglycoside-linked toxic effects.

As the use of screening systems to identify molecules with readthrough activity takes time and money, new targeted approaches are being or could be developed to promote efficient readthrough. One such approach is based on the mechanism of action of 2,6-diaminopurine, recently shown to promote readthrough of UGA premature stop codons by interfering with the function of filamentous temperature sensitive J1 (FTSJ1). This enzyme is a methyltransferase targeting position C34 of the tRNA carrying tryptophan and recognizing the UGG codon (Trzaska *et al.*, 2020). Decreased C34 methylation allows this tRNA to recognize also the UGA stop codon (Trzaska *et al.*, 2020). Hence, tRNA-modifying enzymes appear as interesting targets. This readthrough-activating strategy seems more effective than targeting the ribosome, but it remains to be validated through identification of new molecules targeting other tRNA-modification enzymes. Another potential target in the search for readthrough-promoting molecules is the ATP-binding domain 3/cytosolic thiouridylase subunit

1 (ATPBD3/CTU1) protein. This tRNA-modifying enzyme notably acts at the anticodon loop of near-cognate tRNAs, enabling them to recognize a UAG or UAA stop codon (Blanchet *et al.*, 2018).

Pseudouridylation is another post-transcriptional modification occurring on RNA molecules that might be used to activate stop codon readthrough. Interestingly, pseudouridylation converts a uridine to a pseudouridine, which can pair with all four conventional bases (Kierzek *et al.*, 2014). Protocols have been designed to induce site-directed pseudouridylation at the uridine constituting the first base of all three stop codons (Wu, Huang, & Yu, 2015). The idea is that the presence of a pseudouridine at this position will stabilize near-cognate tRNAs and increase basal readthrough of this stop codon.

A final approach worth mentioning is direct modification of tRNA anticodon sequences, enabling them to pair with stop codons. Such tRNAs, called suppressor tRNAs, have been investigated as potential therapeutics for almost 40 years (Temple *et al.*, 1982), and research is still ongoing. Very recently, investigators have described a high-throughput cloning system for identifying tRNAs that suppress nonsense mutations with high efficiency (Lueck *et al.*, 2019). Interestingly, a comparative study of suppressor tRNAs and readthrough molecules such as gentamicin and G418 demonstrated a superior nonsense-mutation-correcting efficiency of the tested tRNAs. A legitimate question is whether such molecules affect translation termination at physiological stop codons. Lueck *et al.* (2019), using ribosome profiling, showed that suppressor tRNAs do read through physiological stop codons in rare cases, but that this readthrough is much less efficient than PTC readthrough. A limitation of this very promising approach remains delivery of the suppressor tRNA to the cells of patients liable to benefit from correction of a nonsense mutation responsible for a genetic disease.

## VII. CONCLUSIONS

- (1) Stop codon readthrough is a natural process resulting in continuation of translation beyond the first stop codon encountered in phase with the translation initiation codon. The mechanism determining whether the translation machinery recruits a tRNA to promote translational readthrough, or the translation termination complex to the stop codon remains poorly understood.
- (2) Several types of stop codon readthrough can be identified. Non-programmed translational readthrough or basal stop codon readthrough arises as a translational error without any cis and/or trans facilitator elements and at a very low rate. Programmed translational readthrough involves cis and/or trans activator elements, and often reaches more than 20% efficiency. The cis and trans elements described herein constitute



first steps in understanding of the molecular mechanisms involved. Induced translational readthrough involves small molecules that increase the recruitment of near-cognate tRNAs when the ribosome pauses at a stop codon.

- (3) Several regulator elements have been reported to modulate stop codon readthrough. The nucleotide sequence in the vicinity of the stop codon has been reported strongly to influence the stop codon readthrough rate. RNAs, proteins and small molecules also play a role in stop codon readthrough efficacy. Given the therapeutic potential of activators of PTC-readthrough, regulator elements responsible for high efficiency of readthrough deserve in-depth study. It is essential to fill the gaps in our knowledge of the molecular events leading to stop codon readthrough and its regulation. This should be accomplished by studying the molecular mechanism of stop codon recognition and the mode of action of readthrough molecules.
- (4) None of the therapeutic approaches under development to correct nonsense mutations responsible for genetic diseases has yet come to fruition. However, the diversity of strategies explored makes the field of nonsense mutation correction highly dynamic. Step by step, personalized therapeutic strategies based on stop codon readthrough are taking form. They should, in the near future, yield treatments for genetic diseases caused by nonsense mutations.

## ACKNOWLEDGEMENTS

M.P. is supported by a grant from la Région Hauts-de-France and l'Université de Lille. F.L. is an Inserm researcher supported by funding from Vaincre la mucoviscidose, La Ligue Contre le Cancer and the GIP Cancéropôle Nord Ouest.

## VIII. REFERENCES

- AGRIS, P. F., NARENDHAN, A., SARACHAN, K., VARE, V. Y. P. & ERUYAL, E. (2017). The importance of being modified: the role of RNA modifications in translational fidelity. *Enzyme* **41**, 1–50.
- ALARCON, C. R., GOODARZI, H., LEE, H., LIU, X., TAVAZOIE, S. & TAVAZOIE, S. F. (2015). HNRNPA2B1 is a mediator of m(6)A-dependent nuclear RNA processing events. *Cell* **162**(6), 1299–1308.
- ANDREEV, D. E., O'CONNOR, P. B., ZHDANOV, A. V., DMITRIEV, R. I., SHATSKY, I. N., PAPKOVSKY, D. B. & BARANOV, P. V. (2015). Oxygen and glucose deprivation induces widespread alterations in mRNA translation within 20 minutes. *Genome Biology* **16**, 90.
- ARAKAWA, M., SHIOZUKA, M., NAKAYAMA, Y., HARA, T., HAMADA, M., KONDO, S., IKEDA, D., TAKAHASHI, Y., SAWA, R., NONOMURA, Y., SHEYKHOLESLAMI, K., KONDO, K., KAGA, K., KITAMURA, T., SUZUKI-MYAGOE, Y., et al. (2003). Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice. *The Journal of Biochemistry* **134**(5), 751–758.
- ATANASOVA, V. S., JIANG, Q., PRISCO, M., GRUBER, C., PINON HOFBAUER, J., CHEN, M., HAS, C., BRUCKNER-TUDERMAN, L., McGRATH, J. A., UITTO, J. & SOUTH, A. P. (2017). Amlexanox enhances premature termination codon read-through in COL7A1 and expression of full length type VII collagen: potential therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Journal of Investigative Dermatology* **137**(9), 1842–1849.
- BANNING, A., SCHIFF, M. & TIKKANEN, R. (2017). Amlexanox provides a potential therapy for nonsense mutations in the lysosomal storage disorder aspartylglucosaminuria. *Biochimica et Biophysica Acta* **1864**(3), 668–675.
- BARADARAN-HERAVI, A., BALGI, A. D., ZIMMERMAN, C., CHOI, K., SHIDMOOSAVEE, F. S., TAN, J. S., BERGEAUD, C., KRAUSE, A., FLIBOTTE, S., SHIMIZU, Y., ANDERSON, H. J., MOULY, V., JAN, E., PFEIFER, T., JAQUITH, J. B. & ROBERGE, M. (2016). Novel small molecules potentiate premature termination codon readthrough by aminoglycosides. *Nucleic Acids Research* **44**(14), 6583–6598.
- BEDNAROVA, A., HANNA, M., DURHAM, I., VANCLEAVE, T., ENGLAND, A., CHAUDHURI, A. & KRISHNAN, N. (2017). Lost in translation: defects in transfer RNA modifications and neurological disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **10**, 135.
- BEIER, H. & GRIMM, M. (2001). Misreading of termination codons in eukaryotes by natural nonsense suppressor tRNAs. *Nucleic Acids Research* **29**(23), 4767–4782.
- BEISSEL, C., NEUMANN, B., UHSE, S., HAMPE, I., KARKI, P. & KREBBER, H. (2019). Translation termination depends on the sequential ribosomal entry of eRF1 and eRF3. *Nucleic Acids Research* **47**(9), 4798–4813.
- BENHABILES, H., GONZALEZ-HILARION, S., AMAND, S., BAILLY, C., PREVOTAT, A., REIX, P., HUBERT, D., ADRIENSSENS, E., REBUFFAT, S., TULASNE, D. & LEJEUNE, F. (2017). Optimized approach for the identification of highly efficient correctors of nonsense mutations in human diseases. *PLoS One* **12**(11), e0187930.
- BERIAULT, V., CLEMENT, J. F., LEVESQUE, K., LEBEL, C., YONG, X., CHABOT, B., COHEN, E. A., COCHRANE, A. W., RIGBY, W. F. & MOULAND, A. J. (2004). A late role for the association of hnRNP A2 with the HIV-1 hnRNP A2 response elements in genomic RNA, gag, and Vpr localization. *The Journal of Biological Chemistry* **279**(42), 44141–44153.
- BEZOSKOVA, P., WAGNER, S., JANSEN, M. E., VON DER HAAR, T. & VALASEK, L. S. (2015). Translation initiation factor eIF3 promotes programmed stop codon readthrough. *Nucleic Acids Research* **43**(10), 5099–5111.
- BEZZERRI, V., API, M., ALLEGRI, M., FABRIZZI, B., COREY, S. J. & CIPOLLI, M. (2020). Nonsense suppression therapy: new hypothesis for the treatment of inherited bone marrow failure syndromes. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(13), 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijms21134672>.
- BIDOU, L., HATIN, I., PEREZ, N., ALLAMAND, V., PANTHIER, J. J. & ROUSSET, J. P. (2004). Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. *Gene Therapy* **11**(7), 619–627.
- BLANCHET, S., CORNU, D., HATIN, I., GROSJEAN, H., BERTIN, P. & NAMY, O. (2018). Deciphering the reading of the genetic code by near-cognate tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**(12), 3018–3023.
- BONETTI, B., FU, L., MOON, J. & BEDWELL, D. M. (1995). The efficiency of translation termination is determined by a synergistic interplay between upstream and downstream sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Molecular Biology* **251**(3), 334–345.
- BRASELL, E. J., CHU, L. L., AKPA, M. M., ESHKAR-OREN, I., ALROY, I., CORSINI, R., GILFIX, B. M., YAMANAKA, Y., HUERTAS, P. & GOODYER, P. (2019). The novel aminoglycoside, ELX-02, permits CTNSW138X translational read-through and restores lysosomal cystine efflux in cystinosis. *PLoS One* **14**(12), e0223954.
- BROWN, C. M., STOCKWELL, P. A., TROTMAN, C. N. & TATE, W. P. (1990). Sequence analysis suggests that tetra-nucleotides signal the termination of protein synthesis in eukaryotes. *Nucleic Acids Research* **18**(21), 6339–6345.
- BROWN, A., SHAO, S., MURRAY, J., HEGDE, R. S. & RAMAKRISHNAN, V. (2015). Structural basis for stop codon recognition in eukaryotes. *Nature* **524**(7566), 493–496.
- BURKE, J. F. & MOGG, A. E. (1985). Suppression of a nonsense mutation in mammalian cells in vivo by the aminoglycoside antibiotics G-418 and paromomycin. *Nucleic Acids Research* **13**(17), 6265–6272.
- BUSHBY, K., FINKEL, R., WONG, B., BAROHN, R., CAMPBELL, C., COMI, G. P., CONNOLLY, A. M., DAY, J. W., FLANIGAN, K. M., GOEMANS, N., JONES, K. J., MERCURI, E., QUINLIVAN, R., RENFROE, J. B., RUSSMAN, B., RYAN, M. M., TULINIUS, M., VOIT, T., MOORE, S. A., LEE SWEENEY, H., ABRESCH, R. T., COLEMAN, K. L., EAGLE, M., FLORENCE, J., GAPPMAIER, E., GLANZMAN, A. M., HENRICSON, E., BARTH, J., ELFRING, G. L., REHA, A., SPIEGEL, R. J., O'DONNELL, M. W., PELTZ, S. W., MCDONALD, C. M. & FOR THE PTC124-GD-007-DMD STUDY GROUP (2014). Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle & Nerve* **50**(4), 477–487.
- CARDNO, T. S., POOLE, E. S., MATHEW, S. F., GRAVES, R. & TATE, W. P. (2009). A homogeneous cell-based bicistronic fluorescence assay for high-throughput identification of drugs that perturb viral gene recoding and read-through of nonsense stop codons. *RNA* **15**(8), 1614–1621.
- CARTER, A. P., CLEMONS, W. M., BRODERSEN, D. E., MORGAN-WARREN, R. J., WIMBERLY, B. T. & RAMAKRISHNAN, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* **407**(6802), 340–348.
- CASSAN, M. & ROUSSET, J. P. (2001). UAG readthrough in mammalian cells: effect of upstream and downstream stop codon contexts reveal different signals. *BMC Molecular Biology* **2**, 3.

- CHITNUM, H. S., LANE, W. S., CARLSON, B. A., ROLLER, P. P., LUNG, F. D., LEE, B. J. & HATFIELD, D. L. (1998). Rabbit beta-globin is extended beyond its UGA stop codon by multiple suppressions and translational reading gaps. *Biochemistry* **37**(31), 10866–10870.
- CLANCY, J. P., BEBOK, Z., RUIZ, F., KING, C., JONES, J., WALKER, L., GREER, H., HONG, J., WING, L., MACALUSO, M., LYRENE, R., SORSCHER, E. J. & BEDWELL, D. M. (2001). Evidence that systemic gentamicin suppresses premature stop mutations in patients with cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **163**(7), 1683–1692.
- CORREA-CERRO, L. S., WASSIF, C. A., WAYE, J. S., KRAKOWIAK, P. A., COZMA, D., DOBSON, N. R., LEVIN, S. W., ANADIOTIS, G., STEINER, R. D., KRAJEWSKA-WALASEK, M., NOWACZYK, M. J. & PORTER, F. D. (2005). DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of Medical Genetics* **42**(4), 350–357.
- CRICK, F. H. (1966). Codon–anticodon pairing: the wobble hypothesis. *Journal of Molecular Biology* **19**(2), 548–555.
- CUTTING, G. R., KASCH, L. M., ROSENSTEIN, B. J., TSUI, L. C., KAZAZIAN, H. H. JR. & ANTONARAKIS, S. E. (1990). Two patients with cystic fibrosis, nonsense mutations in each cystic fibrosis gene, and mild pulmonary disease. *New England Journal of Medicine* **323**(24), 1685–1689.
- DABROWSKI, M., BUKOWY-BIERVILLO, Z. & ZIETKIEWICZ, E. (2018). Advances in therapeutic use of a drug-stimulated translational readthrough of premature termination codons. *Molecular Medicine* **24**(1), 25.
- DEVER, T. E., KINZY, T. G. & PAVITT, G. D. (2016). Mechanism and regulation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **203**(1), 65–107.
- DU, L., DAMOISEAUX, R., NAHAS, S., GAO, K., HU, H., POLLARD, J. M., GOLDSTINE, J., JUNG, M. E., HENNING, S. M., BERTONI, C. & GATTI, R. A. (2009). Nonaminoglycoside compounds induce readthrough of nonsense mutations. *Journal of Experimental Medicine* **206**(10), 2285–2297.
- DU, L., JUNG, M. E., DAMOISEAUX, R., COMPLETO, G., FIKE, F., KU, J. M., NAHAS, S., PIAO, C., HU, H. & GATTI, R. A. (2013). A new series of small molecular weight compounds induce read through of all three types of nonsense mutations in the ATM gene. *Molecular Therapy* **21**(9), 1653–1660.
- DUECHLER, M., LESZCZYNSKA, G., SOCHACKA, E. & NAWROT, B. (2016). Nucleoside modifications in the regulation of gene expression: focus on tRNA. *Cellular and Molecular Life Sciences* **73**(16), 3075–3095.
- DUNN, J. G., FOO, C. K., BELLETIER, N. G., GAVIS, E. R. & WEISSMAN, J. S. (2013). Ribosome profiling reveals pervasive and regulated stop codon readthrough in *Drosophila melanogaster*. *eLife* **2**, e01179.
- ESWARAPPA, S. M., POTDAR, A. A., KOCH, W. J., FAN, Y., VASU, K., LINDNER, D., WILLARD, B., GRAHAM, L. M., DICORLETO, P. E. & FOX, P. L. (2014). Programmed translational readthrough generates antiangiogenic VEGF-ax. *Cell* **157**(7), 1605–1618.
- FEARON, K., MCCLENDON, V., BONETTI, B. & BEDWELL, D. M. (1994). Premature translation termination mutations are efficiently suppressed in a highly conserved region of yeast Ste6p, a member of the ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Journal of Biological Chemistry* **269**(27), 17802–17808.
- FENG, Y. X., COPELAND, T. D., OROSZLAN, S., REIN, A. & LEVIN, J. G. (1990). Identification of amino acids inserted during suppression of UAA and UGA termination codons at the gag-pol junction of Moloney murine leukemia virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(22), 8860–8863.
- FERGUSON, M. W., GERAK, C. A. N., CHOW, C. C. T., RASTELLI, E. J., ELMORE, K. E., STAHL, F., HOSSEINI-FARAHABADI, S., BARADARAN-HERAVI, A., COLTART, D. M. & ROBERGE, M. (2019). The antimalarial drug mefloquine enhances TP53 premature termination codon readthrough by aminoglycoside G418. *PLoS One* **14**(5), e0216423.
- FINKEL, R. S., FLANIGAN, K. M., WONG, B., BONNEMANN, C., SAMPSON, J., SWEENEY, H. L., REHA, A., NORTH CUTT, V. J., ELFRING, G., BARTH, J. & PELTZ, S. W. (2013). Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* **8**(12), e81302.
- FIRTH, A. E., WILLS, N. M., GESTELAND, R. F. & ATKINS, J. F. (2011). Stimulation of stop codon readthrough: frequent presence of an extended 3' RNA structural element. *Nucleic Acids Research* **39**(15), 6679–6691.
- FLOQUET, C., HATIN, I., ROUSSET, J. P. & BIDOU, L. (2012). Statistical analysis of readthrough levels for nonsense mutations in mammalian cells reveals a major determinant of response to gentamicin. *PLoS Genetics* **8**(3), e1002608.
- FORTIN, H., TOMASI, S., DELCROS, J. G., BANSARD, J. Y. & BOUSTIE, J. (2006). *In vivo* antitumor activity of clitocine, an exocyclic amino nucleoside isolated from *Lepista inversa*. *ChemMedChem* **1**(2), 189–196.
- FREITAG, J., AST, J. & BOLKER, M. (2012). Cryptic peroxisomal targeting via alternative splicing and stop codon read-through in fungi. *Nature* **485**(7399), 522–525.
- FRIESE, W. J., TROTTA, C. R., TOMIZAWA, Y., ZHUO, J., JOHNSON, B., SIERRA, J., ROY, B., WEETALL, M., HEDRICK, J., SHEEDY, J., TAKASUGI, J., MOON, Y. C., BABU, S., BAIJAZITOV, R., LESZYK, J. D., DAVIS, T. W., COLACINO, J. M., PELTZ, S. W. & WELCH, E. M. (2017). The nucleoside analog clitocine is a potent and efficacious readthrough agent. *RNA* **23**(4), 567–577.
- GELLER, A. I. & RICH, A. (1980). A UGA termination suppression tRNA<sup>Trp</sup> active in rabbit reticulocytes. *Nature* **283**(5742), 41–46.
- GOLDMANN, T., OVERLACK, N., MOLLER, F., BELAKHOV, V., VAN WYK, M., BAASOV, T., WOLFRUM, U. & NAGEL-WOLFRUM, K. (2012). A comparative evaluation of NB30, NB54 and PTC124 in translational read-through efficacy for treatment of a USH1C nonsense mutation. *EMBO Molecular Medicine* **4**(11), 1186–1199.
- GOMEZ-GRAU, M., GARRIDO, E., COZAR, M., RODRIGUEZ-SUREDA, V., DOMINGUEZ, C., ARENAS, C., GATTI, R. A., CORMAND, B., GRINBERG, D. & VILAGELIU, L. (2015). Evaluation of aminoglycoside and non-aminoglycoside compounds for stop-codon readthrough therapy in four lysosomal storage diseases. *PLoS One* **10**(3), e0135873.
- GONZALEZ-HILARION, S., BEGHYN, T., JIA, J., DEBREUCK, N., BERGE, G., MAMCHAOU, K., MOULY, V., GRUENERT, D. C., DEPREZ, B. & LEJEUNE, F. (2012). Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **7**, 58.
- GREENWOOD, G. J. (1959). Neomycin ototoxicity; report of a case. *A.M.A. Archives of Otolaryngology* **69**(4), 390–397.
- GROSJEAN, H. & WESTHOF, E. (2016). An integrated, structure- and energy-based view of the genetic code. *Nucleic Acids Research* **44**(17), 8020–8040.
- GROSS, T., SIEPMANN, A., STURM, D., WINDGASSEN, M., SCARCELLI, J. J., SEEDORF, M., COLE, C. N. & KREBBER, H. (2007). The DEAD-box RNA helicase Dbp5 functions in translation termination. *Science* **315**(5812), 646–649.
- GUPTA, P. & LI, Y. R. (2018). Upf proteins: highly conserved factors involved in nonsense mRNA mediated decay. *Molecular Biology Reports* **45**(1), 39–55.
- HAAS, M., VLCEK, V., BALABANOV, P., SALMONSON, T., BAKCHINE, S., MARKEY, G., WEISE, M., SCHLOSSER-WEBER, G., BROHMANN, H., YERRO, C. P., MENDIZABAL, M. R., STOVANOVA-BENINSKA, V. & HILLEGE, H. L. (2015). European medicines agency review of ataluren for the treatment of ambulant patients aged 5 years and older with Duchenne muscular dystrophy resulting from a nonsense mutation in the dystrophin gene. *Neuromuscular Disorders* **25**(1), 5–13.
- HAGERVALL, T. G., ERICSON, J. U., ESBERG, K. B., LI, J. N. & BJORK, G. R. (1990). Role of tRNA modification in translational fidelity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1050**(1–3), 263–266.
- HAMADA, K., OMURA, N., TAGUCHI, A., BARADARAN-HERAVI, A., KOTAKE, M., ARAI, M., TAKAYAMA, K., TANIGUCHI, A., ROBERGE, M. & HAYASHI, Y. (2019). New negamycin-based potent readthrough derivative effective against TGA-type nonsense mutations. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **10**(10), 1450–1456.
- HARGER, J. W. & DINMAN, J. D. (2004). Evidence against a direct role for the Upf proteins in frameshifting or nonsense codon readthrough. *RNA* **10**(11), 1721–1729.
- HARRELL, L., MELCHER, U. & ATKINS, J. F. (2002). Predominance of six different hexanucleotide recoding signals 3' of read-through stop codons. *Nucleic Acids Research* **30**(9), 2011–2017.
- HE, F. & JACOBSON, A. (2015). Nonsense-mediated mRNA decay: degradation of defective transcripts is only part of the story. *Annual Review of Genetics* **49**, 339–366.
- HECK, W. E., HINSHAW, H. C. & PARSONS, H. G. (1963). Auditory ototoxicity in tuberculosis patients treated with a report of the incidence of hearing loss in a series of 1,150 cases. *JAMA* **186**, 18–20.
- HOCK, R. & ANDERSON, R. J. (1995). Prevention of drug-induced nephrotoxicity in the intensive care unit. *Journal of Critical Care* **10**(1), 33–43.
- HOUCK-LOOMIS, B., DURNAY, M. A., SALGUERO, C., SHANKAR, N., NAGLE, J. M., GOFF, S. P. & D'SOUZA, V. M. (2011). An equilibrium-dependent retroviral mRNA switch regulates translational recoding. *Nature* **480**(7378), 561–564.
- HOWARD, M. T., SHIRTS, B. H., PETROS, L. M., FLANIGAN, K. M., GESTELAND, R. F. & ATKINS, J. F. (2000). Sequence specificity of aminoglycoside-induced stop Codon readthrough: potential implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology* **48**(2), 164–169.
- IVANOV, P. V., GEHRING, N. H., KUNZ, J. B., HENTZE, M. W. & KULOZIK, A. E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO Journal* **27**(5), 736–747.
- JIA, J., WERKMEISTER, E., GONZALEZ-HILARION, S., LEROY, C., GRUENERT, D. C., LAFONT, F., TULASNE, D. & LEJEUNE, F. (2017). Premature termination codon readthrough in human cells occurs in novel cytoplasmic foci and requires UPF proteins. *Journal of Cell Science* **130**(18), 3009–3022.
- JUNGREIS, I., CHAN, C. S., WATERHOUSE, R. M., FIELDS, G., LIN, M. F. & KELLIS, M. (2016). Evolutionary dynamics of abundant stop codon readthrough. *Molecular Biology and Evolution* **33**(12), 3108–3132.
- KAPUR, M., MONAGHAN, C. E. & ACKERMAN, S. L. (2017). Regulation of mRNA translation in neurons—a matter of life and death. *Neuron* **96**(3), 616–637.
- KEELING, K. M., SALAS-MARCO, J., OSHEROVICH, L. Z. & BEDWELL, D. M. (2006). Tpa1p is part of an mRNA complex that influences translation termination, mRNA deadenylation, and mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **26**(14), 5237–5248.
- KEREM, B. S., ZIELENSKI, J., MARKIEWICZ, D., BOZON, D., GAZIT, E., YAHAV, J., KENNEDY, D., RIORDAN, J. R., COLLINS, F. S., ROMMENS, J. M. & TSUI, L. C. (1990). Identification of mutations in regions corresponding to the two putative nucleotide (ATP)-binding folds of the cystic fibrosis gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**(21), 8447–8451.
- KEREM, E., HIRAWAT, S., ARMONI, S., YAAKOV, Y., SHOSEYOV, D., COHEN, M., NISSIM-RAFINIA, M., BLAU, H., RIVLIN, J., AVIRAM, M., ELFRING, G. L., NORTH CUTT, V. J.,

- MILLER, L. L., KEREM, B. & WILSCHANSKI, M. (2008). Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *The Lancet* **372**(9640), 719–727.
- KEREM, E., KONSTAN, M. W., DE BOECK, K., ACCURSO, F. J., SERMET-GAUDELUS, I., WILSCHANSKI, M., ELBORN, J. S., MELOTTI, P., BRONSVELD, I., FAJAG, I., MALFROOT, A., ROSENBLUTH, D. B., WALKER, P. A., MCCOLLEY, S. A., KNOOP, C., et al. (2014). Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet Respiratory Medicine* **2**(7), 539–547.
- KIERZEK, E., MALGOWSKA, M., LISOWIEC, J., TURNER, D. H., GDANIEC, Z. & KIERZEK, R. (2014). The contribution of pseudouridine to stabilities and structure of RNAs. *Nucleic Acids Research* **42**(5), 3492–3501.
- KLEPPE, A. S. & BORNBERG-BAUER, E. (2018). Robustness by intrinsically disordered C-termini and translational readthrough. *Nucleic Acids Research* **46**(19), 10184–10194.
- KONG, R., LASKIN, O. L., KAUSHIK, D., JIN, F., MA, J., MCINTOSH, J., SOUZA, M. & ALMSTEAD, N. (2019). Ataluren pharmacokinetics in healthy Japanese and caucasian subjects. *Clinical Pharmacology in Drug Development* **8**(2), 172–178.
- KUBO, I., KIM, M., WOOD, W. F. & NAOKI, H. (1986). Clitocine, a new insecticidal nucleoside from the mushroom *Clitocybe inversa*. *Tetrahedron Letters* **27**, 4277–4280.
- KUROSAKI, T. & MAQUAT, L. E. (2016). Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *Journal of Cell Science* **129**(3), 461–467.
- KUZMAK, H. A. & MAQUAT, L. E. (2006). Applying nonsense-mediated mRNA decay research to the clinic: Progress and challenges. *Trends in Molecular Medicine* **12**(7), 306–316.
- LABUNSKY, V. M., HATFIELD, D. L. & GLADYSHEV, V. N. (2014). Selenoproteins: molecular pathways and physiological roles. *Physiological Reviews* **94**(3), 739–777.
- LEE, H. L. & DOUGHERTY, J. P. (2012). Pharmaceutical therapies to recode nonsense mutations in inherited diseases. *Pharmacology & Therapeutics* **136**(2), 227–266.
- LEJEUNE, F. (2017). Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Reports* **50**, 175–185.
- LEJEUNE, F. & MAQUAT, L. E. (2005). Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology* **17**(3), 309–315.
- LEUBITZ, A., FRYDMAN-MAROM, A., SHARPE, N., VAN DUZER, J., CAMPBELL, K. C. M. & VANHOUTTE, F. (2019). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of single ascending doses of ELX-02, a potential treatment for genetic disorders caused by nonsense mutations, in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology in Drug Development* **8**(8), 984–994.
- LEVESQUE, K., HALVORSEN, M., ABRAHAMIAN, L., CHATEL-CHAIX, L., POUPON, V., GORDON, H., DESGROSELLERS, L., GATIGNOL, A. & MOULAND, A. J. (2006). Trafficking of HIV-1 RNA is mediated by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2 expression and impacts on viral assembly. *Traffic* **7**(9), 1177–1193.
- LI, Y., WANG, X., LI, C., HU, S., YU, J. & SONG, S. (2014). Transcriptome-wide N(6)-methyladenosine profiling of rice callus and leaf reveals the presence of tissue-specific competitors involved in selective mRNA modification. *RNA Biology* **11**(9), 1180–1188.
- LIN, M. F., CARLSON, J. W., CROSBY, M. A., MATTHEWS, B. B., YU, C., PARK, S., WAN, K. H., SCHROEDER, A. J., GRAMATES, L. S., ST PIERRE, S. E., ROARK, M., WILEY, K. L. JR., KULATHINAL, R. J., ZHANG, P., MYRICK, K. V., et al. (2007). Revisiting the protein-coding gene catalog of *Drosophila melanogaster* using 12 fly genomes. *Genome Research* **17**(12), 1823–1836.
- LINDE, L., BOELZ, S., NISSIM-RAFANIA, M., OREN, Y. S., WILSCHANSKI, M., YAACOV, Y., VIRGILIS, D., NEU-YILIK, G., KULOZIK, A. E., KEREM, E. & KEREM, B. (2007). Nonsense-mediated mRNA decay affects nonsense transcript levels and governs response of cystic fibrosis patients to gentamicin. *Journal of Clinical Investigation* **117**(3), 683–692.
- LOENARZ, C., SEKIRNIK, R., THALHAMMER, A., GE, W., SPIVAKOVSKY, E., MACKEN, M. M., McDONOUGH, M. A., COCKMAN, M. E., KESSLER, B. M., RATCLIFFE, P. J., WOLF, A. & SCHOFIELD, C. J. (2014). Hydroxylation of the eukaryotic ribosomal decoding center affects translational accuracy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**(11), 4019–4024.
- LOUGHRAN, G., CHOU, M. Y., IVANOV, I. P., JUNGREIS, I., KELLIS, M., KIRAN, A. M., BARANOV, P. V. & ATKINS, J. F. (2014). Evidence of efficient stop codon readthrough in four mammalian genes. *Nucleic Acids Research* **42**(14), 8928–8938.
- LOUGHRAN, G., JUNGREIS, I., TZANI, I., POWER, M., DMITRIEV, R. I., IVANOV, I. P., KELLIS, M. & ATKINS, J. F. (2018). Stop codon readthrough generates a C-terminally extended variant of the human vitamin D receptor with reduced calcitriol response. *The Journal of Biological Chemistry* **293**(12), 4434–4444.
- LUECK, J. D., YOON, J. S., PERALES-PUCHALT, A., MACKAY, A. L., INFELD, D. T., BEHLKE, M. A., POPE, M. R., WEINER, D. B., SKACH, W. R., MCCRAY, P. B. JR. & AHERN, C. A. (2019). Engineered transfer RNAs for suppression of premature termination codons. *Nature Communications* **10**(1), 822.
- MALIK, V., RODINO-KLAPAC, L. R., VIOLLET, L., WALL, C., KING, W., AL-DAHAK, R., LEWIS, S., SHILLING, C. J., KOTA, J., SERRANO-MUNUERA, C., HAYES, J., MAHAN, J. D., CAMPBELL, K. J., BANWELL, B., DASOUKI, M., et al. (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of Neurology* **67**(6), 771–780.
- MANUVAKHOVA, M., KEELING, K. & BEDWELL, D. M. (2000). Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* **6**(7), 1044–1055.
- MARTORELL, L., CORTINA, V., PARRA, R., BARQUINERO, J. & VIDAL, F. (2020). Variable readthrough responsiveness of nonsense mutations in hemophilia a. *Haematologica* **105**(2), 508–518.
- MATZ, G. J. (1993). Aminoglycoside cochlear ototoxicity. *Otolaryngologic Clinics of North America* **26**(5), 705–712.
- MCCAUGHAN, K. K., BROWN, C. M., DALPHIN, M. E., BERRY, M. J. & TATE, W. P. (1995). Translational termination efficiency in mammals is influenced by the base following the stop codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(12), 5431–5435.
- MERRICK, W. C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological Reviews* **56**(2), 291–315.
- MEYER, K. D., SALETORRE, Y., ZUMBO, P., ELEMENTO, O., MASON, C. E. & JAFFREY, S. R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' utrs and near stop codons. *Cell* **149**(7), 1635–1646.
- MIKHAILOVA, T., SHUVALOVA, E., IVANOV, A., SUSOROV, D., SHUVALOV, A., KOLOSOVA, P. M. & ALKALAEVA, E. (2017). RNA helicase DDX19 stabilizes ribosomal elongation and termination complexes. *Nucleic Acids Research* **45**(3), 1307–1318.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P. & TULKENS, P. M. (1999). Aminoglycosides: nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**(5), 1003–1012.
- MOOSAJEE, M., TRACEY-WHITE, D., SMART, M., WEETALL, M., TORRIANO, S., KALATZIS, V., DA CRUZ, L., COFFEY, P., WEBSTER, A. R. & WELCH, E. (2016). Functional rescue of REP1 following treatment with PTC124 and novel derivative PTC-414 in human choroideremia fibroblasts and the nonsense-mediated zebrafish model. *Human Molecular Genetics* **25**(16), 3416–3431.
- MORAIS, P., ADACHI, H. & YU, Y. T. (2020). Suppression of nonsense mutations by new emerging technologies. *International Journal of Molecular Sciences* **21**(12), 4394.
- MORI, N., FUNATSU, Y., HIRUTA, K. & GOTO, S. (1985). Analysis of translational fidelity of ribosomes with protamine messenger RNA as a template. *Biochemistry* **24**(5), 1231–1239.
- MORT, M., IVANOV, D., COOPER, D. N. & CHUZHANOVA, N. A. (2008). A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Human Mutation* **29**(8), 1037–1047.
- MURAMATSU, T., HECKMANN, K., KITANAKA, C. & KUGHINO, Y. (2001). Molecular mechanism of stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodons. *FEBS Letters* **488**(3), 105–109.
- MUTYAM, V., DU, M., XUE, X., KEELING, K. M., WHITE, E. L., BOSTWICK, J. R., RASMUSSEN, L., LIU, B., MAZUR, M., HONG, J. S., FALK LIBBY, E., LIANG, F., SHANG, H., MENSE, M., SUTO, M. J., et al. (2016). Discovery of clinically approved agents that promote suppression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator nonsense mutations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **194**(9), 1092–1103.
- NAMGOONG, J. H. & BERTONI, C. (2016). Clinical potential of ataluren in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Degenerative Neurological and Neuromuscular Disease* **13**(6), 37–48.
- NAMY, O., HATIN, I. & ROUSSET, J. P. (2001). Impact of the six nucleotides downstream of the stop codon on translation termination. *EMBO Reports* **2**(9), 787–793.
- NEU-YILIK, G., RAIMONDEAU, E., ELISEEV, B., YERAMALA, L., AMTHOR, B., DENIAUD, A., HUARD, K., KERSCHGENS, K., HENTZE, M. W., SCHAFFITZEL, C. & KULOZIK, A. E. (2017). Dual function of UPF3B in early and late translation termination. *EMBO Journal* **36**(20), 2968–2986.
- NUDELMAN, I., REBIBO-SABBAH, A., SHALLOM-SHEZIFI, D., HAINRICHSON, M., STAHL, I., BEN-YOSEF, T. & BAASOV, T. (2006). Redesign of aminoglycosides for treatment of human genetic diseases caused by premature stop mutations. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **16**(24), 6310–6315.
- NUDELMAN, I., REBIBO-SABBAH, A., CHERNIAVSKY, M., BELAKHOV, V., HAINRICHSON, M., CHEN, F., SCHAGHT, J., PILCH, D. S., BEN-YOSEF, T. & BAASOV, T. (2009). Development of novel aminoglycoside (NB54) with reduced toxicity and enhanced suppression of disease-causing premature stop mutations. *Journal of Medicinal Chemistry* **52**(9), 2836–2845.
- OGLE, J. M., CARTER, A. P. & RAMAKRISHNAN, V. (2003). Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures. *Trends in Biochemical Sciences* **28**(5), 259–266.

- PHILLIPS-JONES, M. K., WATSON, F. J. & MARTIN, R. (1993). The 3' codon context effect on UAG suppressor tRNA is different in *Escherichia coli* and human cells. *Journal of Molecular Biology* **233**(1), 1–6.
- PIBIRI, I., LENTINI, L., MELFI, R., TUTONE, M., BALDASSANO, S., RICCO GALLUZZO, P., DI LEONARDO, A. & PACE, A. (2018). Rescuing the CFTR protein function: introducing 1,3,4-oxadiazoles as translational readthrough inducing drugs. *European Journal of Medicinal Chemistry* **159**, 126–142.
- PROKHOROVA, I., ALTMAN, R. B., DJUMAGULOV, M., SHRESTHA, J. P., URZHUMTSEV, A., FERGUSON, A., CHANG, C. T., YUSUPOV, M., BLANCHARD, S. C. & YUSUPOVA, G. (2017). Aminoglycoside interactions and impacts on the eukaryotic ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**(51), E10899–E10908.
- RABEA, S. M., BARADARAN-HERAVI, A., BALGI, A. D., KRAUSE, A., HOSSEINI FARAHABADI, S., ROBERGE, M. & GRIERSON, D. S. (2019). 2-aminothiazole-4-carboxamides enhance readthrough of premature termination codons by aminoglycosides. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **10**(5), 726–731.
- RAJON, E. & MASEL, J. (2011). Evolution of molecular error rates and the consequences for evolvability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(3), 1082–1087.
- REN, G., ZHAO, Y. P., YANG, L. & FU, C. X. (2008). Anti-proliferative effect of cliticine from the mushroom *Leucopaxillus giganteus* on human cervical cancer HeLa cells by inducing apoptosis. *Cancer Letters* **262**(2), 190–200.
- ROY, B., LESZYK, J. D., MANGUS, D. A. & JACOBSON, A. (2015). Nonsense suppression by near-cognate tRNAs employs alternative base pairing at codon positions 1 and 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**(10), 3038–3043.
- ROY, B., FRIESEN, W. J., TOMIZAWA, Y., LESZYK, J. D., ZHUO, J., JOHNSON, B., DAKKA, J., TROTTE, C. R., XUE, X., MUTYAM, V., KEELING, K. M., MOBLEY, J. A., ROWE, S. M., BEDWELL, D. M., WELCH, E. M. & JACOBSON, A. (2016). Ataluren stimulates ribosomal selection of near-cognate tRNAs to promote nonsense suppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**(44), 12508–12513.
- SALAS-MARCO, J. & BEDWELL, D. M. (2005). Discrimination between defects in elongation fidelity and termination efficiency provides mechanistic insights into translational readthrough. *Journal of Molecular Biology* **348**(4), 801–815.
- SCHUEREN, F., LINGNER, T., GEORGE, R., HOFHUIS, J., DICKEL, C., GARTNER, J. & THOMS, S. (2014). Peroxisomal lactate dehydrogenase is generated by translational readthrough in mammals. *Life* **3**, e03640.
- SERMET-GAUDELUS, I., RENOUIL, M., FAJAC, A., BIDOU, L., PARBAILLE, B., PIERROT, S., DAVY, N., BISMUTH, E., REINERT, P., LENOIR, G., LESURE, J. F., ROUSSET, J. P. & EDELMAN, A. (2007). In vitro prediction of stop-codon suppression by intravenous gentamicin in patients with cystic fibrosis: a pilot study. *BMC Medicine* **5**, 5.
- SERMET-GAUDELUS, I., BOECK, K. D., CASIMIR, G. J., VERMEULEN, F., LEAL, T., MOGENET, A., ROUSSEL, D., FRITSCH, J., HANSENS, L., HIRAWAT, S., MILLER, N. L., CONSTANTINE, S., REHA, A., AJAYI, T., ELFRING, G. L. & MILLER, L. L. (2010). Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **182**(10), 1262–1272.
- SHARMA, J., KEELING, K. M. & ROWE, S. M. (2020). Pharmacological approaches for targeting cystic fibrosis nonsense mutations. *European Journal of Medicinal Chemistry* **200**, 112436.
- SHULMAN, E., BELAKHOV, V., WEI, G., KENDALL, A., MEYRON-HOLTZ, E. G., BENSCHACHAR, D., SCHACHT, J. & BAASOV, T. (2014). Designer aminoglycosides that selectively inhibit cytoplasmic rather than mitochondrial ribosomes show decreased ototoxicity: a strategy for the treatment of genetic diseases. *The Journal of Biological Chemistry* **289**(4), 2318–2330.
- SINGH, A., URSIC, D. & DAVIES, J. (1979). Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **277**(5692), 146–148.
- SINGH, A., MANJUNATH, L. E., KUNDU, P., SAHOO, S., DAS, A., SUMA, H. R., FOX, P. L. & ESWARAPPA, S. M. (2019). Let-7a-regulated translational readthrough of mammalian AGO1 generates a microRNA pathway inhibitor. *EMBO Journal* **38**(16), e100727.
- SKUZESKI, J. M., NICHOLS, L. M., GESTELAND, R. F. & ATKINS, J. F. (1991). The signal for a leaky UAG stop codon in several plant viruses includes the two downstream codons. *Journal of Molecular Biology* **218**(2), 365–373.
- SOGAARD, T. M., JAKOBSEN, C. G. & JUSTESEN, J. (1999). A sensitive assay of translational fidelity (readthrough and termination) in eukaryotic cells. *Biochemistry (Moscow)* **64**(12), 1408–1417.
- SONG, H., MUGNIER, P., DAS, A. K., WEBB, H. M., EVANS, D. R., TUTTE, M. F., HEMMINGS, B. A. & BARFORD, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1—mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* **100**(3), 311–321.
- SUN, J., YEUNG, C. A., CO, N. N., TSANG, T. Y., YAU, E., LUO, K., WU, P., WA, J. C., FUNG, K. P., KWOK, T. T. & LIU, F. (2012). Cliticine reversal of P-glycoprotein associated multi-drug resistance through down-regulation of transcription factor NF-kappaB in R-HEPG2 cell line. *PLoS One* **7**(8), e40720.
- SWAN, S. K. (1997). Aminoglycoside nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology* **17**(1), 27–33.
- TAGUCHI, A., HAMADA, K., KOTAKE, M., SHIOZUKA, M., NAKAMINAMI, H., PILLAIYAR, T., TAKAYAMA, K., YAKUSHIJI, F., NOGUCHI, N., USUI, T., MATSUDA, R. & HAYASHI, Y. (2014). Discovery of natural products possessing selective eukaryotic readthrough activity: 3-epi-deoxyneogamycin and its leucine adduct. *ChemMedChem* **9**(10), 2233–2237.
- TATE, W. P. & MANNERING, S. A. (1996). Three, four or more: the translational stop signal at length. *Molecular Microbiology* **21**(2), 213–219.
- TEMPLE, G. F., DOZY, A. M., ROY, K. L. & KAN, Y. W. (1982). Construction of a functional human suppressor tRNA gene: an approach to gene therapy for beta-thalassaemia. *Nature* **296**(5857), 537–540.
- TRZASKA, C., AMAND, S., BAILLY, C., LEROY, C., MARCHAND, V., DUVERNOIS-BERTHET, E., SALIOU, J. M., BENHABILES, H., WERKMEISTER, E., CHASSAT, T., GUILBERT, R., HANNEBIQUE, D., MOURAY, A., COPIN, M. C., MOREAU, P. A., ADRIAENSSENS, E., KULOZIK, A., WESTHOF, E., TULASNE, D., MOTORIN, Y., REBUFFAT, S. & LEJEUNE, F. (2020). 2,6-diaminopurine as a highly potent corrector of UGA nonsense mutations. *Nature Communications* **11**(1), 1509.
- TUTONE, M., PIBIRI, I., LENTINI, L., PACE, A. & ALMERICO, A. M. (2019). Deciphering the nonsense readthrough mechanism of action of ataluren: an in silico compared study. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **10**(4), 522–527.
- TUTONE, M., PIBIRI, I., PERRIERA, R., CAMPOFELICE, A., CULLETTA, G., MELFI, R., PACE, A., ALMERICO, A. M. & LENTINI, L. (2020). Pharmacophore-based design of new chemical scaffolds as translational readthrough-inducing drugs (TRIDS). *ACS Medicinal Chemistry Letters* **11**(5), 747–753.
- URAKOV, V. N., VALOUEV, I. A., LEWITIN, E. I., PAUSHKIN, S. V., KOSORUKOV, V. S., KUSHNIROV, V. V., SMIRNOV, V. N. & TER-AVANESYAN, M. D. (2001). It1p, a novel protein inhibiting translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Molecular Biology* **2**, 9.
- WAGNER, K. R., HAMED, S., HADLEY, D. W., GROPMAN, A. L., BURSTEIN, A. H., ESCOLAR, D. M., HOFFMAN, E. P. & FISCHBECK, K. H. (2001). Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Annals of Neurology* **49**(6), 706–711.
- WANG, W., CZAPLINSKI, K., RAO, Y. & PELTZ, S. W. (2001). The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *EMBO Journal* **20**(4), 880–890.
- WANG, D., BELAKHOV, V., KANDASAMY, J., BAASOV, T., LI, S. C., LI, Y. T., BEDWELL, D. M. & KEELING, K. M. (2012). The designer aminoglycoside NB84 significantly reduces glycosaminoglycan accumulation associated with MPS I-H in the Idua-W392X mouse. *Molecular Genetics and Metabolism* **105**(1), 116–125.
- WANGEN, J. R. & GREEN, R. (2020). Stop codon context influences genome-wide stimulation of termination codon readthrough by aminoglycosides. *eLife* **9**, e52611.
- WELCH, E. M., BARTON, E. R., ZHUO, J., TOMIZAWA, Y., FRIESEN, W. J., TRIFILLIS, P., PAUSHKIN, S., PATEL, M., TROTTE, C. R., HWANG, S., WILDE, R. G., KARP, G., TAKASUGI, J., CHEN, G., JONES, S., REN, H., MOON, Y. C., CORSON, D., TURPOFF, A. A., CAMPBELL, J. A., CONN, M. M., KHAN, A., ALMSTEAD, N. G., HEDRICK, J., MOLLIN, A., RISHER, N., WEETALL, M., YEH, S., BRANSTROM, A. A., COLACINO, J. M., BABIAK, J., JU, W. D., HIRAWAT, S., NORTHGUTT, V. J., MILLER, L. L., SPATRICK, P., HE, F., KAWANA, M., FENG, H., JACOBSON, A., PELTZ, S. W. & SWEENEY, H. L. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**(7140), 87–91.
- WILDE, R. G., KENNEDY, P. D., ALMSTEAD, N. G., WELCH, E. M., TAKASUGI, J. J. & FRIESEN, W. J. (2007). Placeholder TextPlaceholder TextPlaceholder TextPlaceholder TextNucleoside compounds and their use for treating cancer and disease associated with somatic mutations. In *USPTO (Ed.)*, vol. 7291603B2 (ed. U. S. Patent). PTC Therapeutics, Inc, USA.
- WILHELM, J. M., JESSOP, J. J. & PETTIT, S. E. (1978). Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: stimulation of errors in the translation of natural messengers in extracts of cultured human cells. *Biochemistry* **17**(7), 1149–1153.
- WILLS, N. M., GESTELAND, R. F. & ATKINS, J. F. (1991). Evidence that a downstream pseudoknot is required for translational read-through of the Moloney murine leukemia virus gag stop codon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**(16), 6991–6995.
- WITTENSTEIN, A., CASPI, M., DAVID, Y., SHORER, Y., NADAR-PONNIAH, P. T. & ROSIN-ARBESELD, R. (2019). Serum starvation enhances nonsense mutation readthrough. *Journal of Molecular Medicine (Berlin)* **97**(12), 1695–1710.
- WU, W. J., SHA, S. H., MCLAREN, J. D., KAWAMOTO, K., RAPHAEL, Y. & SCHACHT, J. (2001). Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat. *Hearing Research* **158**(1–2), 165–178.
- WU, G., HUANG, C. & YU, Y. T. (2015). Pseudouridine in mRNA: incorporation, detection, and recoding. *Methods in Enzymology* **560**, 187–217.
- XUE, X., MUTYAM, V., TANG, L., BISWAS, S., DU, M., JACKSON, L. A., DAI, Y., BELAKHOV, V., SHALEV, M., CHEN, F., SCHACHT, J., R. J. B., BAASOV, T., HONG, J., BEDWELL, D. M., et al. (2014). Synthetic aminoglycosides efficiently suppress cystic fibrosis transmembrane conductance regulator nonsense mutations and are enhanced by ivacaftor. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **50**(4), 805–816.
- XUE, X., MUTYAM, V., THAKERAR, A., MOBLEY, J., BRIDGES, R. J., ROWE, S. M., KEELING, K. M. & BEDWELL, D. M. (2017). Identification of the amino acids

- inserted during suppression of CFTR nonsense mutations and determination of their functional consequences. *Human Molecular Genetics* **26**(16), 3116–3129.
- YAMAGUCHI, Y., HAYASHI, A., CAMPAGNONI, C. W., KIMURA, A., INUZUKA, T. & BABA, H. (2012). L-MPZ, a novel isoform of myelin P0, is produced by stop codon readthrough. *The Journal of Biological Chemistry* **287**(21), 17765–17776.
- YESMIN, F., BHUIYAN, R. H., OHMI, Y., OHKAWA, Y., TAJIMA, O., OKAJIMA, T. & FURUKAWA, K. (2020). Aminoglycosides are efficient reagents to induce readthrough of premature termination codon in mutant B4GALNT1 genes found in families of hereditary spastic paraplegia. *The Journal of Biochemistry* **168**(2), 103–112.
- ZINGMAN, L. V., PARK, S., OLSON, T. M., ALEKSEEV, A. E. & TERZIC, A. (2007). Aminoglycoside-induced translational read-through in disease: overcoming nonsense mutations by pharmacogenetic therapy. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* **81**(1), 99–103.

(Received 12 May 2020; revised 23 September 2020; accepted 26 September 2020)

## Projet de thèse

Le mécanisme de *Nonsense-mediated mRNA decay* (ou NMD) agit comme un système de surveillance et contrôle la présence d'ARNm porteurs d'un codon stop prématuré (PTC) qui provoquerait l'apparition d'une protéine tronquée. Les PTC peuvent être retrouvés dans de nombreuses pathologies telles que des maladies génétiques comme la mucoviscidose ou la dystrophie musculaire de Duchenne, mais aussi les cancers (Frischmeyer, 1999; Miller and Pearce, 2014; Mort et al., 2008).

La dégradation par NMD n'est pas simplement un événement pathologique, mais le NMD est capable de réguler l'expression physiologique de certains gènes, pouvant être définis comme substrats naturels du NMD (Mendell et al., 2004; Neu-Yilik et al., 2004).

Les connaissances sur le fonctionnement du NMD s'élargissent au fil du temps, et aujourd'hui une vingtaine de protéines sont connues pour leur implication dans le NMD. L'activation et la régulation du NMD se fait par des événements de phosphorylation et déphosphorylation d'un des facteurs du NMD, la protéine UPF1. Une autre phosphoprotéine est présente dans la régulation du NMD, la protéine UPF2. La seule kinase identifiée pour l'instant jouant un rôle dans le NMD et ayant comme cible le facteur UPF1 est la protéine SMG1, une sérine/thréonine kinase de la famille des *phosphatidyl-Inositol (PI) 3-kinase-related kinase* (PIKK) (Okada-Katsuhata et al., 2012).

Néanmoins, il est probable que ce ne soit pas la seule kinase impliquée dans le NMD, par exemple pour permettre la phosphorylation de la protéine UPF2 dont la kinase est actuellement inconnue. Le but de mon projet de thèse est d'essayer d'identifier de potentielles protéines kinases intervenant dans le NMD. En effet, une meilleure connaissance et compréhension de l'intervention des protéines impliquées dans le NMD pourraient ouvrir la voie sur de nouvelles stratégies thérapeutiques où le NMD joue un rôle essentiel.

## Résultats

## **Article: A role for AKT1 in nonsense-mediated mRNA decay**

Afin d'identifier une nouvelle protéine capable de phosphoryler les facteurs du NMD, un criblage a été mis en place par notre équipe. Le criblage d'une banque de molécules inhibitrices de kinases, a permis de découvrir différents inhibiteurs du NMD, dont trois d'entre eux sont dirigés contre la même kinase, la protéine AKT1. La kinase AKT1 fait partie de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et ainsi, un lien est possible entre la voie de signalisation et le mécanisme de dégradation des ARNm, le NMD.

L'article présente les étapes et les stratégies que nous avons adoptées afin de valider les résultats obtenus lors du criblage. Nous nous sommes posés différentes questions, telles que l'impact de la kinase AKT1 dans le mécanisme du NMD, ou bien les interactions protéiques qui s'installent lors de l'activation du NMD, ou bien le mode d'action de la protéine AKT1 dans le NMD.

Pour cela, un nombre varié d'approches a été effectué, tel que l'évaluation de l'efficacité du NMD dans des cellules n'exprimant plus de protéine AKT1, l'identification des interactions protéiques avec des techniques comme l'immunoprécipitation ou la *Proximity Ligation Assay* (PLA) et la comparaison avec la protéine kinase SMG1.

La protéine AKT1 est souvent retrouvée mutée dans les cancers et pour cela nous avons voulu regarder l'impact d'une mutation sur l'activation du NMD.

Cette étude permettrait tout d'abord de découvrir une seconde kinase impliquée dans le mécanisme du NMD, mais aussi de comprendre le lien qui relie le NMD avec la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR. Une meilleure compréhension pourrait ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques avec par exemple des traitements combinés et ciblés selon les mutations des patients.

**Article accepté dans *Nucleic Acids Research* le 16 septembre 2021**



## A role for AKT1 in nonsense-mediated mRNA decay

Martine Palma<sup>1,2</sup>, Catherine Leroy<sup>1,2</sup>, Sophie Salomé-Desnoullez<sup>3</sup>, Elisabeth Werkmeister<sup>3,4</sup>, Rebekah Kong<sup>1,2</sup>, Marc Mongy<sup>3</sup>, Hervé Le Hir<sup>5</sup> and Fabrice Lejeune<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, UMR9020-U1277 - CANTHER - Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Unité tumorigenèse et résistance aux traitements, Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US 41 - UMS 2014 - PLBS, F-59000 Lille, France

<sup>4</sup> Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 – UMR9017 – CIIL – center for Infection and Immunity of Lille, F- 59 000 Lille, France

<sup>5</sup> Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), Ecole Normale Supérieure, CNRS, INSERM, PSL Research University, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France.

\* To whom correspondence should be addressed. Tel: 33 320871059; Fax: 33 320871111; Email: [fabrice.lejeune@inserm.fr](mailto:fabrice.lejeune@inserm.fr)

## Abstract

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is a highly regulated quality control mechanism through which mRNAs harboring a premature termination codon are degraded. It is also a regulatory pathway for some genes. This mechanism is subject to various levels of regulation, including phosphorylation. To date only one kinase, SMG1, has been described to participate in NMD, by targeting the central NMD factor UPF1. Here, screening of a kinase inhibitor library revealed as putative NMD inhibitors several molecules targeting the protein kinase AKT1. We present evidence demonstrating that AKT1, a central player in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, plays an essential role in NMD, being recruited by the UPF3X protein to phosphorylate UPF1. As AKT1 is often overactivated in cancer cells and as this should result in increased NMD efficiency, the possibility that this increase might affect cancer processes and be targeted in cancer therapy is discussed.

## Introduction

Quality controls occur at different steps in gene expression. One such control is nonsense-mediated mRNA decay (NMD), which prevents the synthesis of potentially deleterious truncated proteins by targeting mRNAs carrying a premature termination codon (PTC) (1-4). NMD involves more than a dozen factors, including the central factors UPF1, UPF2, and UPF3X (also named UPF3B). UPF1 and UPF2 are phosphoproteins (5,6). Phosphorylation of both proteins is required for NMD activation, and this suggests that kinases involved in their phosphorylation may regulate NMD. Although the role of UPF2 phosphorylation needs to be investigated, UPF1 phosphorylation has been abundantly studied (7-12). For instance, UPF1 phosphorylation at the Threonine 28 promotes the recruitment of SMG6, while phosphorylation of the Serine 1096 induces the recruitment of SMG5/SMG7 to NMD mRNP targets, causing departure of the ribosome paused on the PTC and activation of mRNA decay pathways (6,13,14). In addition, phospho-UPF1 impairs the function of eIF3, required to initiate new rounds of translation on the PTC-containing mRNAs (15). To date, the only kinase shown to be involved in NMD by directly targeting an NMD factor is SMG1, a phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase shown to phosphorylate UPF1 (16-18). As UPF2 is also a phosphoprotein (5,19) and as no UPF2-phosphorylating kinase has been identified *in vivo*, it is strongly expected that additional kinases are involved in NMD.

AKT (also called protein kinase B) is a serine/threonine kinase involved in various cellular processes such as cell cycle progression, glucose metabolism, cell proliferation, translation, and transcription. Accordingly, this protein localizes to the cytoplasm and nucleus (20,21). The role of AKT in cancer is very complex. The *AKT* gene is viewed as an oncogene, as it is often overexpressed in cancer. AKT, furthermore, promotes cell proliferation and also plays an anti-apoptotic role by inhibiting pro-apoptotic proteins (22). AKT exists in three different isoforms, named AKT1, AKT2, and AKT3. These isoforms are differentially expressed according to the tissue and developmental stage (23,24). Whether they are functionally redundant and can replace each other is unclear.

Here we present evidence that AKT1 is involved in NMD by specifically phosphorylating UPF1 but not UPF2. We further show that AKT1 is recruited to mRNPs by UPF3X before interacting with UPF1. The involvement of AKT1 in NMD appears as essential as that of the SMG1 protein, since the absence of either protein causes inhibition of NMD and since no cumulative effect is observed in the absence of both proteins. Given the role of AKT1 in tumorigenesis, this discovery may foreshadow a role of NMD in the cancer process.

## Materials and Methods

### *Screening assay*

The screening method used has been described previously (25). The kinase inhibitor library is described in (26). Molecules were tested at 10  $\mu$ M in DMSO.

### *Cell culture*

HeLa cells were grown in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% Zell Shield (Minerva Biolabs, Berlin, Germany) at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells were grown at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM supplemented with 10% non-heat inactivated FBS, 1% Zell Shield.

To obtain the HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells with the CRISPR/Cas9 system, we used the pLentiV2-CRISPR plasmid (a gift from Feng Zhang, Addgene plasmid # 52961; <http://n2t.net/addgene:52961>; RRID:Addgene\_52961) (27) with gRNA complementing a sequence in the *AKT1* gene (5'-CACCGCCCGCGCACGCTTGGTCCCG-3'). Cells were selected with 3  $\mu$ g/ml puromycin (InvivoGen).

### *Cell proliferation Assay*

HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells ( $3 \times 10^3$  per well) were seeded in duplicate into 96-well plates and grown in 150  $\mu$ l supplemented DMEM. Every two days, the medium was changed.

The IncuCyte® live-cell imaging and analysis system was used and cell proliferation was monitored by analyzing the occupied area (% confluence) on cell images over 130 hours of culture.

The images obtained were taken with a 4x objective lens every two hours.

### *Chemicals*

The AKT1 inhibitor was purchased from CliniSciences (ApexBio A-674563). The molecule was dissolved in DMSO and used at 800 nM.

#### *Plasmids, siRNA, and transfection*

Plasmid pcDNA3 flag HA AKT1 was a gift from William Sellers (Addgene plasmid # 9021; <http://n2t.net/addgene:9021>; RRID: Addgene\_9021) (28). The pcDNA3-HA-AKT1-K179M expression vector expressing an inactive mutant form of AKT1 (altered kinase domain) was a gift from Jie Chen (Addgene plasmid # 73409; <http://n2t.net/addgene:73409>; RRID: Addgene\_73409) (29). Plasmid mCherry-AKT1 E17K, causing constitutive activation of AKT1, was a generous gift from Dr Anne-Laure Todeschini. Cells were transfected with Jet Optimus Reagent (Polyplus Transfection Ref: 117-01).

With the AKT1 inhibitor, Lipofectamine 3000 (Life Technologies) was used according to the supplier's recommendations. ICAfectin™ 442 reagent (In Cell Art, Nantes, France) was used to transfect HEK293FT WT and  $\Delta$ AKT1 cells with a control siRNA (Eurogentec), siRNA UPF1 (5'-AAGATGCAGTTCCGCTCCATTTT-3'), siRNA UPF2 (5'-GAAGTTGGTACGGGCACTC-3'), siRNA UPF3X (5'-GGAGAAGCGAGTAACCCTG-3') (Sigma Aldrich), siRNA AKT1 (5'-GAAGGAAGUCAUCGUGGCCAA-3'), siRNA AKT2 (5'-CUCUUCGAGCUCAUCCUCA-3'), siRNA AKT3 (5'-GAAAGAUUGUGUACCGUGA-3'), siRNA SMG1 (5'-CCAGGACACGAGGAAACUG-3'), and pmCMV-GI Norm or pmCMV-GI Ter and pIE-MUP].

#### *Protein extraction and western blotting*

Proteins were extracted in the following lysis buffer: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM EDTA pH 8, 5% SDS. After 30 pulses of sonication (Branson Digital Sonifier/amplitude 20%), proteins were analyzed by western blotting. Migration of all proteins was carried out in a 6%, 10%, or 12% SDS-PAGE gel. After migration, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and incubated with primary antibodies overnight at 4°C before incubation with a secondary antibody (Jackson ImmunoResearch,

Baltimore-Pike, PA, USA) 111-035-003 (rabbit) or 115-035-003 (mouse)) for 1 h at room temperature. The proteins were observed with SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce-Biotechnology, Rockford, IL, USA). The primary antibodies used were: rabbit anti- AKT1 antibody at 1:1000 (Cell Signaling #2938), rabbit anti-Akt2 antibody (5B5) at 1:500 (Cell Signaling #2964), rabbit anti-Akt3 antibody (62A8) at 1:500 (Cell Signaling #3788), rabbit anti-UPF1 antibody at 1:5000 (Abcam ab86057), rabbit anti-UPF2 antibody at 1:1000 (Eurogentec), rabbit anti-UPF3X antibody at 1:2000 (Abcam ab134566), rabbit anti-importin 9 at 1:1000 (Abcam ab52605), mouse anti- eIF4E antibody at 1:500 (Santa Cruz Biotechnology sc-9976), rabbit anti-Phospho AKT1 antibody at 1:1000 (Abcam ab133458), rabbit anti-Phospho AKT antibody at 1:2000 (Cell Signaling #4060), rabbit anti-MDM2 antibody at 1:1000 (Abcam ab16895), rabbit anti-CBP80 antibody (H-300) at 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology sc-48803), rabbit anti-phospho Ser/Thr ATM/ATR Substrate antibody at 1:1000 (Cell Signaling #2851), rabbit anti-phospho UPF1/Rent1 Thr28 antibody (Biorbyt orb7836), rabbit anti-SMG1 antibody at 1:500 (Abcam ab30916).

#### *RT-PCR*

RT-PCR was performed as described (25). The primer sequences used in this study were for: MUP (sense 5'-CTGATGGGGCTCTATG-3'; antisense 5'-TCCTGGTGAGAAGTCTCC-3') or Globin (sense 5'-GGACGAGCTGTACAAGTATC-3'; antisense 5'-GGGTTTAGTGGTACTTGTGAGC-3').

#### *In vitro phosphorylation assay*

The in vitro phosphorylation assay was carried out with the ADP-Glo™ Kinase Assay kit (Promega; V6930) and the AKT1 Kinase Enzyme System Kit (V1911). The purified proteins UPF1, and UPF2 (761-1227) which includes the three phosphorylation sites (S886, S992 and S1046) identified by mass spectrometry (19) were obtained from Dr Hervé Le Hir. The UPF3X protein was purchased from

CliniSciences (*Recombinant Human Regulator of Nonsense Transcripts 3B* - E. Coli; CSB-EP883646HU). Kinase reactions were carried out at room temperature for 1 h with 50 ng enzyme, 1 µg substrate, purified protein, 250 µM ATP, 50 µM DTT, Reaction Buffer 1x. The ATP depletion reaction was carried out at room temperature for 40 min and the luminescence reaction was carried out for 30 min in a Tristar luminometer (Berthold).

### *Immunoprecipitations*

For immunoprecipitation of UPF1 without stimulation of NMD and for immunoprecipitation of UPF3X, HEK293FT cells were lysed in lysis buffer containing: 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.05% NP40, and Halt™ protease, phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Scientific). After 30 pulses of sonication (Branson Digital Sonifier/amplitude 20%), the cell extracts were incubated with rabbit anti-UPF1 antibody (Abcam ab86057) or rabbit anti-UPF3X antibody (Abcam ab134566). After 2 h at 4°C, protein A agarose beads were added to the cell extracts and incubated for 1 h at 4°C. The beads were then washed five times with lysis buffer before eluting proteins from beads with 2× sample loading buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 12% β-mercaptoethanol, 20% glycerol, bromophenol blue).

For immunoprecipitation of UPF1 with stimulation of NMD, calcium chloride was used to transfect HEK293FT cells with Globin Ter plasmid. After transfection, the preparation of cell extracts was similar to the protocol described above.

For immunoprecipitation of AKT1, another lysis buffer was used: 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton x100. The washing buffer used was composed of 20 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 0.1% Triton x100. The same protocol steps were followed.

For immunoprecipitation of AKT1 with downregulation of *UPF1* or *UPF3X* expression, ICAfectin™ 442 reagent was used to transfect HEK293FT cells with siRNA. The nuclear and cytoplasmic fractions were obtained with the NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic extraction kit (Thermo Scientific 78835) according



to the manufacturer's recommendations. The lysis and washing buffers used were the same as for immunoprecipitation of AKT1.

For immunoprecipitations in the presence or absence of RNase A, cell extracts were incubated for 30 minutes at 37 ° C. with 10 µg BSA or RNase A before incubation with the antibodies.

#### *Proximity ligation assay*

The proximity ligation assay was performed with the kit from Sigma - *Duolink™ In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit* (Ref: DUO92102) with  $\lambda_{ex}$  554 nm;  $\lambda_{em}$  576 nm (Cyanine 3; Zeiss Filter set 20) according to the manufacturer's recommendations. The Nunc™ Lab-Tek II Chamber Slide (Thermo Scientific Nunc, Ref: 154534) was used for the proximity ligation assay. The primary antibodies used were: rabbit anti-UPF1 antibody at 1:250 (Abcam ab86057), rabbit anti-UPF2 antibody at 1:250 (Eurogentec), rabbit anti-UPF3X antibody at 1:250 (Abcam ab134566), mouse anti-AKT1 antibody at 1:50 (Santa Cruz sc-271149), mouse anti-eIF4E antibody at 1:250 (Santa Cruz sc-9976), rabbit anti-MDM2 antibody at 1:250 (Cell Signaling #86934).

#### *Image analysis and quantification*

Live imaging was performed with the Spinning Disk- Live SR microscope (Ti2 Nikon - Spinning Disk Yokogawa CSUW1 - Gataca) with Metamorph software. Images were taken at different wavelengths (excitation: 405, 561, and 488 nm; emission filters 450/50, 525/50 and 595/50). The SR module was used to improve the resolution. Observations were done with a 60x oil immersion objective (Nikon Plan Apo 60x NA 1.4). Images were processed with the Huygens Professional Software. After the deconvolution, the images were first analyzed with the ImageJ software (NIH) and then with Imaris (Bitplane version 9.5.0) in order to count the number of spots in each image (spot detection module).

## Results

### *Screening of a kinase inhibitor library reveals AKT1 as a putative NMD factor*

To identify new kinases involved in NMD, a kinase inhibitor library was screened. For this we used a construct carrying the open reading frame encoding the firefly luciferase followed, in the 3'UTR, by MS2 binding sequences (Figure 1A) (25). This construct was co-expressed with a cDNA encoding an MS2/UPF1 fusion protein. The goal was to identify kinases targeting the known phosphoprotein UPF1 (8,30). The screened library, named PKIS, consisted of 367 kinase inhibitors from the company GlaxoSmithKline (26). The screen revealed three kinase inhibitors promoting a very high level of luciferase activity, suggesting that they could strongly inhibit NMD (Figure 1B). Interestingly, all three selected compounds (GSK619487A, GSK614526A, and GSK949675A) were designed to target the same kinase: the AKT1 protein (Figure 1C). This result strongly suggests that AKT1 plays a role in NMD. It should be noted that this library does not contain molecules designed to inhibit the SMG1 protein.

### *NMD is inhibited in cells lacking AKT1 activity*

To validate the screening results, CRISPR-Cas9 technology was used in HEK293FT cells to impair *AKT1* expression. Several clones were isolated and clone 9.47 was selected for further use on the basis of a western blot analysis demonstrating its low residual level of AKT1 protein (Figure 2A). In what follows, cells of this clone are called HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells. To exclude the possibility of causing synthesis of a truncated AKT1 protein through use of CRISPR/Cas9 technology, we carried out a western blot analysis allowing the detection of a small protein migrating faster than AKT1. This analysis did not show any evidence of the presence of a truncated protein (Figure 2A right panel). The HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells were found to proliferate more slowly than wild-type HEK293FT cells because of the loss of AKT1 function (Figure 2B). The time required to reach the confluence plateau was about 120 hours for HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells versus 80 hours for wild-type cells.

To assess whether AKT1 is required for NMD, wild-type and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells were transfected with a plasmid expressing wild-type globin mRNA (called Globin Norm), a PTC-carrying globin mRNA (called Globin Ter), or MUP mRNA as a control (Figure 2C). The absence of AKT1 appeared to promote inhibition of NMD, since the level of Globin Ter mRNA was significantly (about 1.6-fold) higher in HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells than in wild-type HEK293FT cells. Interestingly, this NMD inhibition was also observed when A-674563, a chemical inhibitor of AKT1 (31), was added at 800 nM for 10 hours to the culture medium of wild-type or HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells (Supplemental Figure 1). Strong inhibition of AKT1 phosphorylation by this treatment was demonstrated by western blotting (Supplemental Figure 1A).

To rule out the possibility that the inhibition of NMD shown in Figure 2C might have been a nonspecific consequence of impairing the *AKT1* gene with CRISPR/Cas9, the wild-type AKT1 protein was reintroduced into HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells by transient transfection with an expression vector encoding WT AKT1 with a Flag tag at the N-terminal end. The level of AKT1 protein was monitored by western blotting and the amount of transfecting vector was adjusted, on the basis of western blot data, so as to have similar levels of AKT1 under the different test conditions (Figure 2D). The level of NMD inhibition was then measured by RT-PCR (Figure 2D). In both wild-type and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells, the additional amount of AKT1 generated from the transfecting plasmid resulted in a significant increase in NMD efficiency. In HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells, the AKT1 synthesized from the plasmid restored the NMD efficiency found in wild-type cells. This result confirms that the loss of AKT1 is responsible for the inhibition of NMD observed in HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells. To exclude the possibility that the inhibition of NMD observed in the absence of AKT1 might be due to a general inhibition of translation, we measured the activity of the firefly luciferase from the same number of HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells transfected with a construct encoding firefly luciferase that resulted in the absence of a significant decrease of the translation rate in the absence of AKT1 under our experimental conditions (Supplemental Figure 2). To determine whether NMD inhibition might be due to loss of the AKT1 kinase activity, cells were transfected with a plasmid encoding a Flag-tagged mutated version of AKT1 in which

the kinase domain is inactivated because of the K179M mutation (29). With this mutated version of AKT1, the NMD efficiency was not restored to the wild-type level and remained similar to that observed under control conditions. This indicates that the kinase activity of AKT1 is necessary to rescue NMD efficiency in HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells (Figure 2D).

Overall, these results demonstrate that AKT1, via its kinase activity, is involved in NMD. Since there are three AKT isoforms whose functions might partially overlap, the effects of the other two AKT isoforms were tested in the NMD reaction. For this, *AKT2* or *AKT3* expression was impaired with siRNA and the levels of Globin Norm and Globin Ter mRNAs were measured in transfected cells (Supplemental Figure 3). Downregulation of *AKT2* or *AKT3* expression did not promote inhibition of NMD. This indicates that AKT1 alone is involved in NMD.

#### *AKT1 interacts with UPF proteins*

The involvement of the kinase activity of AKT1 in NMD suggests that AKT1 may phosphorylate certain NMD factors and thus interact with proteins of the NMD mechanism. To test this hypothesis, endogenous AKT1 was immunoprecipitated from HEK293FT cells and the immunoprecipitate was analyzed for the presence of interacting proteins (Figure 3A). As previously reported, the E3 ubiquitin-protein ligase mouse double minute 2 (MDM2) was found in the AKT1 immunoprecipitate. This validates the immunoprecipitation conditions (32). Besides MDM2, the proteins UPF1, UPF3X, and the cap binding protein present during the pioneer round of translation CBP80, but not UPF2 or the cap binding protein present during the steady-state translation eIF4E, were detected in the immunoprecipitate. This suggests that AKT1 interacts with the NMD factors UPF1 and UPF3X. The presence of CBP80 but not eIF4E in the immunoprecipitate suggests that AKT1 interacts with NMD factors before or during the pioneer round of translation (33).

To confirm the putative interaction of AKT1 with NMD factors, immunoprecipitation of endogenous UPF1 was performed and the immunoprecipitate analyzed for the presence of interacting proteins

(Figure 3B). While UPF2 and UPF3X, but not eIF4E, were detected in the UPF1 immunoprecipitate as previously reported (33,34), no AKT1 protein was detected under these conditions. To explain this discrepancy with respect to the results of Figure 3A, one might propose that the fraction of UPF1 protein interacting with AKT1 is low, so that the amount of AKT1 in the UPF1 immunoprecipitate is not detectable under these conditions. One way to increase the amount of AKT1 in the UPF1 immunoprecipitate is to increase the number of NMD events. For this, HEK293FT cells were transfected prior to UPF1 immunoprecipitation with the expression vector encoding Globin Ter mRNA (Figure 3C). Under these conditions, AKT1 was detected in the UPF1 immunoprecipitate, along with UPF2 and UPF3X but not eIF4E, as expected. Interestingly, when endogenous UPF3X immunoprecipitation was performed, UPF1, UPF2, and also AKT1 were immunoprecipitated with UPF3X, without the need to increase the number of NMD events. These results suggest that the interaction between AKT1 and UPF3X is more frequent than the interaction between AKT1 and UPF1 (Figure 3D). It should be noted that the interaction between AKT1 and UPF1 or UPF3X is dependent on the presence of RNA since RNase treatment prior to immunoprecipitation of endogenous AKT1, UPF1, or UPF3X partially prevented detection of interactions among these three proteins (Figures 3A, C, and D). The efficiency of the RNase treatment was assessed by detecting the presence of RNA in the immunoprecipitate by RT-PCR (right panel of Figures 3C and D). Overall, these results suggest that these interactions take place on RNA and rarely or never, outside of mRNPs. As expected, interactions between UPF proteins were not affected by the absence of RNA, unlike interactions between CBP80 and UPF proteins (34,35). To further assess interactions between AKT1 and NMD factors under more physiological conditions, a proximity ligation assay (PLA) was performed (Figure 4) (36). The principle of this approach is that when the two studied proteins localize to within 40 nm of each other, a fluorescence signal is detected. This approach was validated by assessing the interaction between AKT1 and MDM2. As expected, several contact points per cell were detected. Contact points were also detected between AKT1 and UPF1 and between AKT1 and UPF3X, but not between AKT1 and UPF2 or AKT1 and eIF4E. These results are in total agreement with those presented in Figure 3. Interestingly, the contact points between AKT1 and

UPF1 were observed mainly in the cytoplasm, like those between AKT1 and UPF3X. Between the latter two proteins, however, a significant proportion of the interactions was also found in the nucleus, suggesting that the interaction between AKT1 and UPF3X may happen earlier than the interaction between AKT1 and UPF1 (Figure 4). In agreement with the conclusions drawn from Figure 3, the average number of interactions observed between AKT1 and UPF3X was greater than the average number observed between AKT1 and UPF1.

To understand the kinetics of interactions between AKT1 and UPF proteins, PLA was performed on cells where the level of UPF1 or UPF3X was reduced with an appropriate siRNA (Supplemental Figure 4). When UPF1 was downregulated, its interaction with AKT1 was lost, in contrast to the interaction between AKT1 and UPF3X. This indicates that UPF1 is not required for the interaction between AKT1 and UPF3X (Figure 5). When UPF3X was absent, on the other hand, the interaction between AKT1 and UPF3X was lost, naturally, but so was the interaction between AKT1 and UPF1. This suggests that UPF3X is required for the AKT1-UPF1 interaction. In addition, these results strengthen the idea that the interaction between AKT1 and UPF3X occurs before the interaction between AKT1 and UPF1 and that UPF3X is required for the interaction between AKT1 and UPF1. Consistently with the results of Figure 3 and with early recruitment of AKT1 by UPF3X, no interaction was detected by PLA between AKT1 and UPF2, and down-regulating UPF2 with siRNA did not affect the interaction between UPF3X and AKT1 (Supplemental Figure 5).

To confirm the results of PLA, AKT1 immunoprecipitations were performed on nuclear and cytoplasmic fractions from WT cells where UPF1 or UPF3X was downregulated with an siRNA and Globin Ter was introduced by transient transfection (Figure 6). Consistently with our PLA data (Figures 4 and 5) and although AKT1 is reported to be present in the nuclei of 293 cells (37), no AKT1 was detected in immunoprecipitates from nuclear fractions under any conditions tested (Figure 6A). Analysis of immunoprecipitates from the cytoplasmic fraction, however, revealed persistence of the interaction between AKT1 and UPF3X in the absence of UPF1. In contrast, UPF3X downregulation led to loss of the

interaction between AKT1 and UPF1, consistently with our PLA results (Figure 5). RNA co-immunoprecipitation analysis revealed Globin Ter in AKT1 immunoprecipitates from cells transfected with control or UPF1 siRNA but not when UPF3X was downregulated. This indicates that the interaction between AKT1 and RNA requires UPF3X but not UPF1 (Figure 6B).

#### *AKT1 phosphorylates UPF1*

Since UPF1 is a phosphoprotein and interacts with the kinase AKT1, the next step was to determine whether UPF1 might be phosphorylated by AKT1. This was tested in an *in vitro* phosphorylation assay using purified protein from bacteria (Figure 7A). Under these conditions, AKT1 was able to phosphorylate UPF1, UPF2, but not UPF3X. This indicates that the interaction between UPF3X and AKT1 detected by immunoprecipitation and in the proximity ligation assay does not lead to phosphorylation of UPF3X, in keeping with the fact that UPF3X has not been reported as a phosphoprotein.

To confirm the *in vitro* phosphorylation assay results, the phosphorylation level of UPF1 was assessed in the presence and absence of AKT1. UPF1 was immunoprecipitated from wild-type and  $\Delta$ AKT1 cells and both the overall phosphorylation of UPF1 and the specific phosphorylation of threonine 28 were assessed. For this, either an anti-phosphorylated serine/threonine antibody or an anti-phosphorylated threonine 28 antibody was used (Figure 7B). HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells showed an approximately two-fold lower overall UPF1 phosphorylation level than wild-type cells (Figure 7B right panel), but the absence of AKT1 did not impair phosphorylation at threonine 28. This indicates that AKT1 does not phosphorylate this particular amino acid, usually phosphorylated by SMG1 (6). To determine the relative impacts of AKT1 and SMG1 downregulation on NMD efficiency, SMG1 was downregulated with siRNA (Supplemental Figure 4) in both cell lines (Figure 7C). When SMG1 was downregulated in HEK293FT WT cells, NMD was found to be significantly inhibited, consistently with previous reports (17). HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells, interestingly, showed the same level of NMD efficiency whether SMG1

was downregulated or not. When the level of UPF1 phosphorylation was measured in UPF1 immunoprecipitates from extracts derived from WT or  $\Delta$ AKT1 cells in the presence and absence of SMG1, wild-type cells showed an approximately 50% decrease when SMG1 was absent (Figure 7D) and  $\Delta$ AKT1 cells showed a very similar decrease (Figure 7B). Interestingly, when expression of both kinases, SMG1 and AKT1, was reduced, UPF1 phosphorylation dropped to an even lower level than when a single kinase was absent. This suggests that the two kinases have different phosphorylation sites on UPF1 (Figure 7D). Overall, the results of Figure 7 indicate that both kinases are required for NMD. To confirm the view that AKT1 is essential to NMD, the efficiency of NMD was measured in HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells in the presence of UPF1 and UPF3X and in the absence of one of these factors (Supplemental Figure 6). When the essential NMD factor UPF1 or UPF3X was absent, NMD was inhibited to the same extent as when AKT1 or SMG1 was absent. This indicates that AKT1 can also be considered a central factor in the NMD reaction.

#### *A hyperactivated AKT1 isoform enhances NMD efficiency*

Some somatic mutations in the *AKT1* gene are reported to be associated with various cancers, including breast, colorectal, and ovarian cancers. Among these mutations, a glutamic-acid-to-lysine substitution at position 17 promotes hyperactivation of AKT1 due to increased AKT1 phosphorylation, resulting in concentration of this isoform at the cell membrane (38,39). When the E17K AKT1 isoform was expressed along with the Globin Norm or Globin Ter construct in transfected WT or HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells, both cell lines showed a significant increase in NMD efficiency (Figure 8). This effect was even greater than that obtained with overexpression of the wild-type isoform, although the levels of the two proteins were similar. Overall, the results in Figure 8 show that the NMD efficiency may be related to the level of AKT1 activation.



## Discussion

AKT is a kinase involved in the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Targets of this kinase participate in many cell processes, including apoptosis, cell proliferation, and cell survival (40). An indirect involvement of AKT in NMD has been suggested previously: via activation of the mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), AKT might cause phosphorylation of eIF4E-BP resulting in activation of translation and NMD (41). Yet it seems very likely that instead, AKT1 plays a direct role in NMD via UPF1 phosphorylation. The screening method used at the start of this work does not allow identification of NMD inhibitors whose mode of action involves inhibition of translation, since the readout is a measure of the activity of newly synthesized luciferase (Figure 1). Interestingly, all three molecules identified, in our screen of a library of kinase inhibitors, as having the greatest NMD-inhibiting capacity target the same kinase: AKT1. This led us to validate the involvement of AKT1 in NMD (Figure 2) and to demonstrate interactions between AKT1 and both UPF1 and UPF3X (Figures 3 and 4). The initial evidence that AKT1 is recruited to the mRNP by UPF3X before recruitment of UPF1 is supported by our PLA and immunoprecipitation results obtained in the absence of UPF1 or UPF3X (Figures 5 and 6). In addition, the presence of CBP80, but not eIF4E, in the AKT1 immunoprecipitate indicates that AKT1 is recruited to mRNP before or during the pioneer round of translation (33). Although AKT1 interacts with UPF1 and UPF3X, only UPF1 is phosphorylated by AKT1 (Figure 7). All these results can be summarized by the model described in Figure 9. The recruitment of AKT1 by UPF3X suggests that the AKT1 kinase might not be involved in all NMD reactions, particularly those which are independent of the UPF3X factor (42).

AKT1, shown here to phosphorylate UPF1 directly, is the second protein kinase, after SMG1 (16,17), to be identified as involved in NMD. Two other phosphorylation events are reported to influence NMD efficiency by targeting proteins indirectly involved in NMD. The first is phosphorylation of the telomere-maintenance 2 protein (TL2) by casein kinase 2 (CK2) and the second is phosphorylation of the exon junction complex component eIF4A3 by cyclin dependent kinase (43,44). Results presented in this study demonstrate that AKT1 is as essential to NMD as SMG1 (Figure 7C). Interestingly, these

two kinases do not fully recognize the same phosphorylation sites on UPF1 but could rather recognize only some or on the contrary totally different sites (Figure 7). This suggests a complex regulation of NMD by these two kinases, to be elucidated in the future. We have already shown that NMD is more efficient in cells where AKT1 is constitutively activated. This activation of NMD, allowing elimination of PTC-carrying mutant mRNAs, might have an important selective advantage in tumorigenesis. In fact, the number of NMD reactions increases in cancer cells because of the accumulation of neo-mutations at each cell division (45,46).

The involvement of AKT1 in NMD constitutes a link between NMD and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and potentially between NMD and the many processes in which AKT1 intervenes. In particular, this signaling pathway is very often activated during tumorigenesis, AKT being hyperactivated in more than 50% of tumors (40). On the basis of the results presented here, one might tentatively suggest that one consequence of AKT1 hyperactivation during tumorigenesis is activation of NMD. This view may be somewhat controversial, as several reports indicate inhibition of NMD in cancer cells, due to inhibition of NMD regulators such as MARVELD1 and UPF1 through promoter hypermethylation (47-49). This, once again, highlights the complexity of tumorigenesis. To fully understand this process, we need to understand the molecular mechanisms involved and the mutations promoting it. It seems fairly clear that according to the mutation(s) inducing or involved in the progression of tumorigenesis, NMD will be activated or inhibited and can play a protective role or even amplify tumorigenesis (4,50). Apart from this, the role of NMD may also differ according to the type of cancer. For example, it has been demonstrated that NMD is activated in cancers with microsatellite instability, particularly because of increased expression of some of the factors involved in NMD (51).

Whatever the case may be, the involvement of AKT1 in NMD might open interesting therapeutic prospects. Several AKT inhibitors have been developed for anticancer therapy, with promising results. Examples include AZD5363, Afuresertib, and Ipatasertib (52-54). Inhibition of NMD might be one of the action mechanisms of such inhibitors, as reported for Rigosertib (55). Furthermore, NMD inhibition

has been proposed as a therapeutic approach for cancers (56), and this inhibition might be achieved with AKT1 inhibitors.

## **Data availability**

Data and materials are fully available on request.

## **Funding**

FL is supported by funding from La Ligue contre le Cancer, Vaincre la mucoviscidose, the Association Française contre les Myopathies and the GIP Cancéropôle Nord Ouest. MP received a PhD fellowship from the University of Lille and la Région Hauts-de-France. This work was also supported by a grant from Contrat de Plan Etat-Région CPER Cancer 2015-2020.

## **Acknowledgments**

The authors would like to thank Pr. Lynne Maquat, Pr. Eric Adriaenssens and Dr. Anne-Laure Todeschini for reagents and helpful discussions. They also would like to thank Bill Zuercher and the SGC-UNC for providing the PKIS library.

## References

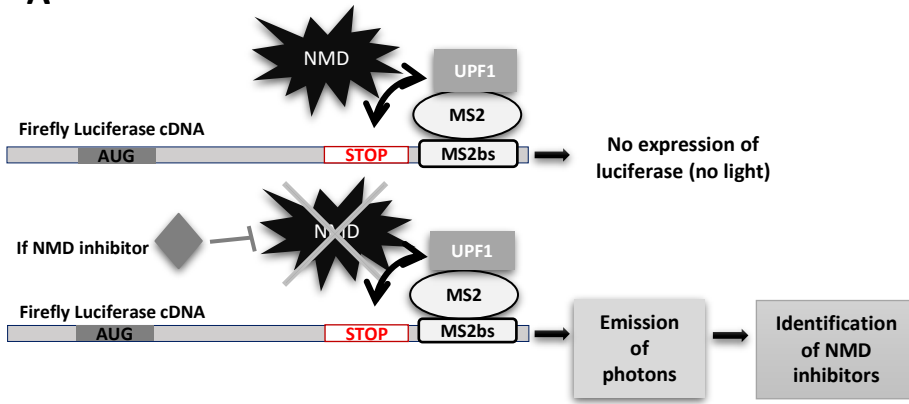
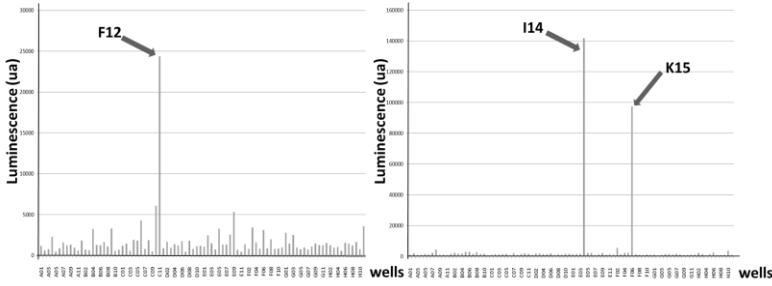
1. Lejeune, F. (2017) Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep*, **50**, 175-185.
2. Kurosaki, T. and Maquat, L.E. (2016) Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci*, **129**, 461-467.
3. Karousis, E.D., Nasif, S. and Muhlemann, O. (2016) Nonsense-mediated mRNA decay: novel mechanistic insights and biological impact. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **7**, 661-682.
4. Nogueira, G., Fernandes, R., Garcia-Moreno, J.F. and Romao, L. (2021) Nonsense-mediated RNA decay and its bipolar function in cancer. *Mol Cancer*, **20**, 72.
5. Chiu, S.Y., Serin, G., Ohara, O. and Maquat, L.E. (2003) Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA*, **9**, 77-87.
6. Okada-Katsuhata, Y., Yamashita, A., Kutsuzawa, K., Izumi, N., Hirahara, F. and Ohno, S. (2011) 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.
7. Durand, S., Franks, T.M. and Lykke-Andersen, J. (2016) Hyperphosphorylation amplifies UPF1 activity to resolve stalls in nonsense-mediated mRNA decay. *Nat Commun*, **7**, 12434.
8. Yamashita, A., Kashima, I. and Ohno, S. (2005) The role of SMG-1 in nonsense-mediated mRNA decay. *Biochim Biophys Acta*, **1754**, 305-315.
9. Kurosaki, T., Li, W., Hoque, M., Popp, M.W., Ermolenko, D.N., Tian, B. and Maquat, L.E. (2014) A post-translational regulatory switch on UPF1 controls targeted mRNA degradation. *Genes Dev*, **28**, 1900-1916.
10. Chakrabarti, S., Bonneau, F., Schussler, S., Eppinger, E. and Conti, E. (2014) Phospho-dependent and phospho-independent interactions of the helicase UPF1 with the NMD factors SMG5-SMG7 and SMG6. *Nucleic Acids Res*, **42**, 9447-9460.
11. Flury, V., Restuccia, U., Bachi, A. and Muhlemann, O. (2014) Characterization of phosphorylation- and RNA-dependent UPF1 interactors by quantitative proteomics. *J Proteome Res*, **13**, 3038-3053.
12. Lasalde, C., Rivera, A.V., Leon, A.J., Gonzalez-Feliciano, J.A., Estrella, L.A., Rodriguez-Cruz, E.N., Correa, M.E., Cajigas, I.J., Bracho, D.P., Vega, I.E. *et al.* (2014) Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in the RNA surveillance protein Upf1. *Nucleic Acids Res*, **42**, 1916-1929.
13. Lejeune, F., Li, X. and Maquat, L.E. (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylation, and exonucleolytic activities. *Mol Cell*, **12**, 675-687.
14. Yamashita, A. (2013) Role of SMG-1-mediated Upf1 phosphorylation in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Cells*, **18**, 161-175.
15. Isken, O., Kim, Y.K., Hosoda, N., Mayeur, G.L., Hershey, J.W. and Maquat, L.E. (2008) Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell*, **133**, 314-327.
16. Denning, G., Jamieson, L., Maquat, L.E., Thompson, E.A. and Fields, A.P. (2001) Cloning of a novel phosphatidylinositol kinase-related kinase: characterization of the human SMG-1 RNA surveillance protein. *J Biol Chem*, **276**, 22709-22714.
17. Yamashita, A., Ohnishi, T., Kashima, I., Taya, Y. and Ohno, S. (2001) Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*, **15**, 2215-2228.
18. Brumbaugh, K.M., Otterness, D.M., Geisen, C., Oliveira, V., Brognard, J., Li, X., Lejeune, F., Tibbetts, R.S., Maquat, L.E. and Abraham, R.T. (2004) The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Mol Cell*, **14**, 585-598.

19. Clerici, M., Deniaud, A., Boehm, V., Gehring, N.H., Schaffitzel, C. and Cusack, S. (2013) Structural and functional analysis of the three MIF4G domains of nonsense-mediated decay factor UPF2. *Nucleic Acids Res*, **42**, 2673-2686.
20. Pekarsky, Y., Koval, A., Hallas, C., Bichi, R., Tresini, M., Malstrom, S., Russo, G., Tschlis, P. and Croce, C.M. (2000) Tcl1 enhances Akt kinase activity and mediates its nuclear translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3028-3033.
21. Fiorenza, M.T., Torcia, S., Canterini, S., Bevilacqua, A., Narducci, M.G., Ragone, G., Croce, C.M., Russo, G. and Mangia, F. (2008) TCL1 promotes blastomere proliferation through nuclear transfer, but not direct phosphorylation, of AKT/PKB in early mouse embryos. *Cell Death Differ*, **15**, 420-422.
22. Duronio, V. (2008) The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J*, **415**, 333-344.
23. Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R. *et al.* (2003) Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest*, **112**, 197-208.
24. Yang, Z.Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dummler, B., Wahli, W. and Hemmings, B.A. (2005) Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase Balpha (PKBalpha) and Akt3/PKBgamma on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Mol Cell Biol*, **25**, 10407-10418.
25. Gonzalez-Hilarion, S., Beghyn, T., Jia, J., Debreuck, N., Berte, G., Mamchaoui, K., Mouly, V., Gruenert, D.C., Deprez, B. and Lejeune, F. (2012) Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet J Rare Dis*, **7**, 58.
26. Drewry, D.H., Willson, T.M. and Zuercher, W.J. (2014) Seeding collaborations to advance kinase science with the GSK Published Kinase Inhibitor Set (PKIS). *Curr Top Med Chem*, **14**, 340-342.
27. Sanjana, N.E., Shalem, O. and Zhang, F. (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*, **11**, 783-784.
28. Hsieh, A.C., Bo, R., Manola, J., Vazquez, F., Bare, O., Khvorova, A., Scaringe, S. and Sellers, W.R. (2004) A library of siRNA duplexes targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway: determinants of gene silencing for use in cell-based screens. *Nucleic Acids Res*, **32**, 893-901.
29. Zeng, M., van der Donk, W.A. and Chen, J. (2014) Lanthionine synthetase C-like protein 2 (LanCL2) is a novel regulator of Akt. *Mol Biol Cell*, **25**, 3954-3961.
30. Chang, Y.F., Imam, J.S. and Wilkinson, M.F. (2007) The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem*, **76**, 51-74.
31. Luo, Y., Shoemaker, A.R., Liu, X., Woods, K.W., Thomas, S.A., de Jong, R., Han, E.K., Li, T., Stoll, V.S., Powlas, J.A. *et al.* (2005) Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo. *Mol Cancer Ther*, **4**, 977-986.
32. Mayo, L.D. and Donner, D.B. (2001) A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 11598-11603.
33. Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G. and Maquat, L.E. (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*, **106**, 607-617.
34. Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X. and Maquat, L.E. (2002) The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J*, **21**, 3536-3545.
35. Hwang, J., Sato, H., Tang, Y., Matsuda, D. and Maquat, L.E. (2010) UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Mol Cell*, **39**, 396-409.
36. Alam, M.S. (2018) Proximity Ligation Assay (PLA). *Curr Protoc Immunol*, **123**, e58.
37. Santi, S.A. and Lee, H. (2010) The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol*, **298**, C580-591.

38. Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S. *et al.* (2007) A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*, **448**, 439-444.
39. Bessiere, L., Todeschini, A.L., Auguste, A., Sarnacki, S., Flatters, D., Legois, B., Sultan, C., Kalfa, N., Galmiche, L. and Veitia, R.A. (2015) A Hot-spot of In-frame Duplications Activates the Oncoprotein AKT1 in Juvenile Granulosa Cell Tumors. *EBioMedicine*, **2**, 421-431.
40. Manning, B.D. and Toker, A. (2017) AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell*, **169**, 381-405.
41. Park, J., Ahn, S., Jayabalan, A.K., Ohn, T., Koh, H.C. and Hwang, J. (2016) Insulin Signaling Augments eIF4E-Dependent Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells. *Biochim Biophys Acta*, **1859**, 896-905.
42. Chan, W.K., Huang, L., Gudikote, J.P., Chang, Y.F., Imam, J.S., MacLean, J.A., 2nd and Wilkinson, M.F. (2007) An alternative branch of the nonsense-mediated decay pathway. *EMBO J*, **26**, 1820-1830.
43. Ahn, S., Kim, J. and Hwang, J. (2013) CK2-mediated TEL2 phosphorylation augments nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by increase of SMG1 stability. *Biochim Biophys Acta*, **1829**, 1047-1055.
44. Ryu, I., Won, Y.S., Ha, H., Kim, E., Park, Y., Kim, M.K., Kwon, D.H., Choe, J., Song, H.K., Jung, H. *et al.* (2019) eIF4A3 Phosphorylation by CDKs Affects NMD during the Cell Cycle. *Cell Rep*, **26**, 2126-2139 e2129.
45. Campbell, P.J., Yachida, S., Mudie, L.J., Stephens, P.J., Pleasance, E.D., Stebbings, L.A., Morsberger, L.A., Latimer, C., McLaren, S., Lin, M.L. *et al.* (2010) The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature*, **467**, 1109-1113.
46. Pleasance, E.D., Cheetham, R.K., Stephens, P.J., McBride, D.J., Humphray, S.J., Greenman, C.D., Varela, I., Lin, M.L., Odonez, G.R., Bignell, G.R. *et al.* (2010) A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature*, **463**, 191-196.
47. Chang, L., Li, C., Guo, T., Wang, H., Ma, W., Yuan, Y., Liu, Q., Ye, Q. and Liu, Z. (2016) The human RNA surveillance factor UPF1 regulates tumorigenesis by targeting Smad7 in hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, **35**, 8.
48. Shi, M., Wang, S., Yao, Y., Li, Y., Zhang, H., Han, F., Nie, H., Su, J., Wang, Z., Yue, L. *et al.* (2014) Biological and clinical significance of epigenetic silencing of MARVELD1 gene in lung cancer. *Sci Rep*, **4**, 7545.
49. Karam, R., Wengrod, J., Gardner, L.B. and Wilkinson, M.F. (2013) Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: implications for physiology and disease. *Biochim Biophys Acta*, **1829**, 624-633.
50. Popp, M.W. and Maquat, L.E. (2018) Nonsense-mediated mRNA Decay and Cancer. *Curr Opin Genet Dev*, **48**, 44-50.
51. Bokhari, A., Jonchere, V., Lagrange, A., Bertrand, R., Svrcek, M., Marisa, L., Buhard, O., Greene, M., Demidova, A., Jia, J. *et al.* (2018) Targeting nonsense-mediated mRNA decay in colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncogenesis*, **7**, 70.
52. Crabb, S.J., Birtle, A.J., Martin, K., Downs, N., Ratcliffe, I., Maishman, T., Ellis, M., Griffiths, G., Thompson, S., Ksiazek, L. *et al.* (2017) ProCAID: a phase I clinical trial to combine the AKT inhibitor AZD5363 with docetaxel and prednisolone chemotherapy for metastatic castration resistant prostate cancer. *Invest New Drugs*, **35**, 599-607.
53. Dumble, M., Crouthamel, M.C., Zhang, S.Y., Schaber, M., Levy, D., Robell, K., Liu, Q., Figueroa, D.J., Minthorn, E.A., Seefeld, M.A. *et al.* (2014) Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. *PLoS One*, **9**, e100880.
54. Lin, J., Sampath, D., Nannini, M.A., Lee, B.B., Degtyarev, M., Oeh, J., Savage, H., Guan, Z., Hong, R., Kassees, R. *et al.* (2013) Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res*, **19**, 1760-1772.

55. Hyoda, T., Tsujioka, T., Nakahara, T., Suemori, S., Okamoto, S., Kataoka, M. and Tohyama, K. (2015) Rigosertib induces cell death of a myelodysplastic syndrome-derived cell line by DNA damage-induced G2/M arrest. *Cancer Sci*, **106**, 287-293.
56. Lejeune, F. (2016) Triple effect of nonsense-mediated mRNA decay inhibition on cancer. *Single Cell Biology*, **5**, 136.



**A****B****C**

| Compound | Name       | Target of the compound |
|----------|------------|------------------------|
| F12      | GSK619487A | AKT1                   |
| I14      | GSK614526A | AKT1                   |
| K15      | GSK949675A | AKT1                   |

Figure 1

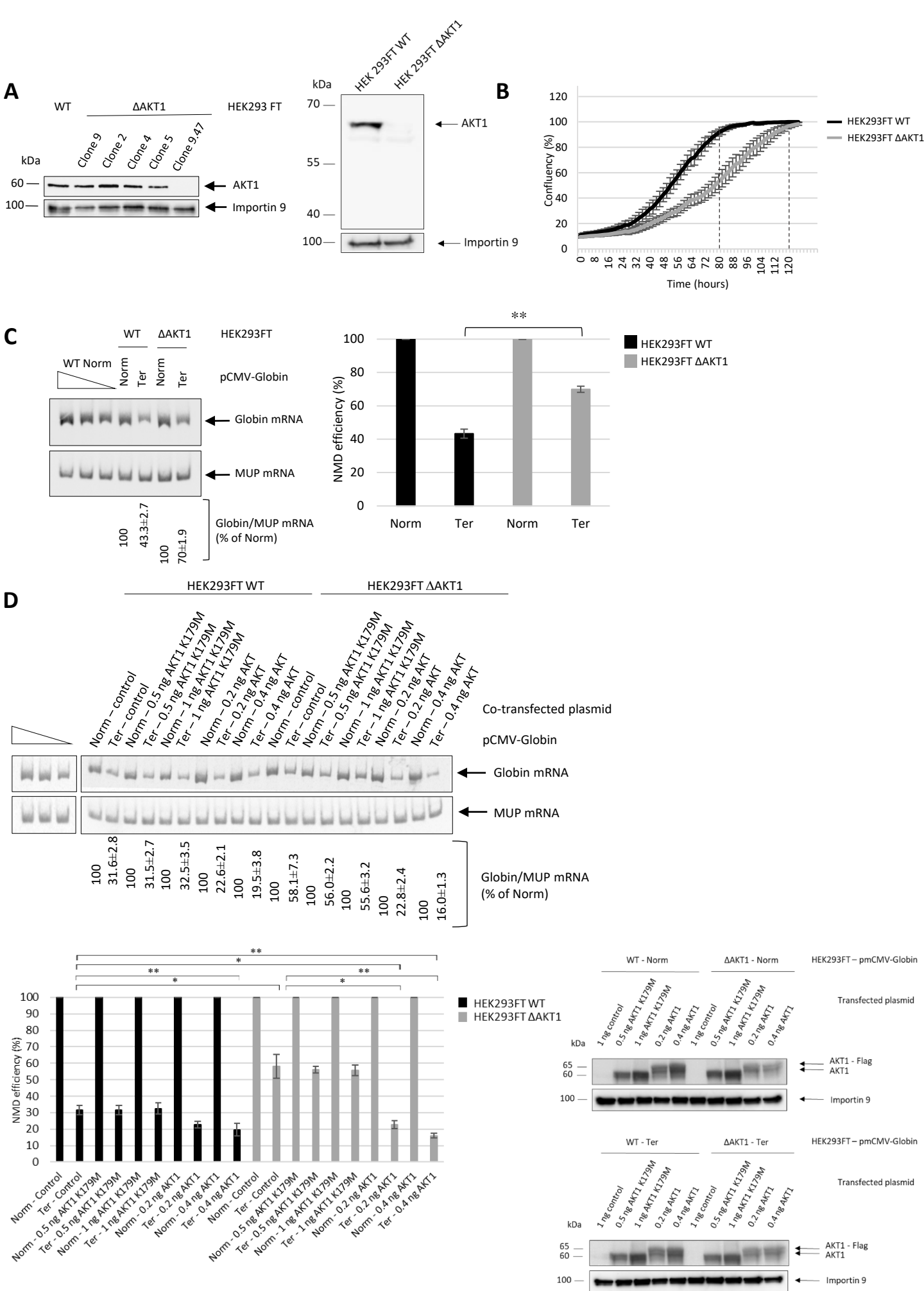


Figure 2

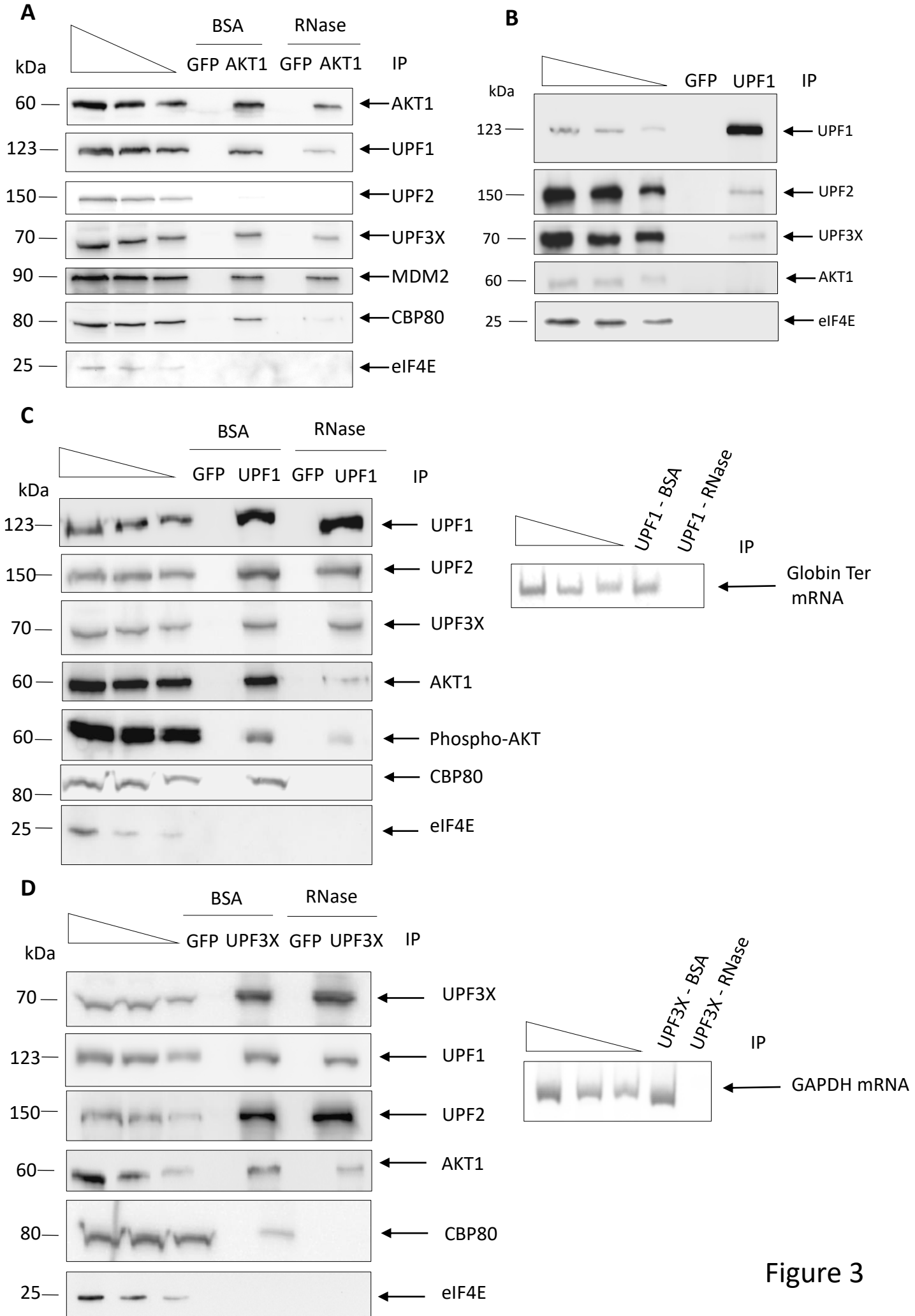


Figure 3

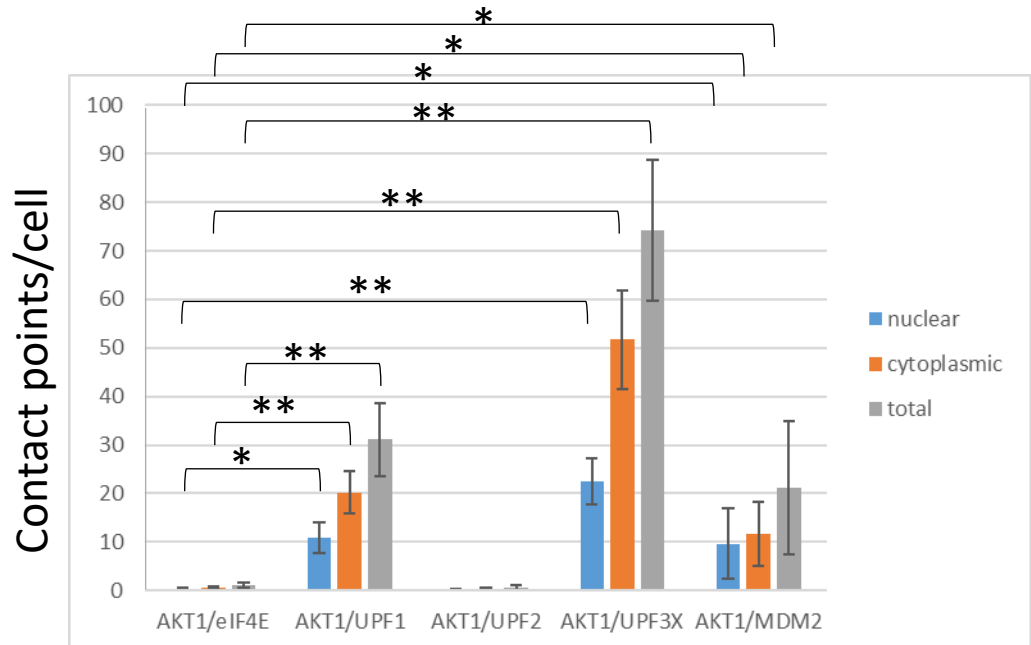
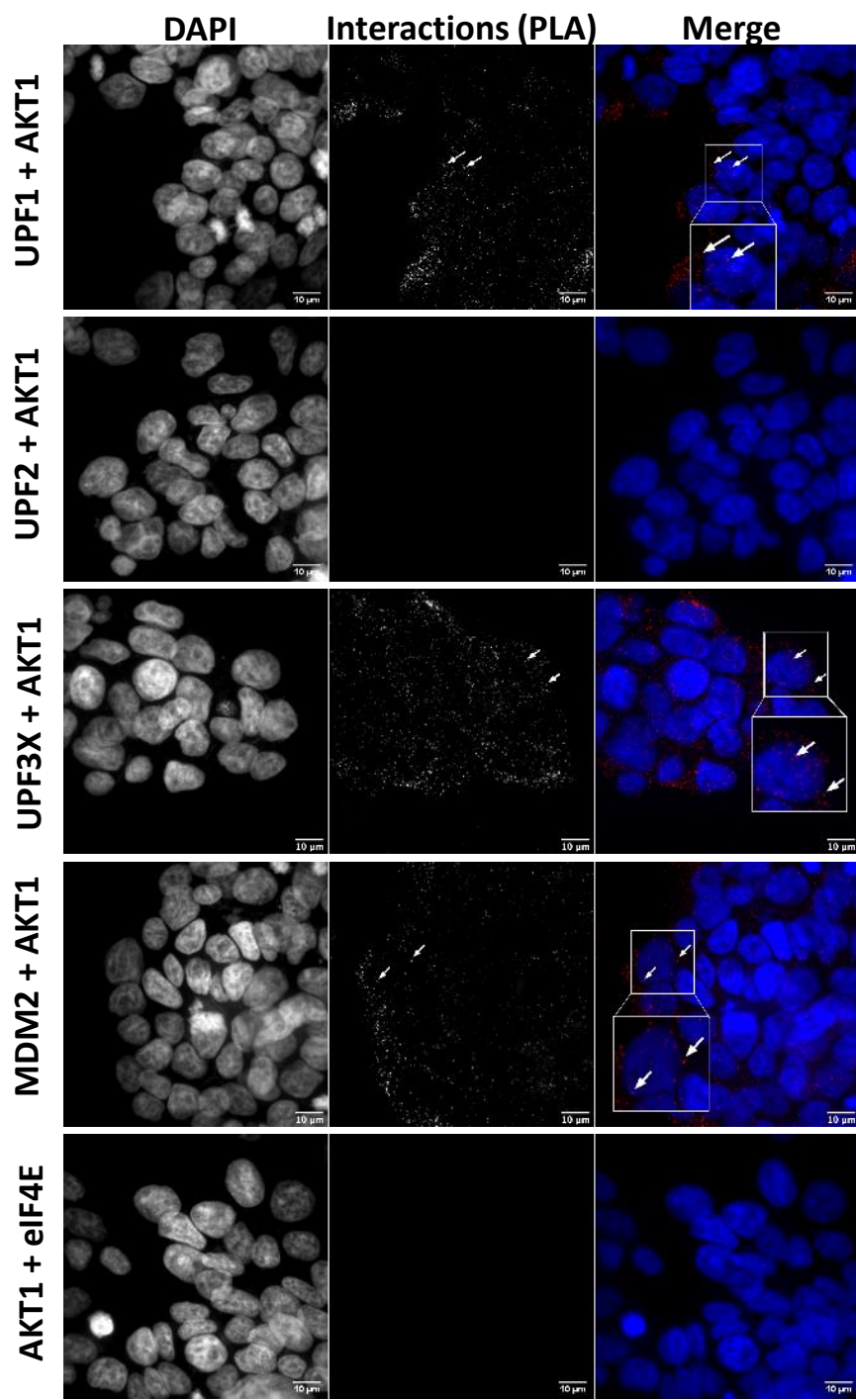


Figure 4

DAPI Interactions (PLA) Merge

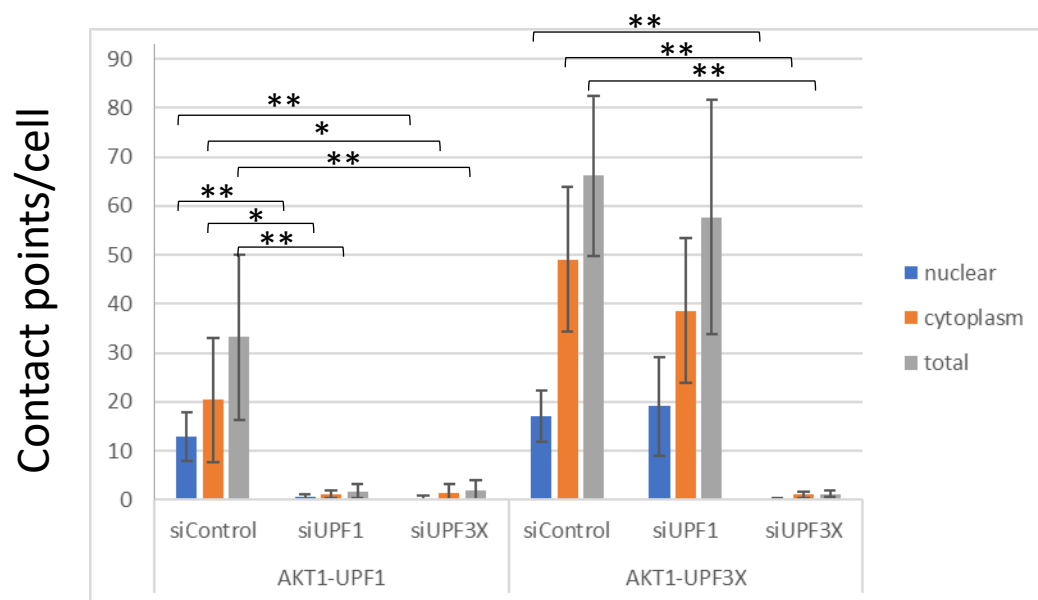
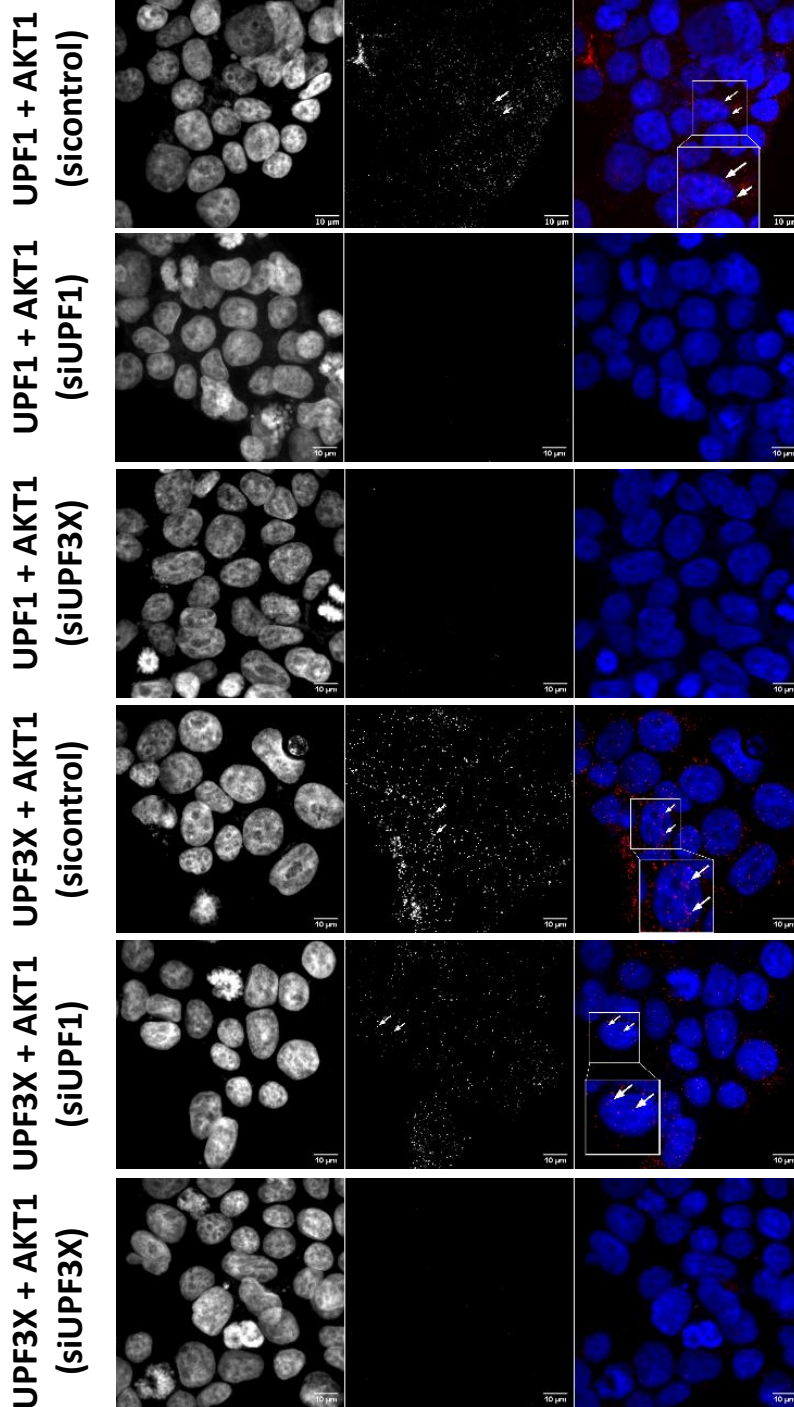


Figure 5

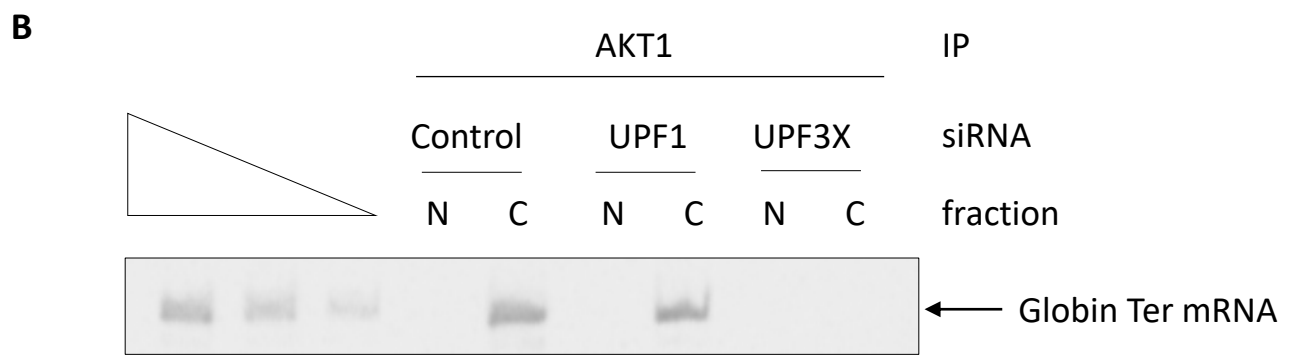
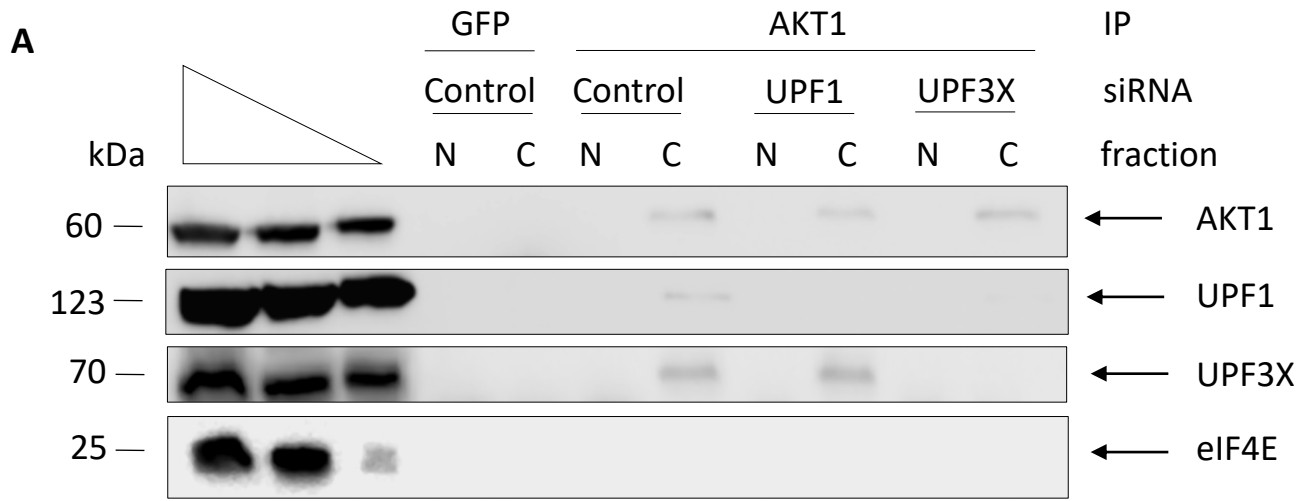


Figure 6

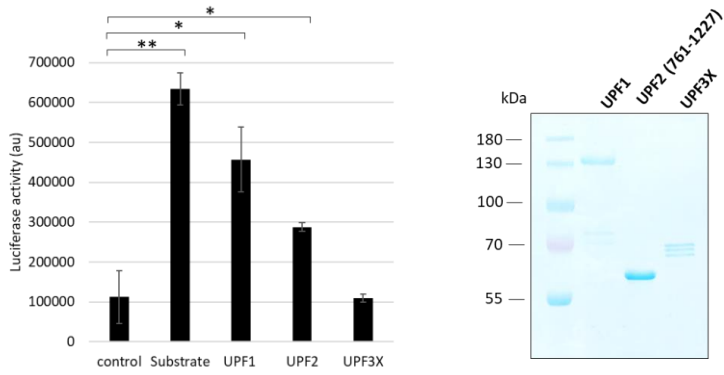
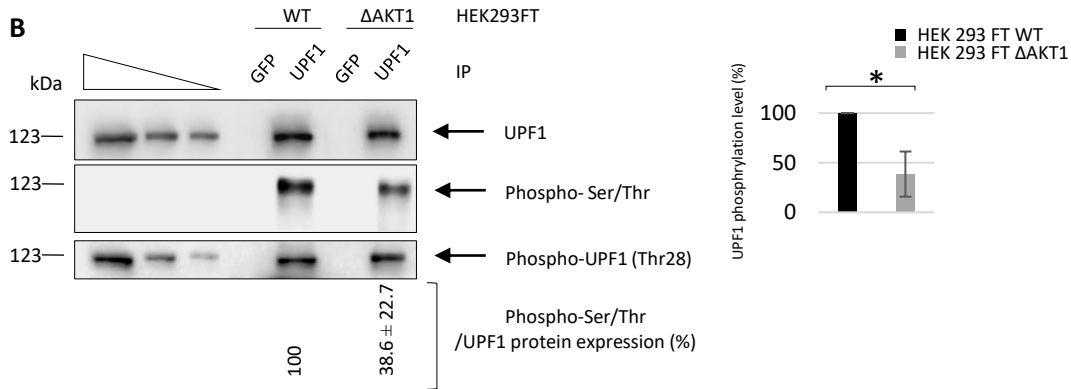
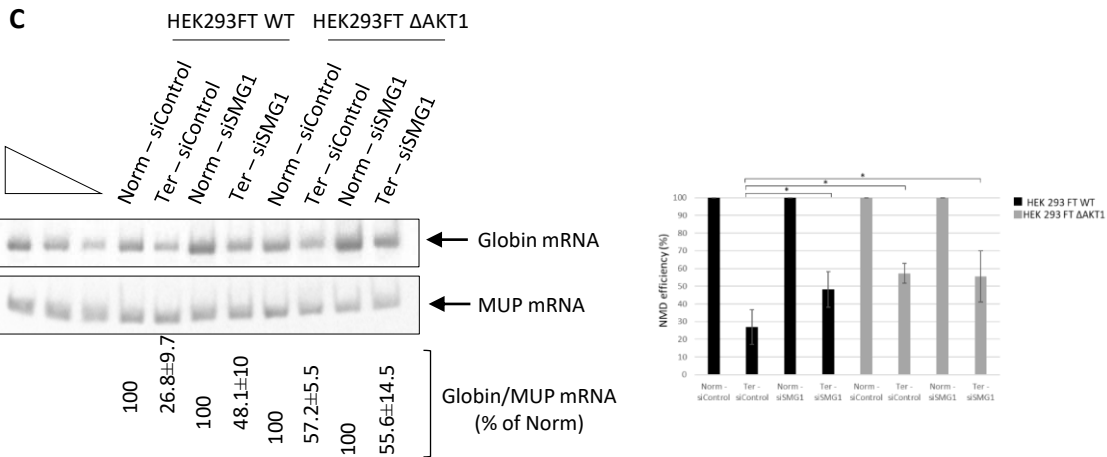
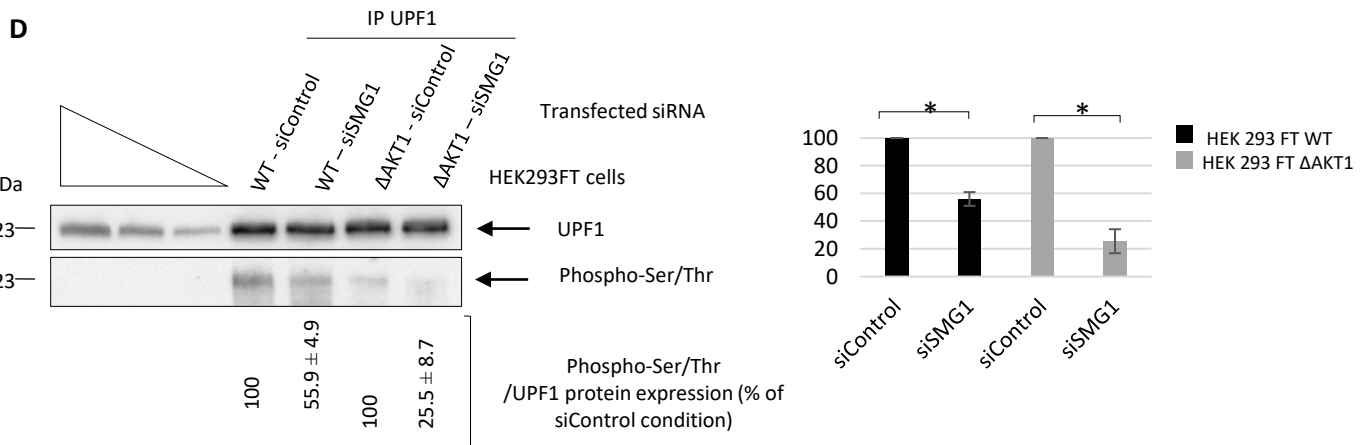
**A****B****C****D**

Figure 7

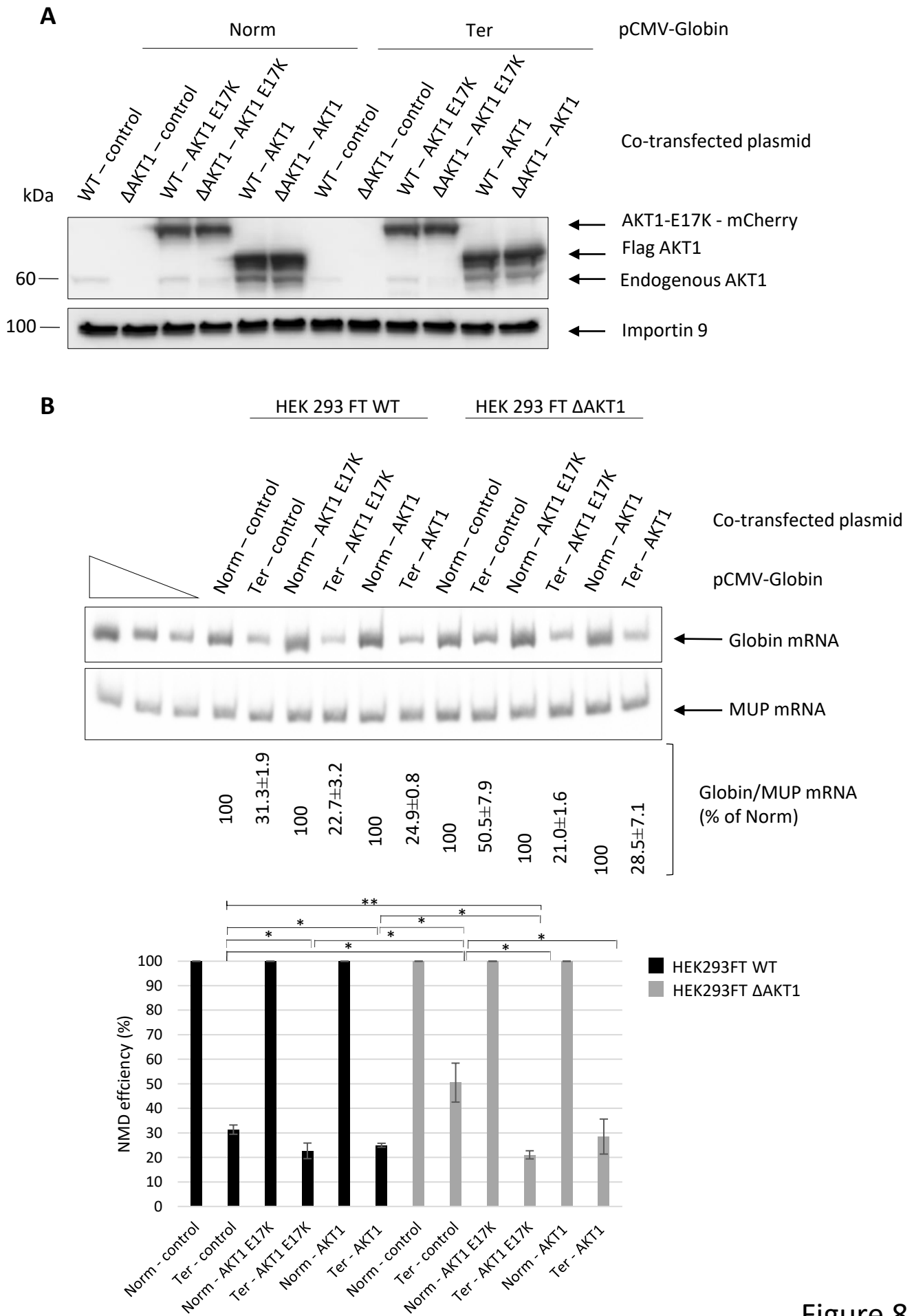


Figure 8



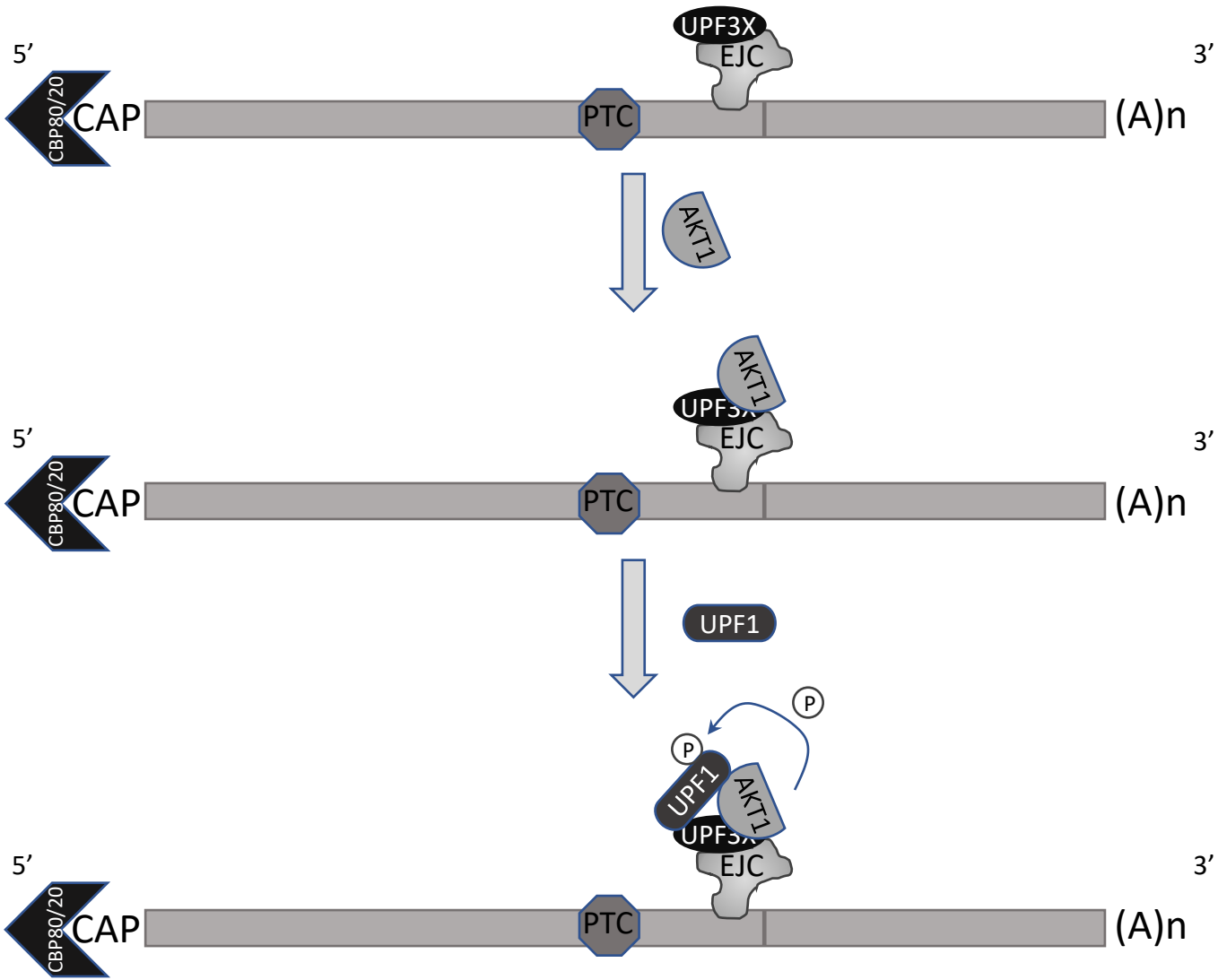


Figure 9

## Figure legends

Figure 1: Screening of the PKIS library. (A) Schematic representation of the screening system used to identify NMD inhibitors. HeLa cells are transfected with constructs expressing the cDNA encoding the firefly luciferase carrying MS2 binding sites in the 3'UTR and expressing an MS2/UPF1 fusion protein. If a tested molecule inhibits NMD, the firefly luciferase mRNA is stabilized and translated to a functional firefly luciferase, the activity of which is measurable. (B) Results of the screening of the two plates containing the molecules promoting the highest luciferase activity. (C) Molecules and target identification.

Figure 2: The absence of AKT1 impairs NMD. (A left panel) Western blot showing levels of AKT1 protein in various HEK293FT  $\Delta$ AKT1 clones. Importin 9 was used as a loading control. (right panel) Western-blot analysis of AKT1 from HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells, showing the absence of AKT1 or truncated AKT1 expression in HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells. (B) Growth curves of HEK293FT WT cells (in black) and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells (in grey). Percent confluence was measured as a function of time. The two broken lines indicate the confluence points of the two cell lines. (C) Measure of NMD efficiency in the presence and absence of AKT1. The left panel represents levels of WT and PTC-carrying globin mRNAs as measured by RT-PCR. MUP mRNA was used as a loading control. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of a Globin Norm sample from WT cells. The bar plot on the right shows the measured NMD efficiency. (D) The kinase activity of AKT1 is required for its role in NMD. The NMD efficiency was measured as in (C) in cells overexpressing AKT1 or AKT1-K179M. The lower right panels show a western blot analysis of AKT1 and AKT1-K179M levels in cells transfected with the corresponding expression vector. The level of AKT1 was evaluated in HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells after transfection with pmCMV-Globin Norm, pmCMV-Globin Ter, pmCMV (control), pAKT1-K179M, or pAKT1. Importin 9 was used as a loading control. The results of Figure 2 are representative of at least two experiments. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test: \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ .

Figure 3: AKT1 interacts with NMD factors. (A) AKT1 immunoprecipitation analysis. AKT1 was immunoprecipitated from HEK293FT WT cells. The immunoprecipitations were performed in the presence of RNase A or BSA to assess the requirement for RNA in the protein interactions. The immunoprecipitate was then analyzed by western blotting for the presence of co-immunoprecipitated factors. MDM2 as a partner of AKT1 was used as positive control. (B) UPF1 immunoprecipitation analysis. UPF1 was immunoprecipitated from HEK293FT WT cells and the immunoprecipitate analyzed by western blotting for the presence of co-immunoprecipitated factors. (C) UPF1 immunoprecipitation analysis under NMD activation. UPF1 was immunoprecipitated from HEK293FT WT cells transfected with a construct expressing PTC-carrying globin mRNA in the presence of RNase A or BSA to assess the requirement for RNA in the protein interactions. The immunoprecipitate was then analyzed by western blotting for the presence of co-immunoprecipitated factors. The right panel is the result of an RT-PCR performed on RNA extracted from the immunoprecipitates to assess the efficiency of the RNase A treatment. (D) UPF3X immunoprecipitation analysis. UPF3X was immunoprecipitated from HEK293FT WT cells and the immunoprecipitate analyzed by western blotting for the presence of co-immunoprecipitated factors. GFP immunoprecipitation was performed as a negative control to assess the specificity of the immunoprecipitations. The immunoprecipitations were performed in the presence of RNase A or BSA to assess the requirement for RNA in the protein interactions. The

immunoprecipitate was then analyzed by western blotting for the presence of co-immunoprecipitated factors. The right panel is the result of RT-PCR performed on RNA extracted from the immunoprecipitates to assess the efficiency of RNase A treatment. The three leftmost lanes in each panel of the figure correspond to serial dilutions of HEK293FT whole cell extract. The results presented in this figure are representative of two experiments.

Figure 4: AKT1 interacts with UPF1 and UPF3X. A proximity ligation assay was performed to assess interactions between AKT1 and UPF1, UPF2, UPF3X, or MDM2 (positive control). As a negative control, interactions between UPF1 and eIF4E were assessed. The white arrows indicate typical interaction points. The white squares correspond to a magnification of the background image. The bar plot at the bottom of the figure shows for each condition the average number of interaction points per cell as determined on more than 200 cells for each condition. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test: \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ . All the results of this figure are representative of two experiments.

Figure 5: AKT1 interaction with UPF1 requires UPF3X. A proximity ligation assay was performed to assess the interactions between AKT1 and UPF1 or UPF3X after downregulation of UPF1 or UPF3X with siRNA. The white arrows indicate typical interaction points. The white squares correspond to a magnification of the background image. The bar plot at the bottom of the figure shows the average number of interaction points per cell as determined for more than 200 cells for each condition. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test: \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ . All the results of this figure are representative of two experiments.

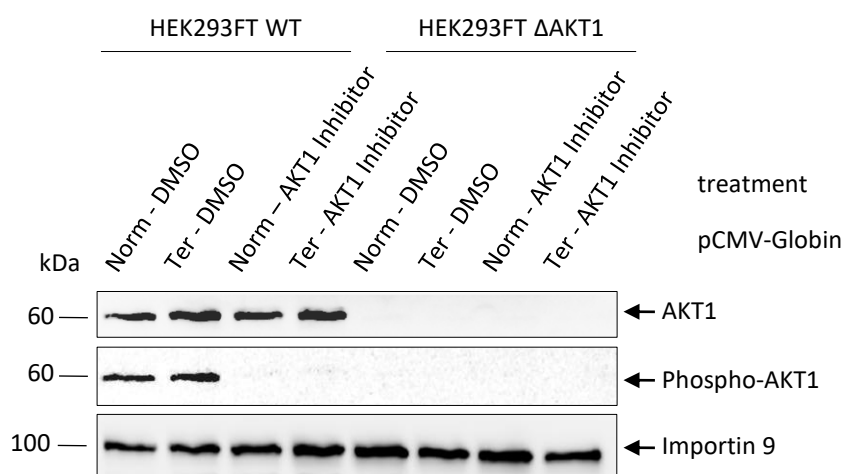
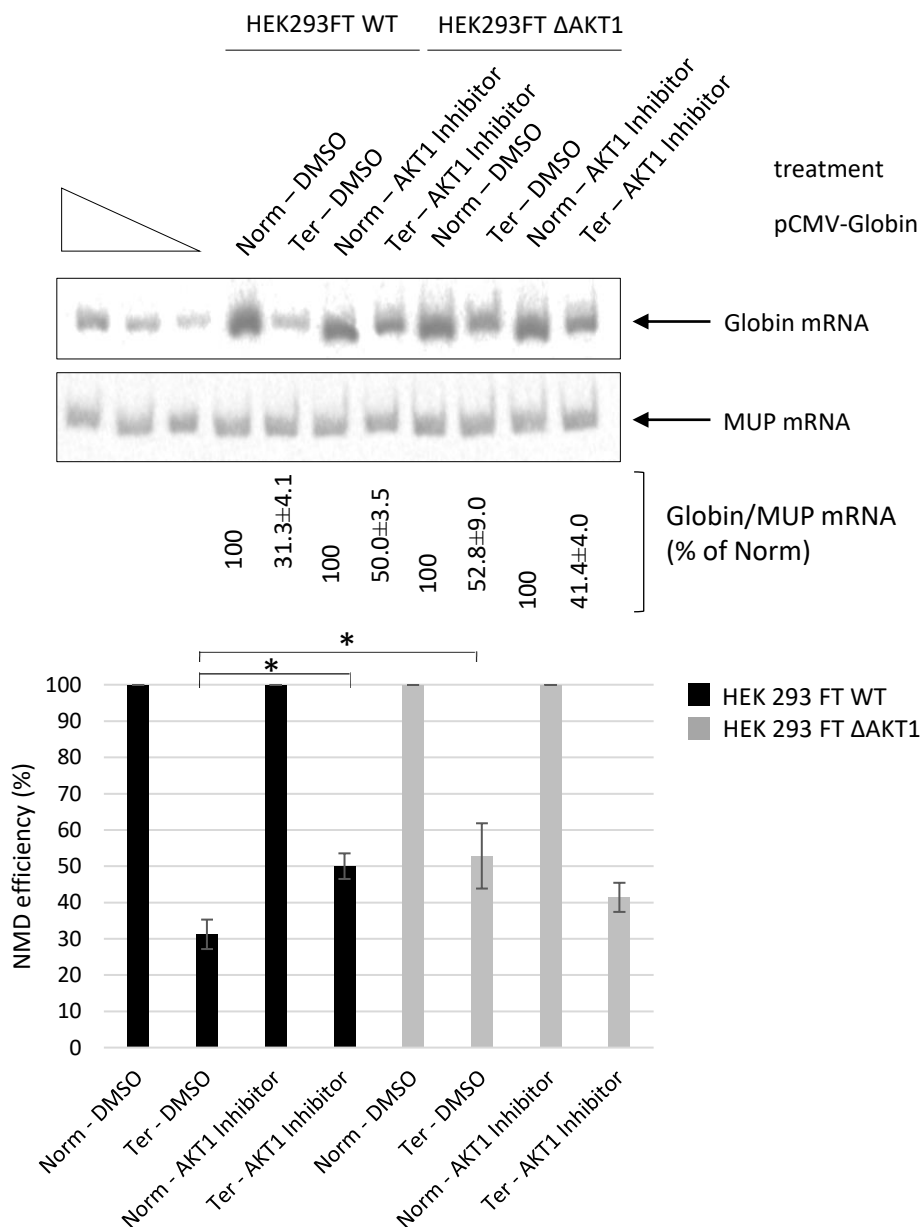
Figure 6: AKT1 is recruited to the mRNP by UPF3X. AKT1 immunoprecipitations were performed from nuclear and cytoplasmic fractions of HEK293FT WT cells transfected with a construct expressing Globin Ter mRNA. (A) Western blot analysis of the immunoprecipitates. The three leftmost lanes of each panel of the figure correspond to serial dilutions of HEK293FT whole cell extract. (B) RNAs were purified from the immunoprecipitates in order to measure the level of Globin Ter mRNA by RT-PCR. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of AKT1 immunoprecipitate from HEK293FT cells transfected with Control siRNA.

Figure 7: AKT1 phosphorylates NMD factors. (A) In vitro phosphorylation of UPF1 and UPF2 but not UPF3X by AKT1. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test: \* $<0.05$ . The right panel is a Coomassie staining gel showing the UPF proteins used in the assay. (B) UPF1 was immunoprecipitated from HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells to assess the level of UPF1 phosphorylation. The three leftmost lanes of each panel of the figure correspond to serial dilutions of HEK293FT whole cell extract. The right panel shows quantification of UPF1 phosphorylation in both cell lines after immunoprecipitation of UPF1. (C) Absence of any additive effect of AKT1 and SMG1 on NMD efficiency. SMG1 was downregulated with siRNA in HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells expressing Globin Norm or Globin Ter in order to evaluate the NMD efficiency. The NMD efficiency was measured by RT-PCR. The left panel shows a representative gel analysis after quantitative PCR. MUP mRNA was used as a loading and transfection control. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of the Norm control plasmid sample. The bar plot on the right side of the gel shows the NMD efficiencies measured under the different tested conditions. (D) Measurement of UPF1

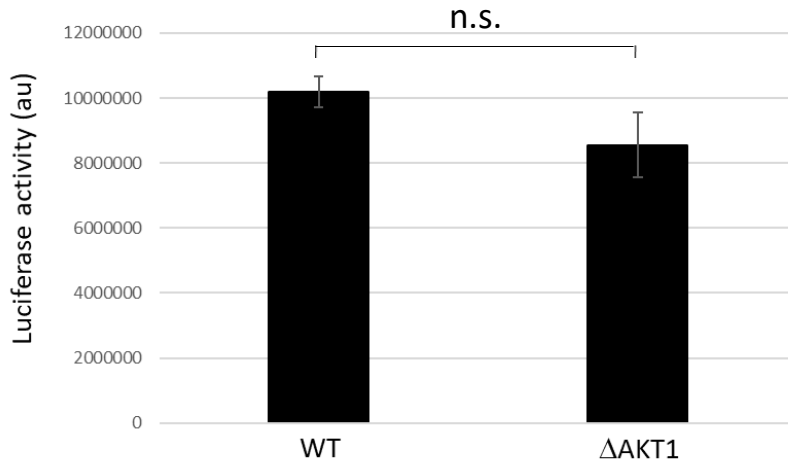
phosphorylation in HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells in the presence and absence of SMG1. The left panel shows a representative gel analysis and the bar plot on the right side of the gel is a graphic illustration of the quantification of two independent experiments. The three leftmost lanes of each panel of the figure correspond to serial dilutions of HEK293FT whole cell extract. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test:  $* < 0.05$ . The in vitro phosphorylation and immunoprecipitation results are representative of two and three experiments, respectively. The RT-PCR results showing the effects of SMG1 and AKT1 kinases are representative of four experiments.

Figure 8: The NMD efficiency is related to the AKT1 activation status. (A) Western blot analysis showing levels of the endogenous, plasmid-encoded WT, and plasmid-encoded constitutively activated (E17K) AKT1 isoforms. Importin 9 was used as a loading control. (B) NMD efficiency measured by RT-PCR. The upper panel shows a representative gel analysis after quantitative PCR. MUP mRNA was used as a loading and transfection control. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of the Norm control plasmid sample. The bar plot at the bottom of the figure shows the NMD efficiencies measured under the different test conditions. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test:  $* < 0.05$ ,  $** < 0.01$ . All the results of this figure are representative of three experiments.

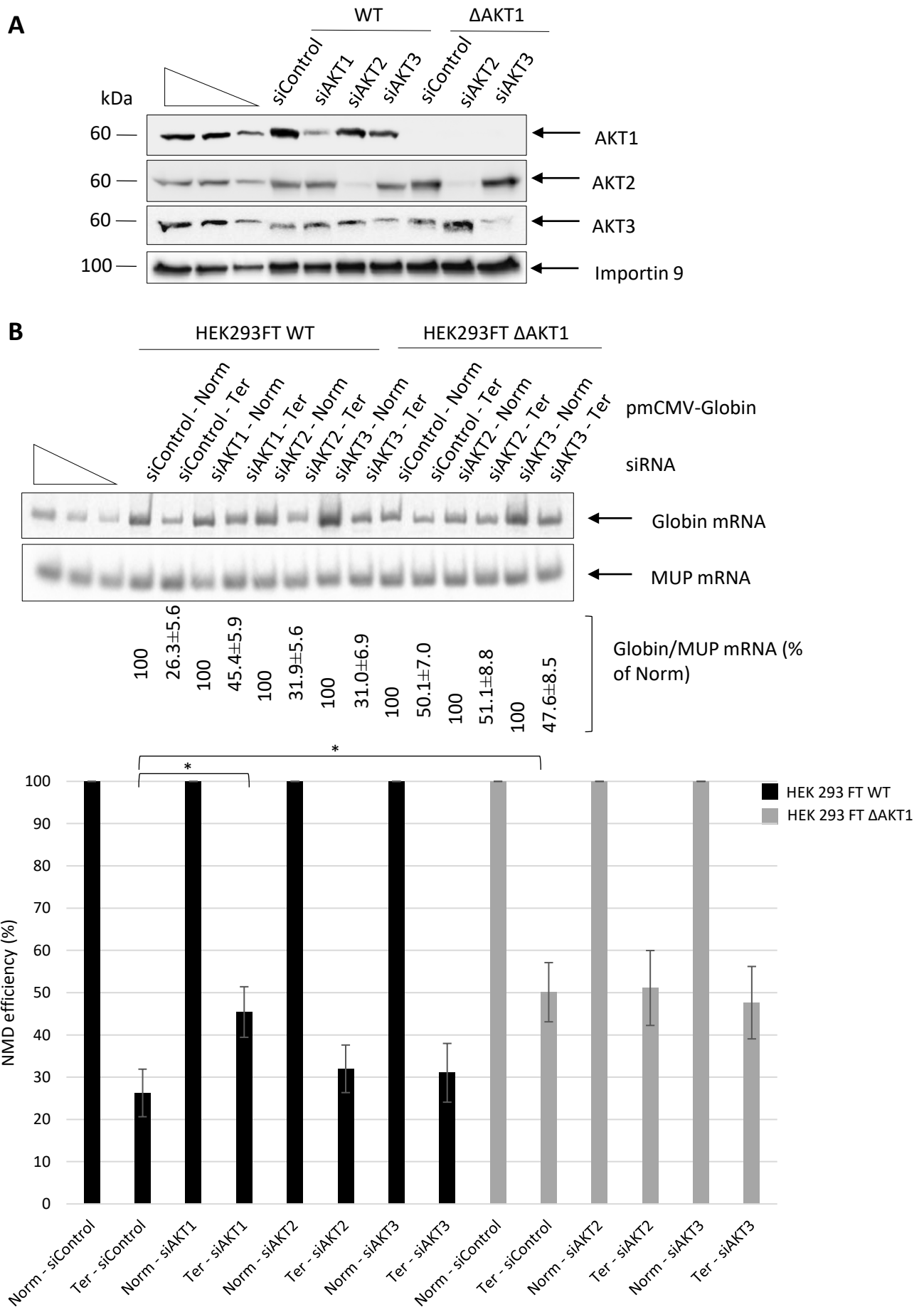
Figure 9: Model of UPF1 phosphorylation by AKT1. UPF3X is loaded on mRNP by the exon junction complex (EJC). UPF3X would recruit AKT1 before recruiting UPF1 and phosphorylating it. These events occur before or during the pioneer round of translation, since the cap structure is bound by CBP80 and not eIF4E.

**A****B**

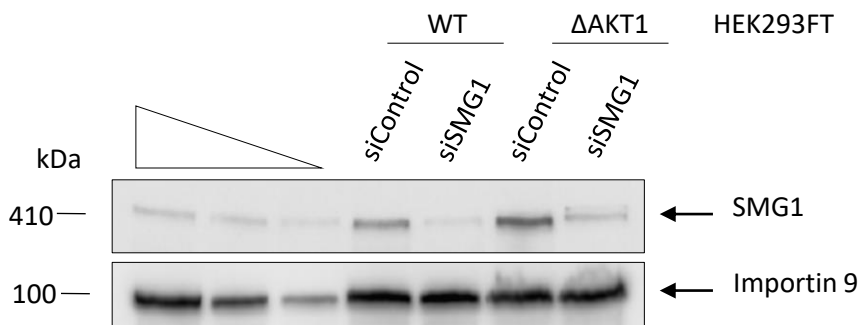
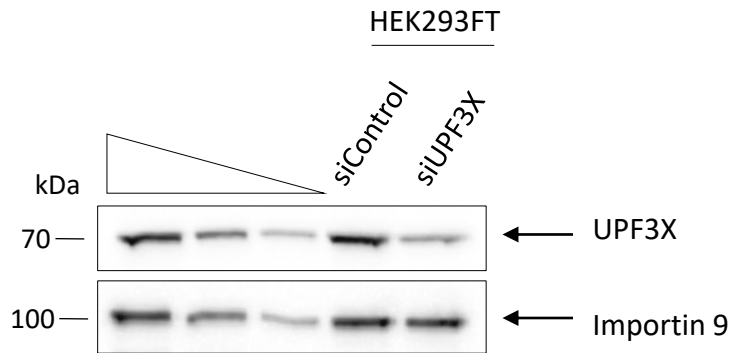
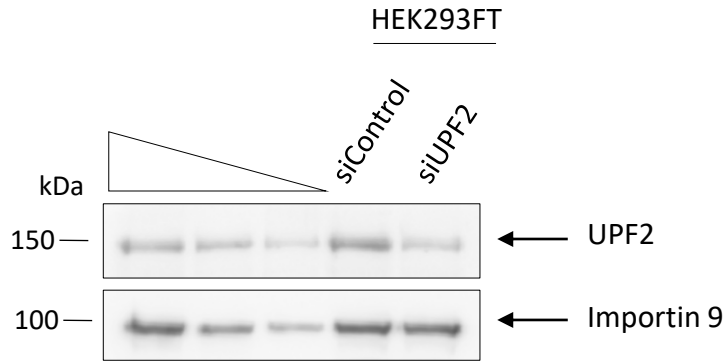
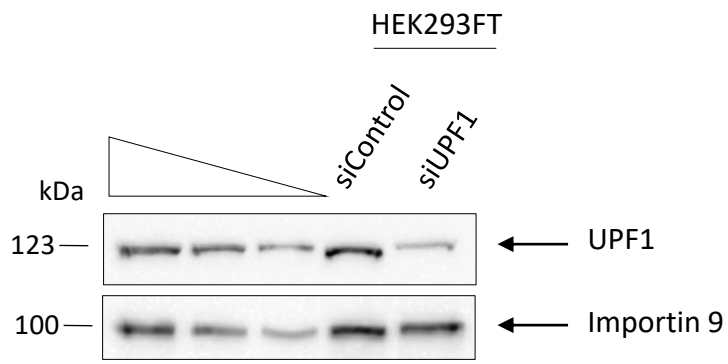
Supplemental Figure 1: Chemical inhibition of AKT1 promotes NMD inhibition. (A) Western blot analysis of proteins from HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells treated with DMSO or with the AKT1 inhibitor. AKT1 and phospho-AKT1 (P-AKT1) were detected. Importin 9 was used as a loading control. (B) RT-PCR analysis of HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells transfected with the Globin Norm or Globin Ter expression vector and treated with DMSO or the AKT1 inhibitor. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of the Norm control plasmid sample. The bar plot at the bottom of the figure shows the NMD efficiencies measured under the different test conditions. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test: \* $<0.05$ . All the results of this figure are representative of three experiments.



Supplemental Figure 2: Measurement of luciferase activity in HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells. These cells were transfected with an expression vector encoding firefly luciferase. Twenty-four hours after transfection, the cells were counted and 70,000 cells were plated in wells of a 96-well plate. Twenty-four hours after, the luciferase activity was measured with a luminometer after adding steadylite luciferase substrate (Perkin Elmer). n.s.: non-significant difference. Results of this figure come from independent triplicates.

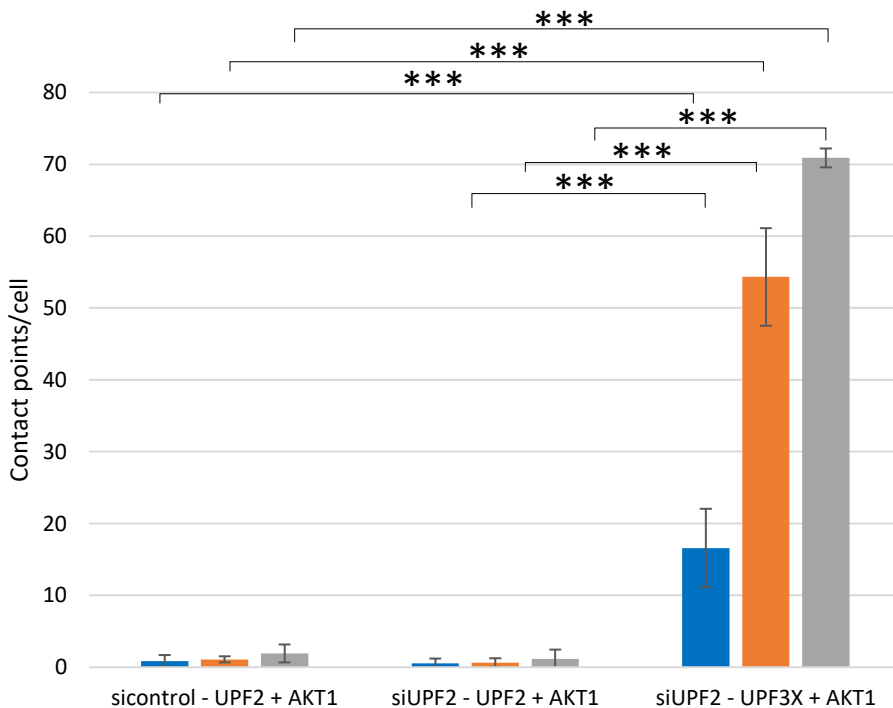
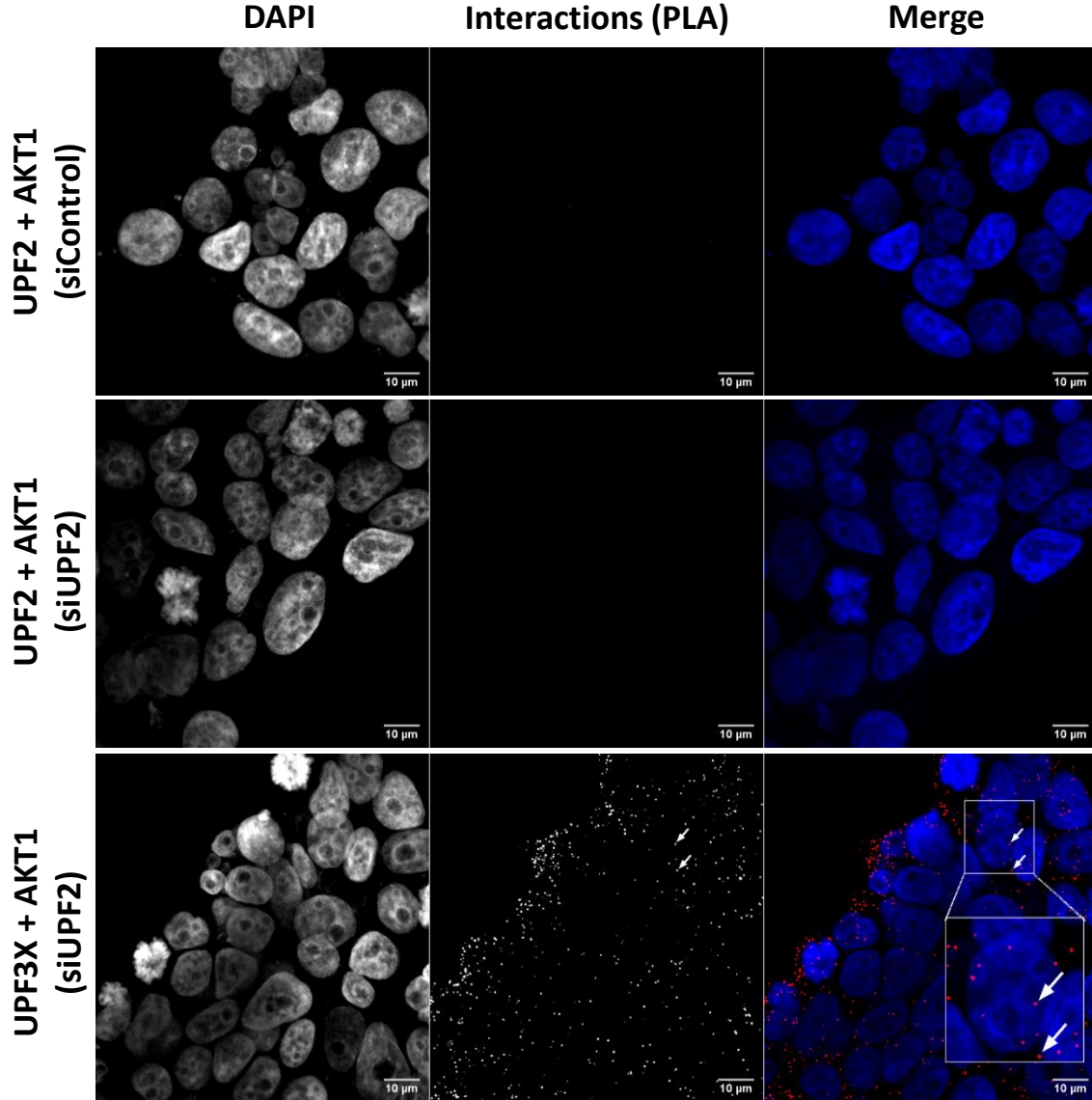


Supplemental Figure 3: AKT2 and AKT3 are not involved in NMD. (A) Evaluation of AKT2 and AKT3 downregulation by western blotting. HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells were transfected with an siRNA against AKT2 or AKT3 mRNA. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of HEK293FT whole cell extract. Importin 9 was used as a loading control. (B) NMD efficiency was measured by RT-PCR in HEK293FT WT and HEK293FT  $\Delta$ AKT1 cells transfected with a nonspecific (control), AKT2-targeting, or AKT3-targeting siRNA and with pmCMV-Globin Norm or pmCMV-Globin Ter. MUP mRNA was used as a loading and transfection control. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of the Globin Norm sample. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test: \* $<0.05$ . All the results of this figure are representative of four experiments.

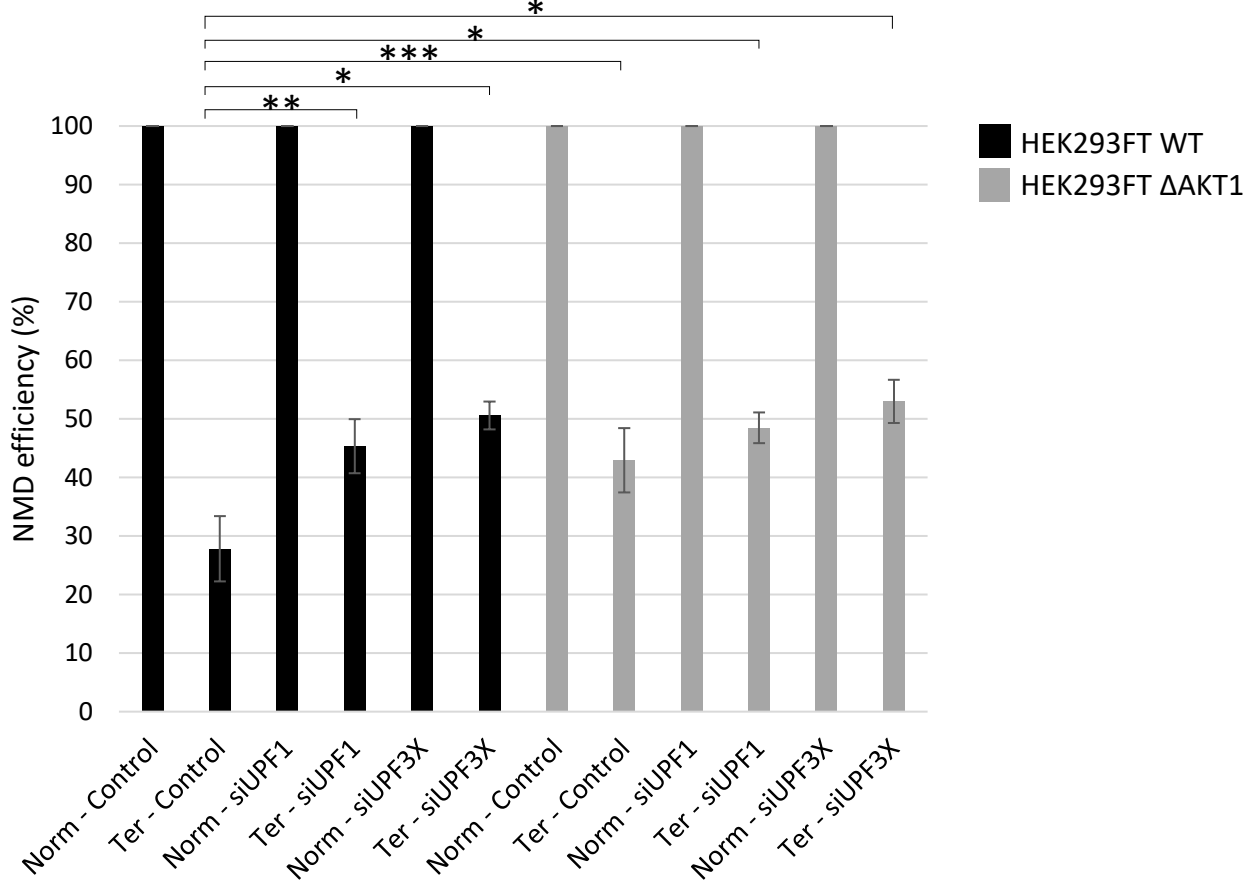
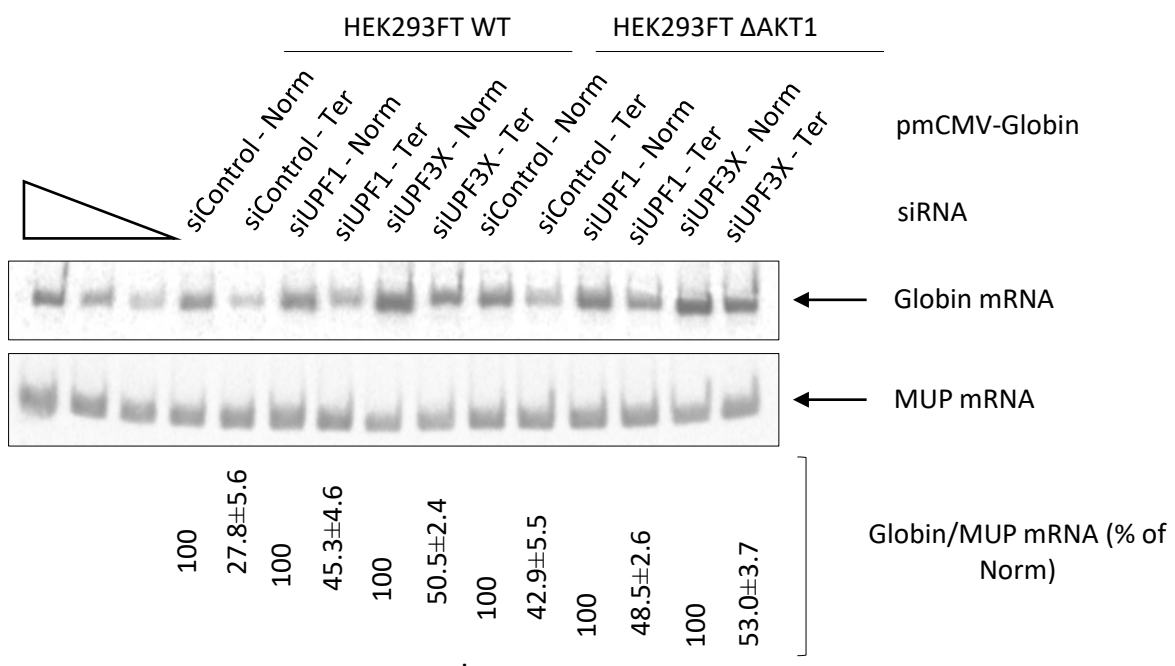
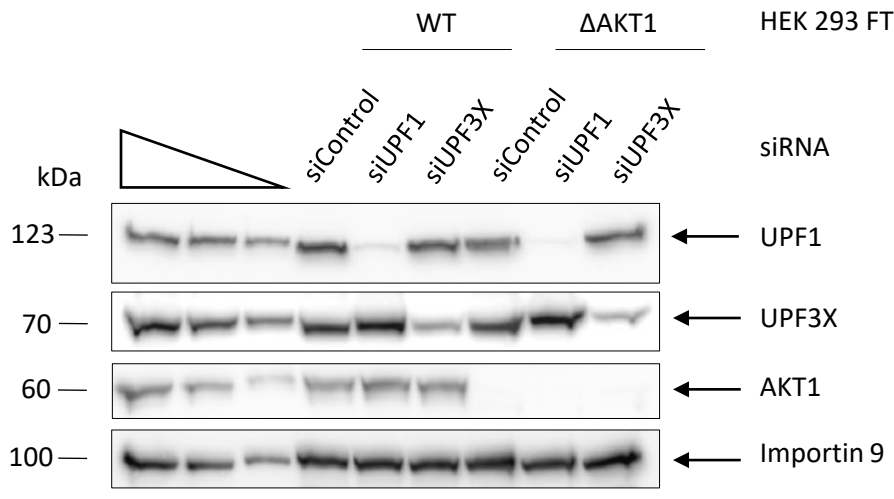


Supplemental Figure 4: Western blot analysis showing downregulation of UPF1 (upper panel), UPF2 (second panel from the top), UPF3X (third panel from the top), and SMG1 (lower panel) by targeting siRNAs in HEK293FT WT and HEK293FT ΔAKT1 cells. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of HEK293FT WT whole cell extract. Importin 9 was used as a loading control.





Supplemental Figure 5: UPF2 is not required for the interaction between UPF3X and AKT1. A proximity ligation assay was performed to assess interactions between AKT1 and UPF2 or UPF3X in the presence and absence of UPF2. White arrows indicate typical interaction points. White squares correspond to a magnification of the background image. The bar plot at the bottom of the figure shows for each condition the average number of interaction points per cell as determined on more than 200 cells for each condition. Error bar=S.D., p-values were calculated with Student's t-test: \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . All the results of this figure are representative of two experiments.



Supplemental Figure 6: Measure of NMD inhibition in HEK293FT WT and HEK293FT DAKT1 cells in the presence and absence of UPF1 or UPF3X. (Upper panel). Western blot showing downregulation of UPF1 or UPF3X after siRNA treatment of the cells and the level of AKT1 in both cell lines. The molecular weight of each protein is indicated on the left side of the gels. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of HEK293FT WT whole cell extract. Importin 9 was used as a loading control. (Middle and lower panels) RT-PCR analysis performed to measure the NMD efficiency in the presence of UPF1 and UPF3X and in the absence of one of these in both cell lines. The three leftmost lanes correspond to serial dilutions of the Globin Norm sample. Error bar= S.D., p-values were calculated with Student's t-test: \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ . All the results of this figure are representative of two experiments.

## Résultats complémentaires

### Impact de l'absence d'AKT1 sur la dégradation des substrats naturels du NMD

Le mécanisme du NMD ne cible pas uniquement les ARNm porteurs d'un codon stop prématuré (PTC). L'expression de certains gènes sauvages est régulée par le NMD et ces derniers sont appelés substrats naturels du NMD (Mendell et al., 2004).

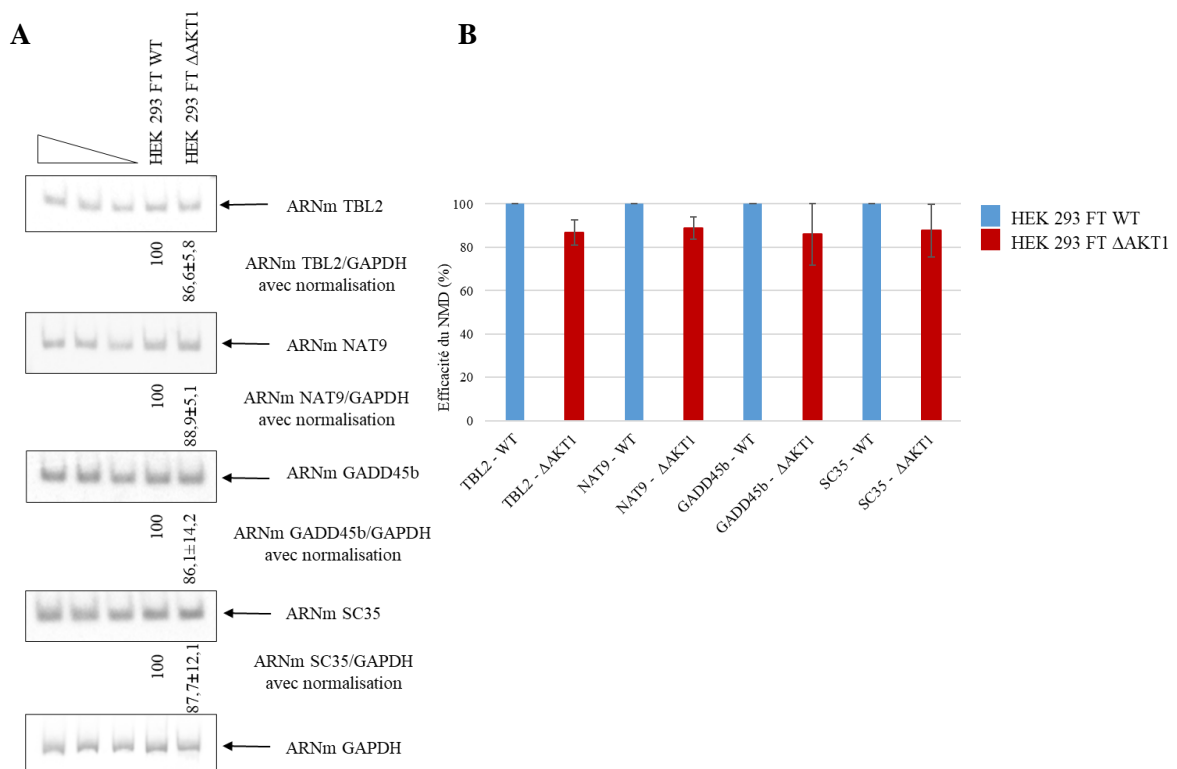


Figure 42 : L'impact de l'absence d'AKT1 sur la dégradation de substrats naturels du NMD. **A.** Mesure des niveaux d'expression d'ARNm substrats naturels du NMD dans les cellules HEK 293 FT sauvages et HEK293FT ΔAKT1 par RT-PCR. Les valeurs obtenues d'ARNm sont normalisées en utilisant l'ARNm de la GAPDH. Les trois premiers échantillons sur la gauche représentent une série de dilutions d'ARNm de cellules HEK 293 FT. **B.** Quantification de l'expression des ARNm soumis au NMD. Les résultats obtenus représentent trois expériences indépendantes. En bleu sont représentées les valeurs pour les cellules sauvages et en rouge celles pour les cellules ΔAKT1.

Afin d'étudier si la protéine AKT1 est impliquée dans la régulation de l'expression de certains substrats naturels du NMD et si son absence a un impact sur l'efficacité du NMD, nous avons mesuré l'expression de certains substrats naturels dans les cellules sauvages et dans les cellules invalidées du gène AKT1. Les substrats choisis ont été les ARNm codant pour les protéines TBL2, NAT9, GADD45b et SRSF2 (SC35) (Figure 42).

Les résultats obtenus ne montrent pas de différences significatives entre les cellules sauvages et les cellules n'exprimant plus AKT1. L'absence de la protéine AKT1 ne semble pas influencer la dégradation de ces substrats naturels, et indiquerait une possible spécificité de substrat dans le mécanisme du NMD. Néanmoins, il serait envisageable de prendre en considération d'autres substrats naturels afin de confirmer cette hypothèse.

### **La phosphorylation *in vitro* des facteurs du NMD par les isoformes d'AKT**

Afin de déterminer si la protéine AKT1 et les deux autres isoformes de AKT peuvent phosphoryler les facteurs du NMD, nous avons effectué un test de phosphorylation *in vitro* à l'aide du kit *ADP Glo Kinase Assay* (Promega) (Figure 43). Les protéines utilisées sont des protéines purifiées afin d'éviter toute contamination protéique pouvant modifier les résultats. L'activité de chaque isoforme d'AKT est vérifiée avec une région spécifique (modifiée ou non) du substrat GSK3, fourni dans le kit. Ces fragments de la protéine GSK3 sont optimisés afin de répondre au mieux à la phosphorylation par les isoformes d'AKT.

La protéine UPF1 HD-SQ correspond aux domaines hélicase (HD) et SQ de la protéine UPF1 (Fiorini et al., 2013). La condition AKT1/2/3 – blanc correspond à une réaction de phosphorylation sans substrat ou protéine. Les résultats de phosphorylation sur les protéines UPF montrent que les trois isoformes d'AKT sont capables de phosphoryler *in vitro* deux des trois facteurs du NMD, plus précisément UPF1 et UPF2. Au contraire, la protéine UPF3X n'est pas phosphorylée *in vitro* par aucune des trois isoformes d'AKT, ayant une luminescence émise similaire à la condition contrôle sans substrat.

La luminescence émise par la phosphorylation des protéines UPF1 et UPF2 est similaire pour les trois kinases, n'indiquant aucune spécificité d'isoforme. Il ne faut pas oublier que le test en question est un système clos, qui présente des résultats positifs uniquement dans certaines conditions. En effet, la réaction de phosphorylation *in vitro* est effectuée en absence de « contaminants » et des protéines purifiées sont utilisées. Néanmoins, dans les cellules, la présence d'autres protéines peut influencer l'interaction ou la phosphorylation des protéines. De plus, la présence des voies de signalisation et d'une régulation importante de chaque mécanisme biologique pourrait rendre spécifiques certaines interactions à cause par exemple d'une conformation tertiaire bien précise de chaque protéine en question. Il ne faut pas oublier que les trois isoformes sont exprimées et localisées différemment dans

les cellules, ce qui pourrait donner des résultats de phosphorylation différents. Les résultats obtenus doivent ainsi être validés.

Les expériences d'immunoprécipitations et de PLA que nous avons effectuées pour mon projet de thèse démontrent que la seule isoforme impliquée dans le NMD est AKT1 et qu'elle interagit uniquement avec UPF1 et UPF3X, en phosphorylant UPF1. Il est fondamental d'utiliser plusieurs approches afin de démontrer et valider une hypothèse puisque chaque expérience peut avoir des biais.

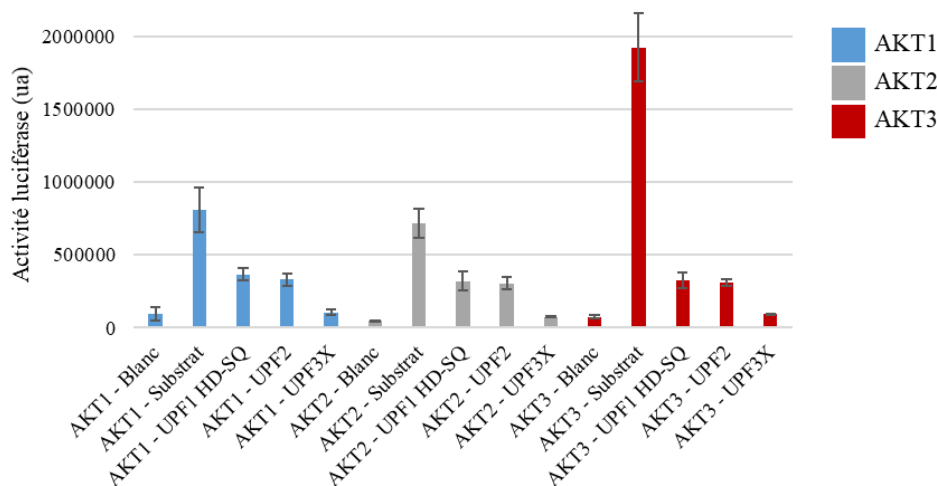


Figure 43 : Phosphorylation *in vitro* des protéines UPF par les isoformes d'AKT.

### Identification de la région pouvant être phosphorylée par AKT1

Après avoir effectué une étude sur la spécificité d'isoforme dans le mécanisme du NMD avec l'utilisation de siRNA dirigés contre les gènes AKT1, AKT2 et AKT3, les résultats ont indiqué que seulement l'isoforme AKT1 joue un rôle dans la dégradation des ARNm porteurs d'un PTC par le NMD. Ainsi, nous avons décidé de mettre de côté les isoformes AKT2 et AKT3 par la suite. Les résultats de phosphorylation *in vitro* présentés précédemment indiquaient que les trois isoformes étaient capables de phosphoryler les protéines UPF1 et UPF2 *in vitro*. Mais comme déjà énoncé, le système présente des biais qu'il faut prendre en considération, puisque seulement les protéines purifiées sont introduites. Dans les cellules, d'autres conditions sont présentes et influencent l'interaction et la phosphorylation des protéines.

Aujourd'hui, la majorité des sites de phosphorylation d'UPF1 par la kinase SMG1 a été déterminée, avec leur présence principalement localisée vers l'extrémité C-terminale. Le seul site identifié dans la partie N-terminale est la Thr28 (Matsuoka et al., 2007; Ohnishi et al., 2003; Okada-Katsuhata et al., 2012; Yamashita et al., 2001). Contrairement aux domaines CH et SQ, aucun site de phosphorylation d'UPF1 par SMG1 n'a été trouvé dans le domaine hélicase.

Afin de localiser la région qui présente probablement plus de sites de phosphorylation d'UPF1 par la protéine kinase AKT1, nous avons réalisé une expérience de phosphorylation *in vitro* en utilisant différents fragments de la protéine UPF1 (Figure 44B). Tout d'abord, la protéine UPF1-FL représente la protéine de taille sauvage (Figure 44A). La protéine UPF1-HD correspond au domaine hélicase de la protéine UPF1. La protéine UPF1 HD-SQ correspond aux domaines hélicase (HD) et SQ de la protéine UPF1, comprenant les deux domaines entiers (Fiorini et al., 2013). Puis la protéine UPF1 HD-SQ 967 représente la protéine avec son domaine hélicase et une partie du domaine SQ jusqu'au nucléotide 967 (Figure 44A). Malheureusement, nous n'avons pas eu la possibilité d'obtenir une protéine UPF1 composée uniquement du domaine CH en raison de la difficulté dans la production.

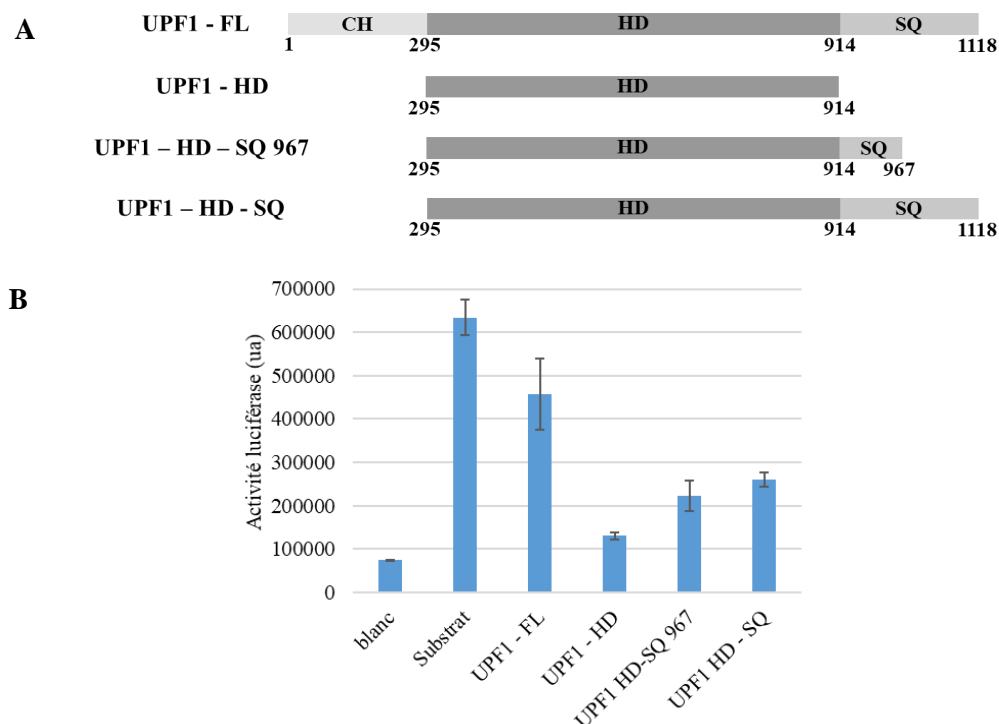


Figure 44 : Phosphorylation *in vitro* de différents fragments de la protéine UPF1 par AKT1. **A.** Représentation des protéines UPF1 utilisées pour la phosphorylation *in vitro*. Le domaine CH est un domaine en doigt de zinc riche en cystéines et histidines. Le domaine HD est le domaine hélicase d'UPF1. Le domaine SQ est un domaine riche en sérines-glutamines à l'extrémité C-terminale. **B.** Expérience de phosphorylation *in vitro* par le kit *ADP Glo Kinase Assay* (Promega) en utilisant l'isoforme AKT1.

Les résultats indiquent que la protéine AKT1 phosphoryle *in vitro* la protéine UPF1 de taille sauvage avec une luminescence émise très élevée par rapport aux contrôles. En revanche, la protéine UPF1 possédant uniquement le domaine hélicase n'est pas phosphorylée puisque la luminescence est proche de la condition contrôle sans substrat. Cela nous indique que le domaine hélicase n'est pas phosphorylé par les deux kinases SMG1 et AKT1.

Les deux derniers fragments présentent le domaine hélicase et le domaine SQ avec une taille différente. En effet, le premier fragment est délété des derniers acides aminés de la protéine UPF1, alors que le deuxième fragment possède le domaine SQ entier. Les deux fragments en question sont phosphorylés *in vitro* par la kinase AKT1. Il n'y a pas de différence significative entre la phosphorylation des deux fragments composés des domaines HD et SQ, indiquant que les éventuels sites de phosphorylation sont localisés entre le nucléotide 914 et le nucléotide 967.

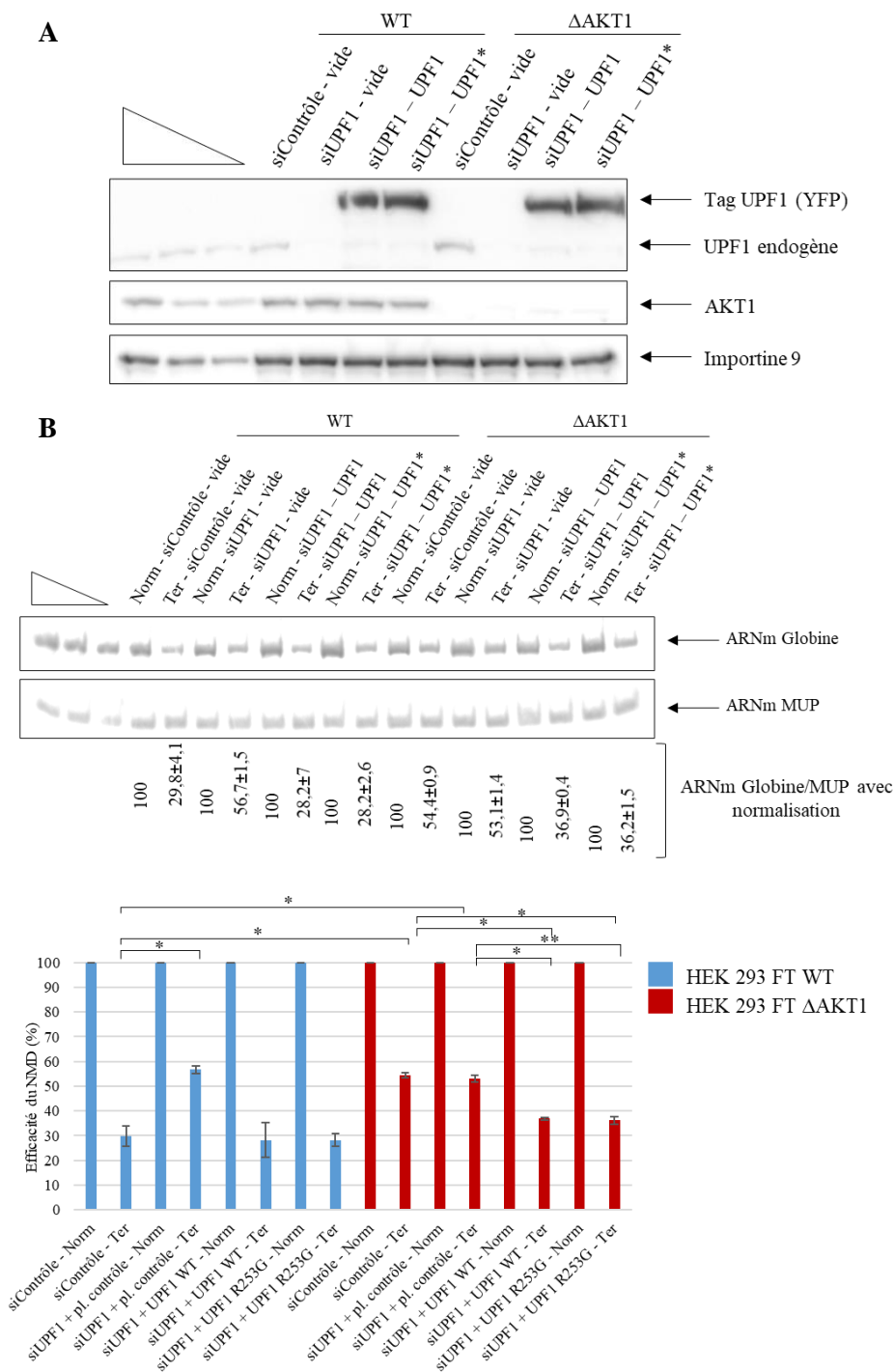
En comparant les fragments composés des domaines HD et SQ avec la protéine UPF1 de taille sauvage, nous pouvons voir que la différence de phosphorylation correspond probablement à la phosphorylation de l'extrémité N-terminale d'UPF1. Il est donc possible que la majorité des sites de phosphorylation d'UPF1 par AKT1 est située vers l'extrémité N-terminale de la protéine.

### **Impact de la mutation R253G d'UPF1 sur l'efficacité du NMD**

Les études des cibles d'AKT1 ont mis en évidence l'identification d'une séquence consensus, reconnue par la protéine AKT1. Cette séquence possède le motif R-X-R-X-X-S/T (Hornbeck et al., 2004; Obata et al., 2000; Rena et al., 1999; Vitari et al., 2004). Nous avons recherché cette séquence dans la protéine UPF1 et nous avons pu l'identifier dans la partie N-terminale en position 253. La thréonine qui pourrait être phosphorylée par UPF1 se situe en position 258. Afin d'évaluer si effectivement la phosphorylation a lieu sur ce site en question, la mutation R253G a été insérée par mutagenèse dirigée afin de détruire le site consensus.

Nous avons ensuite transfectées les cellules sauvages et celles n'exprimant plus la protéine AKT1 avec le vecteur codant la protéine UPF1 sauvage et le vecteur codant la version mutée de la protéine (*Figure 45*). Nous avons aussi décidé d'utiliser un siRNA dirigé contre le gène UPF1 dans certaines conditions afin de pouvoir avoir l'effet uniquement en fonction de la protéine exogène et non endogène. Après les résultats de Western Blot qui confirment une expression de la protéine UPF1 sauvage et mutée, nous avons réalisé une expérience de RT-PCR afin de voir l'impact de ces deux protéines sur l'efficacité du NMD.





**Figure 45 : Impact de la mutation R253G sur l'efficacité du NMD.** **A.** Western Blot avec l'expression protéique de la protéine UPF1 endogène et exogène, et des protéines AKT1 et importine 9 dans les deux lignées cellulaires. **B.** Mesure des niveaux d'expression de l'ARNm de la Globine dans les cellules HEK 293 FT sauvages et HEK293FT ΔAKT1 par RT-PCR. Les valeurs obtenues d'ARNm sont normalisées en utilisant l'ARNm de MUP. Les trois premiers échantillons sur la gauche représentent une série de dilutions d'ARNm de cellules HEK 293 FT. Quantification de l'expression des ARNm soumis au NMD. Les résultats obtenus représentent deux expériences indépendantes.

La mutation du site en question n'affecte pas le NMD qui reste actif en présence d'AKT1 et inhibé en absence d'AKT1. En effet, d'un côté l'invalidation du gène UPF1 entraîne une inhibition du NMD, ce qui était aussi attendu pour la version mutée de la protéine, ce qui nous aurait indiqué une implication de ce site de phosphorylation. En revanche, l'efficacité du NMD ne présente aucune modification par rapport à la protéine UPF1 de taille sauvage, probablement car cette séquence ne représente pas le site de phosphorylation d'UPF1 par AKT1. Cela n'est pas si étonnant si l'on considère que de nombreuses cibles interagissent et sont phosphorylées par AKT1 mais ne présentent pas de séquence consensus. Aujourd'hui, il n'y a pas encore d'explication à cela, si la conformation tertiaire des protéines peut avoir une influence sur cette interaction ou s'il existe une autre raison (Hornbeck et al., 2004; Obata et al., 2000; Rena et al., 1999; Vitari et al., 2004).

### **Localisation des facteurs du NMD**

Une approche pour confirmer l'éventuelle interaction entre AKT1 et les protéines du NMD est d'observer la localisation cellulaire de ces facteurs par microscopie. La première étude a été celle d'étudier la localisation cellulaire des trois facteurs du NMD, UPF1, UPF2 et UPF3X en présence et en absence de la protéine AKT1.

Différentes équipes mais aussi certains de nos travaux ont montré que les facteurs du NMD ainsi que les substrats du NMD transitent par des foyers cytoplasmiques appelés *P-bodies* (Cougot et al., 2004; Durand et al., 2007). La fonction de ces derniers n'est pas encore élucidée mais deux hypothèses sont proposées, comme déjà évoqué dans l'introduction. La première hypothèse est que les *P-bodies* représenteraient un lieu de stockage des protéines impliquées dans le NMD et des ARNm soumis au NMD. La seconde hypothèse soutient le contraire, plus précisément que les *P-bodies* seraient le lieu où le NMD est opérationnel.

Afin d'analyser l'impact de la présence ou de l'absence d'AKT1 sur la localisation cellulaire des facteurs du NMD, les deux lignées cellulaires ont été transfectées avec un vecteur d'expression codant l'une des protéines UPF couplée à la *Yellow Fluorescent Protein* (YFP). La protéine DCP1a (en rouge) est un marqueur des *P-Bodies*. Un microscope à fluorescence possédant un module Apotome de Zeiss a été utilisé (*Figure 46*).

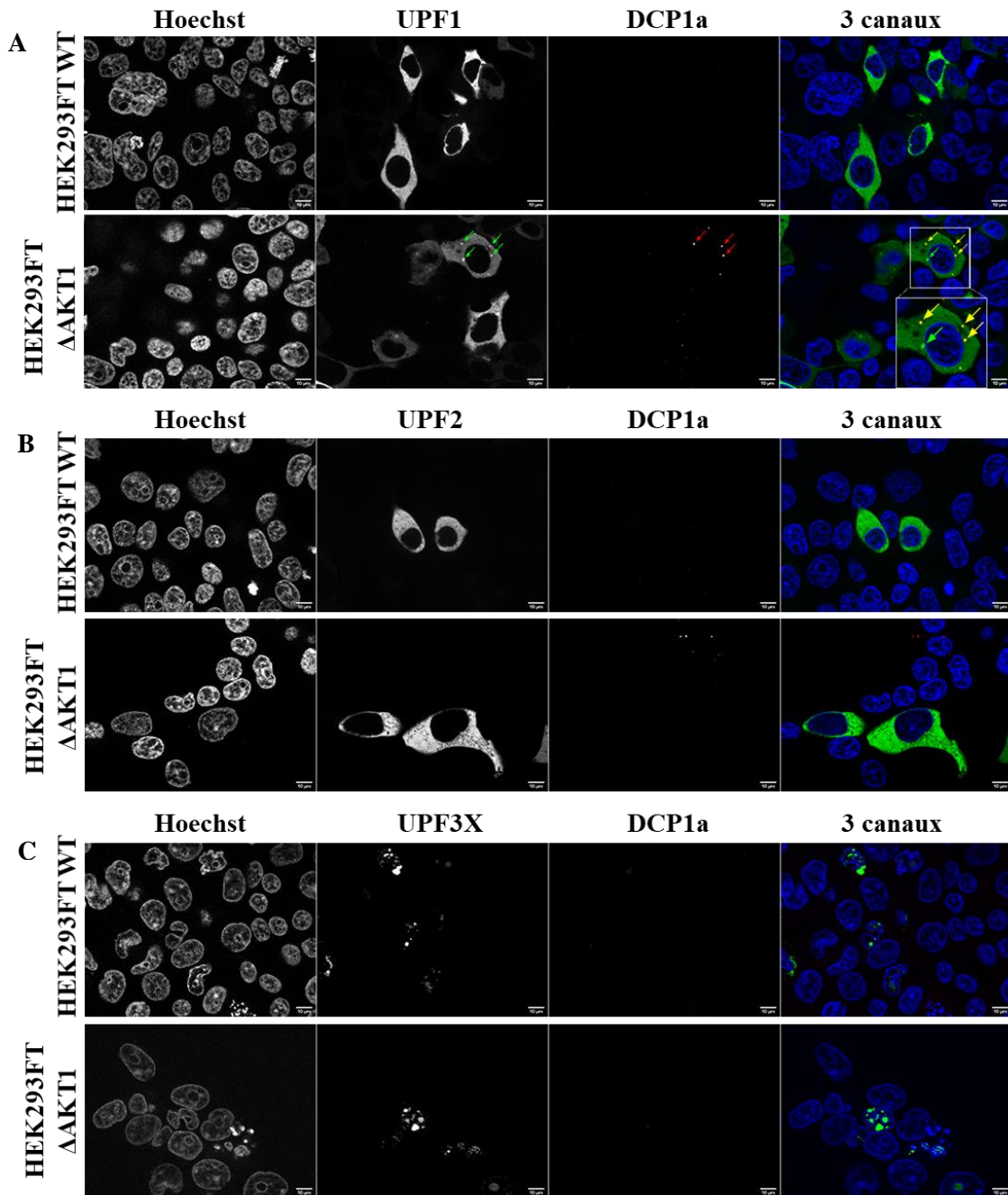


Figure 46 : Localisation des facteurs du NMD dans les deux lignées cellulaires. **A.** Localisation cellulaire de la protéine UPF1 en présence et en absence d'AKT1. Les noyaux ont été marqués en utilisant le Hoechst 33342 (bleu). La protéine UPF1 est couplée à la protéine YFP (en vert). En rouge, nous pouvons voir la détection de la protéine DCP1a utilisée comme marqueur des *P-Bodies*. **B.** Localisation cellulaire de la protéine UPF2 en présence et absence de AKT1. En vert, on peut voir la protéine UPF2 et en rouge le marqueur des *P-bodies*. La protéine UPF2 est cytoplasmique. **C.** Localisation de la protéine UPF3X en vert et des *P-bodies* en rouge. La protéine UPF3X est nucléaire.

La localisation de la protéine UPF1 dans les cellules sauvages est majoritairement cytoplasmique, comme décrit dans la littérature (Lykke-Andersen et al., 2000), alors que pour les cellules où AKT1 est absente, la protéine UPF1 se concentre dans des foyers cytoplasmiques pouvant être des granules de stress, des *P-bodies* ou d'autres foyers cytoplasmiques (Cougot et al., 2004; Durand et al., 2007; Jia et al., 2017). Cependant, la co-localisation de la fluorescence verte et rouge nous indiquent que certains de ces foyers cytoplasmiques correspondent aux *P-bodies*.

Les protéines UPF2 et UPF3X ne montrent pas de différence de localisation dans les deux lignées cellulaires.

### La dégradation des ARNm par NMD est située dans le cytoplasme

Les interactions protéiques entre les protéines AKT1, UPF1 et UPF3X ont été confirmés par la technique de microscopie *Proximity Ligation Assay* (PLA). Cette technique permet de détecter au moyen d'un signal de fluorescence amplifié, des protéines qui se situent dans la cellule à moins de 40 nm. Avec l'utilisation de deux anticorps primaires qui reconnaissent les deux protéines d'intérêt, deux autres anticorps secondaires spécifiques sont utilisés, possédant des caractéristiques particulières. En effet, ces anticorps possèdent chacun un brin d'ADN lié, et si les protéines en question sont assez proches l'une de l'autre, les deux brins vont pouvoir interagir entre eux. La ligation et l'amplification de cet ADN donnera un signal fluorescent, révélant ainsi une interaction entre les deux partenaires.

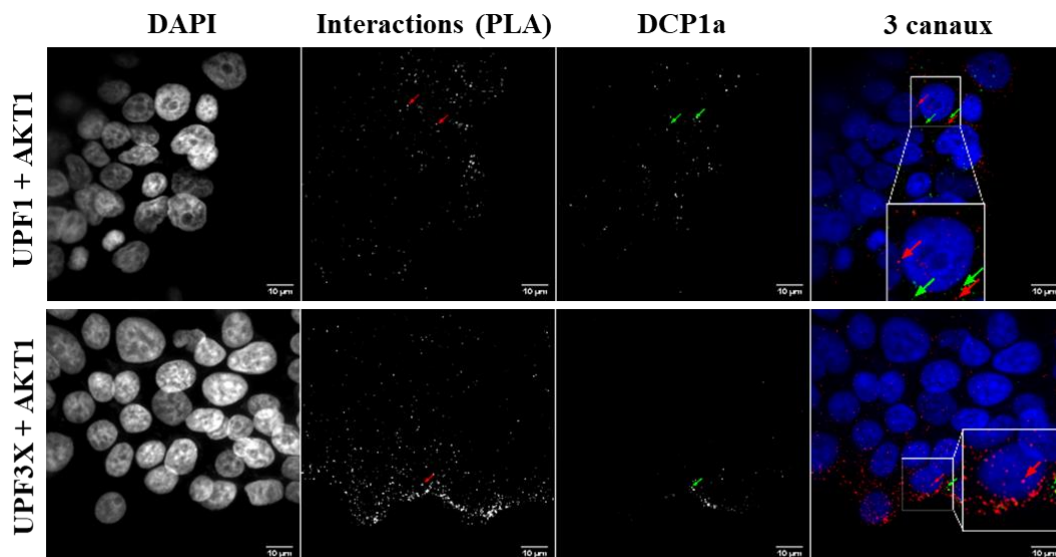


Figure 47 : Interactions entre les protéines AKT1, UPF1 et UPF3X dans le cytoplasme. Les interactions protéiques sont visibles par *Proximity Ligation Assay* (PLA) avec l'apparition de spots rouges. Les *P-bodies* sont visibles avec la fluorescence verte. Les images ont été prises avec le Spinning Disk (Live SR).

Après l'identification des interactions protéiques, nous avons regardé la localisation de celles-ci. Pour cela, nous avons utilisé le marqueur des *P-bodies* afin de déterminer si les interactions entre AKT1 et

les deux facteurs du NMD UPF1 et UPF3X sont effectuées dans les *P-bodies*. Les résultats ne montrent aucune co-localisation du signal de fluorescence, indiquant que les interactions protéiques sont cytoplasmiques et ne sont pas dépendantes des *P-bodies* (Figure 47).

## **Matériels et Méthodes**

### Culture cellulaire

Les cellules HEK293FT sont cultivées dans un milieu DMEM + Glutamax (Gibco), 10% de Sérum non décomplémenté, 1% de Zell Shield, à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cellules HEK293FT  $\Delta$ AKT1 invalidées du gène AKT1 ont été obtenues à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 en utilisant le plasmide pLentiV2- CRISPR- porteur de la séquence d'un ARN guide dirigé contre AKT1 (5'-CACCGCCCGCGCACGCTTGGTCCCG-3'). Les cellules ont été sélectionnées en utilisant l'antibiotique puromycine à une concentration de 3  $\mu$ g/ml (InvivoGen).

### Transfection des cellules HEK293FT

Les cellules ont été transfectées en utilisant le réactif Jet Optimus (Polyplus Transfection Ref : 117-01) selon le protocole fourni par le fabricant, pour la transfection de l'expérience de microscopie. En revanche, la transfection des siRNA a été faite en utilisant l'IcaFectine 442 (In-Cell-Art).

### Extraction protéique et Western Blot

Les extraits protéiques pour l'expérience avec le plasmide UPF1 muté ont été préparés en utilisant un tampon de lyse composé de 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 20 mM EDTA pH 8 et 5% de SDS. Les échantillons ont subi 30 pulsations de sonication (Branson Digital Sonifier/amplitude 20%).

Les anticorps qui ont été utilisés sont : l'anticorps anti-AKT1 (Cell Signaling #2938) dilué 1/1000<sup>e</sup>, l'anticorps anti-UPF1 (Abcam ab 86057) dilué 1/5000<sup>e</sup>, l'anticorps anti-importine 9 (Abcam ab 52605) dilué 1/1000<sup>e</sup>.

### RT-PCR quantitative

Les ADNc ont été amplifiés par PCR radioactive en ajoutant le nucléotide radioactif dCTP (<sup>33</sup>P en position  $\alpha$ ). Les séquences des oligonucléotides utilisés sont : MUP (sens 5'-CTGATGGGGCTCTATG-3' ; anti-sens 5'-TCCTGGTGAGAAGTCTCC-3'), Globine (sens 5'-GGACGAGCTGTACAAGTATC-3' ; anti-sens 5'-GGGTTTAGTGGTACTTGTGAGC-3'), GAPDH (sens 5'- CATTGACCTCAACTACATGG-3'; anti-sens 5'-GCCATGCCAGTGAGCTTCC-3'), SC35 (ou SRSF2, sens 5'- CCTCTTAAGAAAATGCTGCGGTCTC-3'; anti-sens 5'-ATCAGCCAAATCAGTTAAAATCTGC-3'), NAT9 (sens 5'- ATGTGTGCTGGATGCCGAGA-3'; anti-sens 5'-ACCTAGCGTGGTCACTCCGTA-3'), TBL2 (sens 5'- GCAGTCATTTACCACATGC-3';

anti-sens 5'-TATTGTTTCTGCTTCTTGGAT-3'), et GADD45 (sens 5'-GAGTGAGACTGACTGCAAGC-3' ; anti-sens 5'-TCTTATTAATTCGCAAACCTGG-3').

#### Phosphorylation *in vitro*

La phosphorylation *in vitro* a été effectuée en utilisant le kit ADP-Glo Kinase Assay (Promega; V6930), et les kits enzymatiques AKT1 Kinase Enzyme System (V1911), AKT2 Kinase Enzyme System (V3861) et AKT3 Kinase Enzyme System (V4010).

Les protéines purifiées d'UPF1 ainsi que la protéine UPF2 nous ont été gentiment offertes par Hervé Le Hir. La protéine UPF3X a été achetée chez CliniSciences (Recombinant Human Regulator of Nonsense Transcripts 3B - E. Coli; CSB-EP883646HU).

Des plaques Costar 96 Half Area blanches ont été utilisées pour la phosphorylation *in vitro*.

#### Expérience d'immunofluorescence

Les cellules HEK293FT WT et  $\Delta$ AKT1 ont été transfectées avec 100 ng de vecteurs exprimant les protéines UPF1, UPF2 et UPF3X fusionnées à la protéine fluorescente YFP. Après la fixation des cellules avec 10% de formaline (Sigma-Aldrich), les cellules ont été perméabilisées en utilisant de l'éthanol 70% pendant 1h à 4°C. Les cellules fixées ont été laissées en incubation pendant 1h à 4°C avec l'anticorps anti-DCP1a (Sigma-Aldrich, D5444, dilution 1:1000). Les anticorps secondaires utilisés sont Alexa Fluor 568 (Invitrogen) et Alexa Fluor 488 (Invitrogen), laissés en incubation pendant 1h à 4°C. Le Hoechst 33342 permet la visualisation des noyaux. Les lamelles ont été montées en utilisant le liquide de montage Vectashield (Eurobio). Les observations microscopiques pour la localisation des facteurs du NMD ont été réalisées à l'aide d'un microscope à fluorescence possédant un module Apotome (ZEISS AxioImager Z1 ApoTome Microscope). Les photos ont été prises en utilisant l'objectif 63x.

#### Proximity Ligation Assay (PLA)

La Proximity Ligation Assay a été effectuée avec le kit de chez Sigma - Duolink<sup>TM</sup> In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit (Ref: DUO92102) avec  $\lambda_{ex}$  554 nm;  $\lambda_{em}$  576 nm (Cyanine 3; Zeiss Filter set 20). Des lames particulières ont été utilisées, Lames Labtek avec 8 chambres amovibles (Nunc<sup>TM</sup> Lab-Tek II Chamber Slide, Thermo Scientific Nunc, Référence: 154534). Le protocole utilisé a été celui fourni avec le kit Sigma.

Les anticorps utilisés sont l'anticorps anti-UPF1 rabbit (Abcam 86057; dilution 1/250e), l'anticorps anti-UPF3X rabbit (Abcam 134566; dilution 1/250e), l'anticorps anti-AKT1 mouse (Santa Cruz sc-271149; dilution 1/50e). L'acquisition des photos a été effectuée avec le Spinning Disk- Live SR microscope (Ti2 Nikon - Spinning Disk Yokogawa CSUW1 - Gataca) avec le programme Metamorph. Les images ont été prises en utilisant différentes longueurs d'onde (excitation : 405, 561, et 488 nm; émission :

450/50, 525/50 and 595/50). Le module SR a été utilisé afin d'améliorer la résolution. L'observation a été faite avec l'objectif 60x oil (Nikon Plan Apo 60x NA 1.4).

## **Discussion et perspectives**



Le mécanisme du NMD est un système de surveillance contrôlant la qualité des ARNm. Après les étapes de transcription et de maturation de l'ARN, le NMD repère la présence d'un PTC pouvant donner lieu à la synthèse d'une protéine tronquée, qui si produite, pourrait garder une partie ou la totalité de sa fonctionnalité, être non fonctionnelle ou bien devenir délétère pour la cellule (Popp and Maquat, 2014).

Différentes pathologies voient la présence d'ARNm porteurs d'un PTC telles que des maladies métaboliques, des pathologies génétiques comme la mucoviscidose ou la dystrophie musculaire de Duchenne, ou bien certaines formes de cancer (Khajavi et al., 2006; Miller and Pearce, 2014).

Son implication n'est pas seulement observée lors d'événements pathologiques mais le NMD est aussi lié à des événements physiologiques tels que la régulation de l'expression de certains gènes, considérés comme substrats naturels du NMD (Mendell et al., 2004; Neu-Yilik et al., 2004).

Mon projet de thèse a pour finalité d'étudier le NMD et les protéines impliquées dans le mécanisme afin d'incrémenter nos connaissances sur le sujet, et comprendre au mieux tous les paramètres pouvant influencer l'activation et la régulation du NMD. Avec un système de criblage particulier, nous avons réussi à identifier une potentielle protéine kinase jouant un rôle dans le NMD. Les résultats obtenus avec notre étude prouvent l'implication d'une deuxième kinase, après la protéine kinase SMG1, capable d'interagir avec deux facteurs du NMD, les protéines UPF1 et UPF3X. Il a été démontré dans mon projet de thèse qu'AKT1 phosphoryle uniquement la protéine UPF1 bien qu'elle interagisse aussi avec UPF3X. Les sites de phosphorylation d'UPF1 par AKT1 représentent une prochaine étape du projet. De plus, nous avons pu observer une spécificité d'isoforme dans le mécanisme du NMD mais aussi des ARNm qui sont dégradés par le NMD. J'ai recherché si ces deux kinases, AKT1 et SMG1, agissent de concert ou si leur action est totalement indépendante. Enfin, nous nous sommes intéressés à la mutation d'AKT1 E17K, retrouvée dans certaines formes de cancer, en regardant son impact sur le NMD.

Les résultats fournis dans mon projet de thèse ont ouvert la voie à différentes questions qui trouveront probablement des réponses dans les années à venir. En effet, étant donné l'implication d'AKT1 dans le NMD, nous pouvons nous demander par exemple si la modulation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR peut avoir un effet sur le NMD, ou bien la raison de cette spécificité d'isoforme d'AKT dans le NMD, ou son activité de kinase par rapport à SMG1. Cette série de question peut se focaliser sur des événements physiologiques mais aussi pathologiques puisque la protéine AKT1 est souvent retrouvée mutée dans les cancers. Parmi toutes les hypothèses que nous pouvons émettre, une des finalités et perspectives est bien évidemment une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires non seulement du NMD mais aussi de la voie PI3K/AKT/mTOR afin de pouvoir les appliquer en clinique avec le développement de thérapies ciblées en adéquation avec le génotype des patients.

## **Un lien entre la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR et le mécanisme du NMD**

Le système de criblage que nous avons utilisé a permis d'obtenir une première piste sur l'implication d'AKT1 dans le mécanisme du NMD et de tracer un fil conducteur pour l'avancement du projet. Les résultats obtenus par la suite n'ont fait que confirmer l'implication d'une nouvelle kinase dans le NMD en démontrant la présence d'un lien direct entre le NMD et la protéine AKT1.

L'implication indirecte de la protéine AKT1 dans le mécanisme du NMD avait déjà été suggérée en 2016 par Park et ses collègues (S. A. Park et al., 2016). En effet, nous savons que l'activation du NMD est dépendante de la traduction (Carter et al., 1995; Thermann, 1998). L'étude de Park a montré que l'activation de la voie de signalisation PI3K par l'insuline conduit à une augmentation de l'événement de traduction gouverné par la protéine mTORC1 et par les protéines situées en aval telles que 4E-BP et eIF4E (S. A. Park et al., 2016). La présence de la protéine CBP80 et l'absence de eIF4E dans nos immunoprécipitations confirment bien le lien entre la traduction, la protéine AKT1 et le NMD mais indiquent aussi qu'AKT1 agit de façon directe sur le mécanisme du NMD.

A partir de ces résultats, une première série de questions peut venir à l'esprit. En effet, nous n'avons pas eu le temps d'explorer la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR mais nous nous sommes concentrés uniquement sur l'activité d'AKT1 lors de la dégradation par NMD. Néanmoins, nous pouvons nous demander si AKT1 représente la seule protéine de la voie PI3K permettant une régulation du NMD, avec une activation indépendante de la voie PI3K, ou si la voie de signalisation peut intervenir lors de la dégradation des ARNm porteurs de PTC. Concernant l'implication d'autres protéines de la même voie de signalisation dans le mécanisme du NMD, nous pourrions rechercher la présence des protéines PI3K ou mTOR dans les immunoprécipitations, ce qui pourrait nous dire si effectivement, la protéine AKT1 est la seule kinase de la voie de signalisation à permettre l'activation du NMD. Cependant, cela reste une hypothèse pas très convaincante et assez improbable puisque nous aurions retrouvé dans le système de criblage des inhibiteurs des protéines PI3K ou mTOR pouvant entraîner une inhibition du NMD et cela n'a pas été le cas. Toutefois, il ne faut pas exclure un éventuel effet de l'activation de la voie de signalisation sur le NMD, qui pourrait être causé par l'activation de la kinase AKT1 en particulier plutôt que des actions directes des autres protéines de la voie en question.

Afin d'étudier l'impact de la voie de signalisation PI3K sur le NMD, il serait intéressant par exemple d'activer la voie de signalisation avec l'utilisation de différents ligands tels que l'insuline ou l'EGF, spécifiques à l'isoforme AKT1. Selon les résultats déjà obtenus qui nous indiquent que l'efficacité du NMD est corrélée au niveau d'expression des facteurs du NMD mais aussi de la protéine AKT1, nous pouvons supposer qu'une activation de la voie PI3K conduirait à une dégradation plus importante des ARNm porteurs de PTC. Nous ignorons à l'heure actuelle, si l'effet sur le NMD est propre au ligand même s'il est spécifique à l'isoforme d'AKT1. L'activation ou l'inhibition de la voie PI3K/AKT/mTOR représente une étape à envisager dans l'étude du lien entre le NMD et cette voie de signalisation. Cette

approche nous permettrait d'être le plus possible dans les conditions que l'on retrouve *in vivo*, avec un ample « réseau » composé de voies de signalisation qui peuvent être connectées entre elles.

Il est aussi possible qu'AKT1 puisse intervenir indépendamment de la voie PI3K à l'instar d'UPF1 qui est impliquée dans des événements autre que le NMD, comme la dégradation par *Staufen-mediated mRNA decay*, la dégradation des ARNm des histones, ou la régulation du cycle cellulaire (Azzalin and Lingner, 2006a, 2006b; Jia et al., 2015; Kim and Maquat, 2019; Popp and Maquat, 2015a). L'étude de l'impact de la voie PI3K activée sur le NMD nous donnera les réponses à nos questions.

### **Un modèle d'activation du NMD : des cibles spécifiques**

Mon projet de thèse a mis en évidence les interactions qui peuvent apparaître lors de l'activation du mécanisme du NMD. En utilisant plusieurs approches, nous avons démontré que la protéine AKT1 interagit avec deux protéines du NMD, notamment les protéines UPF1 et UPF3X, et qu'elle n'est capable de phosphoryler que la protéine UPF1. La protéine UPF2 ne semble pas interagir avec AKT1, contrairement à la protéine SMG1 qui a la capacité d'interagir avec les trois facteurs du NMD mais de ne phosphoryler qu'UPF1 et UPF2 (Clerici et al., 2014; Yamashita, 2013).

Nous pouvons nous poser la question du rôle de la protéine UPF2 dans ce cas de figure, c'est-à-dire le NMD où AKT1 joue un rôle. Généralement, la protéine UPF2 est recrutée sur l'ARNm après l'export de ce dernier où la protéine UPF3X ainsi que l'EJC ont déjà été déposés dans le noyau après la maturation de l'ARN. La protéine AKT1 qui interagit avec UPF3X et UPF1 serait ainsi à proximité de la protéine UPF2 et serait donc visible dans les différentes approches que nous avons utilisées en raison de la distance assez courte entre les protéines. D'après les résultats obtenus, ceci n'est pas le cas. Une explication possible peut être que l'activation du NMD par AKT1 est indépendante de la protéine UPF2. L'étude de Aznarez et ses collègues ont par exemple démontré que la protéine d'épissage SRSF1 induit l'activation du mécanisme de NMD après son association sur la séquence d'ARNm et le recrutement du facteur UPF1, mais que les étapes généralement nécessaires dans l'activation canonique de la dégradation par NMD ne sont pas toutes présentes (Aznarez et al., 2018). Dans ce cas de figure, une des protéines qui ne voyait plus son recrutement et son intervention est la protéine UPF2. Il serait très intéressant de voir si dans le cas de l'activation du NMD par AKT1, UPF2 interviendrait ou pas dans le processus de dégradation, par exemple dans le recrutement des protéines SMG8, SMG9 ou UPF1 et peut-être de la kinase AKT1, en ne formant plus le complexe SURF composé notamment de SMG1 mais un autre complexe avec AKT1. Afin de démontrer cela, il serait possible d'envisager des expériences d'inactivation du gène UPF2 par siRNA, comme celles que nous avons entreprises avec les gènes UPF1 et UPF3X mais il faudrait prendre en considération un paramètre important. Dans cette étude, il faudrait comparer l'inactivation de la protéine UPF2 seule et en combinaison avec l'inactivation de SMG1. En

effet, on peut s'attendre à ce que l'inactivation seule d'UPF2 provoque une inhibition du NMD similaire à la combinaison des deux inactivations.

Une autre question qui peut nous venir à l'esprit après cette réflexion est, si l'on considère que la voie canonique du NMD n'est pas tout à fait identique, est-ce que le complexe EJC aurait sa place dans le nouveau modèle et est-ce qu'AKT1 pourrait interagir avec l'EJC. Nous ne nous sommes pas penchés sur cet aspect puisque nous ne sommes pas partis sur une hypothèse dans laquelle il y aurait une possible modification de la voie d'activation du NMD. Toutefois, cette hypothèse semble raisonnable car le fait de faire entrer une nouvelle kinase dans le mécanisme de NMD induit des changements dans le modèle établi jusqu'alors et il serait intéressant de la tester.

Nos résultats ont aussi laissé suggérer un ordre bien précis des interactions. En effet, l'absence d'expression de la protéine UPF3X a un effet négatif sur les interactions entre UPF1 et AKT1 qui ne sont plus visibles. Au contraire, l'absence de la protéine UPF1 n'induit pas de modifications dans les interactions protéiques entre UPF3X et la kinase AKT1. Comme évoqué dans l'introduction, la protéine UPF3X est une protéine nucléaire qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme. Elle représente le premier facteur du NMD qui se dépose sur l'ARNm après sa maturation dans le noyau et avant l'export vers le cytoplasme (Le Hir et al., 2001). Après l'export de la mRNP, la protéine UPF1 est recrutée afin de permettre l'activation du NMD. Notre hypothèse serait donc que la protéine AKT1 serait recrutée sur l'ARNm dans le noyau par la protéine UPF3X. Après l'export de l'ARNm dans le cytoplasme, AKT1 pourrait interagir avec UPF1 une fois que cette dernière est recrutée sur la mRNP. Il est possible qu'uniquement à cet instant, la protéine AKT1 phosphoryle UPF1. Le rôle d'UPF3X qui n'est pas une phosphoprotéine pourrait avoir surtout le rôle de recruteur d'AKT1 et d'UPF1, comme une plateforme pour ces deux protéines (*Figure 48*).

Les interactions protéiques ainsi que la réaction du NMD ont lieu dans le cytoplasme, indépendamment des *P-bodies*. En effet, si d'un côté il a été démontré par des équipes que la dégradation a lieu dans ces foyers cytoplasmiques chez des organismes spécifiques tels que la levure, de l'autre côté, d'autres équipes soutiennent que les *P-bodies* pourraient servir comme lieu de stockage des protéines (Kulkarni et al., 2010; Parker and Sheth, 2007; Sheth and Parker, 2006). Les résultats obtenus n'indiquent pas le rôle des *P-bodies* puisque les seules informations que nous pouvons en déduire sont que les interactions entre AKT1 et les deux facteurs du NMD se forment dans le cytoplasme et pas forcément dans ces foyers cytoplasmiques. En effet, même si les interactions protéiques ont lieu, nous ne pouvons dire si la dégradation des ARNm par le NMD est activée ou pas.

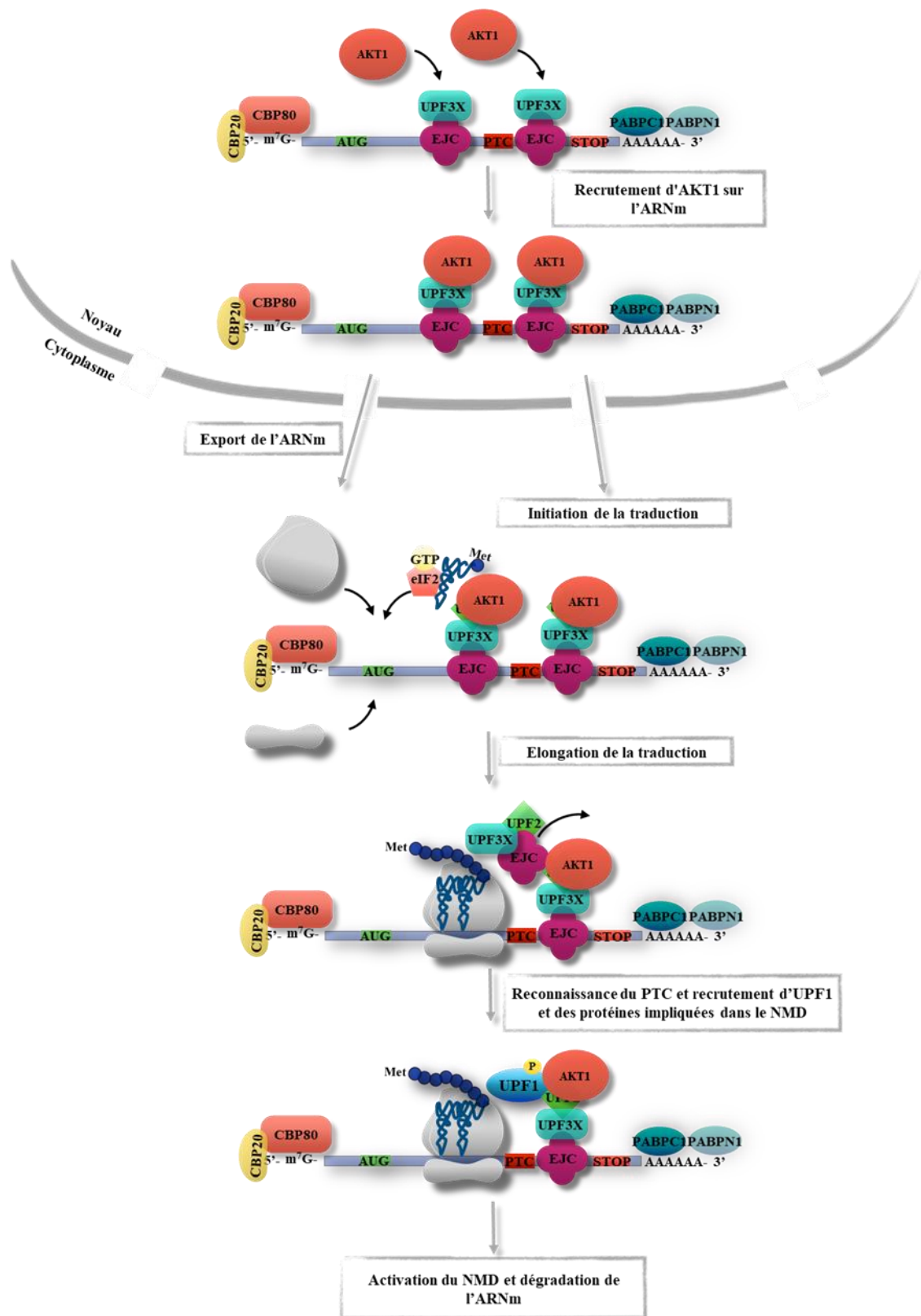


Figure 48 : Représentation des interactions protéiques entre les facteurs du NMD et la kinase AKT1. La protéine AKT1 serait recrutée sur l'ARNm au niveau nucléaire où elle serait déposée sur la protéine UPF3X. Après l'export du mRNP vers le cytoplasme, le premier tour de la traduction a

lieu. Dès la reconnaissance du PTC par le ribosome, la protéine UPF1 est recrutée et pourrait interagir avec AKT1. La protéine kinase AKT1 pourrait à cet instant phosphoryler UPF1, en activant ainsi le mécanisme du NMD.

### **Activation possible de la protéine kinase AKT1**

Parmi les questions que nous pouvons avoir sur la possible activation du NMD par la protéine AKT1, une représente l'activation et la phosphorylation d'AKT1 par une kinase, événement précédent à la phosphorylation des cibles par AKT1. En effet, il a déjà été démontré dans la littérature que la protéine AKT1 doit être phosphorylée afin de transmettre le signal dans la cascade de phosphorylation, et plus précisément ce sont les kinases PDK1 et mTORC2 qui se chargent de la phosphoryler (Biondi et al., 2000; Risso et al., 2015; Song et al., 2005). Pour sa phosphorylation, la protéine AKT1 doit être recrutée au niveau de la membrane afin d'interagir avec les phospholipides de membrane PIP3. Cette translocation membranaire est fondamentale pour la modification conformationnelle de la protéine AKT1 qui permet aux deux kinases d'accéder aux sites de phosphorylation d'AKT1 (Biondi et al., 2000; Song et al., 2005).

En revanche, nous n'avons aucune indication de l'activation d'AKT1 dans notre modèle d'activation du NMD. Est-ce que la protéine AKT1 serait déjà phosphorylée et activée lors de son recrutement par UPF3X dans le noyau ? Est-ce que la protéine AKT1 serait activée après l'export du mRNP vers le cytoplasme ? Quelle kinase se chargerait de l'activer et pourrait accéder aux sites de phosphorylation d'AKT1 vue sa conformation tertiaire ?

Afin de répondre à cela, il est connu que la protéine AKT1 est localisée de façon majoritaire dans le cytoplasme mais il a été démontré qu'elle peut se situer dans le noyau où elle phosphoryle des protéines nucléaires telles que le facteur de transcription FOXO ou des co-activateurs transcriptionnels tels que p300 (Arden and Biggs III, 2002; Huang and Chen, 2005). Néanmoins, aucune évidence n'a été montrée pour une activation nucléaire de la protéine AKT1. La seule supposition est qu'elle est activée dans le cytoplasme puis rejoint le noyau. Une étude a prouvé que la protéine AKT1 phosphoryle dans le noyau la protéine Aly/REF qui a la capacité d'interagir avec les phospholipides de membranes PIP3 au niveau nucléaire (Okada et al., 2008). Néanmoins, il n'est pas connu si la protéine AKT1 est déjà retrouvée activée dans le noyau ou si une éventuelle kinase puisse l'activer au niveau nucléaire.

La protéine AKT1 pourrait être déjà active lors de sa fixation sur l'ARNm ou pourrait être activée en cours de route, par exemple par une nouvelle kinase. Etant donné le rôle des deux kinases, AKT1 et SMG1, dans le mécanisme du NMD, nous pourrions même arriver à penser que la protéine SMG1 serait capable de phosphoryler AKT1 ou vice-versa. Cette hypothèse pourrait être étudiée par exemple à l'aide d'une expérience de phosphorylation *in vitro*, en regardant la capacité de phosphorylation d'AKT1 et

de SMG1 en absence de toute autre protéine du NMD. De plus, une autre idée pourrait être que les deux kinases se phosphorylent en même temps afin de permettre l'activation du NMD. Ou bien, il ne faut pas exclure la possibilité que les deux kinases interviennent indépendamment l'une de l'autre, et ainsi à des moments différents.

L'activation d'AKT1 par PDK1 et mTORC2 après la translocation membranaire reste quand même la proposition la plus intuitive. Une fois activée, la protéine AKT1 serait dirigée vers le noyau afin d'interagir par exemple avec la protéine UPF3X. Une approche qui pourrait être réalisée afin de valider cette hypothèse serait par exemple l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de PDK1 et de mTORC2 avec l'étude de leur impact sur l'activation d'AKT1. Il serait intéressant de regarder par microscopie comme la méthode de PLA la localisation d'AKT1 phosphorylée ou non après l'inhibition des deux kinases en question.

### **Les deux kinases du NMD : action synergique ou compétitive ?**

L'identification d'une nouvelle protéine kinase impliquée dans le mécanisme du NMD a introduit de nouvelles questions concernant la régulation du NMD. Les sites de phosphorylation d'UPF1 par SMG1 sont déjà identifiés mais ceux qui sont régulés par AKT1 ne sont pas encore connus (Matsuoka et al., 2007; Ohnishi et al., 2003; Okada-Katsuhata et al., 2012; Yamashita et al., 2001). En effet, les deux kinases pourraient cibler les mêmes sites ou au contraire, phosphoryler des sites indépendants. Selon leur activité, elles pourraient avoir une action synergique ou additive dans l'action du NMD ou bien agir indépendamment l'une de l'autre avec une action compétitive.

D'après les résultats présentés, les deux kinases semblent avoir une action indépendante. En effet, il n'y a pas forcément de kinase prévalente sur l'autre, c'est-à-dire que la protéine SMG1 ne serait pas majoritaire pour l'activation du NMD et vice-versa, et chacune aurait une activité propre au NMD.

Une raison d'une activité distincte entre les deux kinases pourrait être la différence des sites phosphorylés. SMG1 phosphoryle majoritairement la partie C-terminale d'UPF1 alors que nos résultats laissent penser qu'AKT1 puisse phosphoryler de façon majoritaire l'extrémité N-terminale.

Il est possible que les deux kinases puissent se fixer sur UPF1 et interagir avec des extrémités différentes. Cette régulation du NMD par les deux kinases reste encore à élucider puisque les preuves fournies jusqu'à présent ne sont pas suffisantes. Peut-être que les deux kinases possèdent une activité spécifique. Nous savons que la protéine SMG1 régule le NMD afin de permettre la dégradation des ARNm porteurs d'un PTC mais aussi la dégradation de certains ARNm régulés physiologiquement par le NMD. Il est possible qu'AKT1 cible de façon spécifique certains ARNm.

Nous n'avons pas réussi à trouver des sites phosphorylés d'UPF1 par AKT1, malgré la présence de la séquence consensus reconnue par AKT1. De nombreuses cibles d'AKT1 ne sont pas reconnues par cette séquence. Il n'y a pas encore une explication à cela, même si la conformation tertiaire des protéines pourrait avoir un rôle. En effet, la conformation de la protéine pourrait masquer la séquence consensus d'AKT1 en présentant un autre site. L'environnement autour du site pourrait être la cause de cette reconnaissance et phosphorylation mais les preuves sont insuffisantes pour l'instant (Hornbeck et al., 2004; Obata et al., 2000; Rena et al., 1999; Vitari et al., 2004).

La découverte des sites phosphorylés représente un des objectifs à atteindre, par exemple en mutant différents sites possibles et en regardant leur impact sur le NMD. La spectrométrie de masse pourrait être aussi un moyen d'identifier ces sites.

La coexistence de ces deux kinases laisse penser que d'autres protéines puissent être impliquées dans le mécanisme du NMD. La phosphoprotéine UPF2 est ainsi une cible pour l'activation du NMD mais la kinase qui la phosphoryle n'a pas encore été clairement identifiée. Un projet qui pourrait être développé est la découverte d'une éventuelle kinase phosphorylant de façon spécifique la protéine UPF2, par exemple à l'aide du même système de criblage avec un vecteur codant la protéine hybride UPF2-MS2.

### **Le rôle exclusif de l'isoforme AKT1 sur le NMD**

Dès les résultats obtenus lors du criblage, nous avons remarqué une spécificité d'isoforme. La protéine AKT1 semble être la seule à avoir un rôle dans le mécanisme du NMD puisque des molécules synthétisées pour inhiber AKT2 ou AKT3 n'ont pas été sélectionnées par le crible. Nous avons pu confirmer cette spécificité par différentes approches. Le rôle exclusif de l'isoforme AKT1 dans le NMD suggère que certains mécanismes sont mis en place et qui excluent l'activité des deux autres isoformes AKT2 et AKT3.

La question que nous pouvons nous poser est la suivante : Quels sont les paramètres qui causent cette spécificité d'isoforme ? En effet, malgré le pourcentage élevé de similarité de séquence et une architecture semblable, les isoformes possèdent une localisation mais aussi une expression qui peuvent être différentes. Par exemple, nous avons déjà introduit que la protéine AKT1 représente l'isoforme ubiquitaire par rapport aux deux autres. La nature des substrats peut être spécifique à l'isoforme et, selon le signal qui active la voie de signalisation, l'effet sera différent. Parfois, deux isoformes peuvent même arriver à avoir une action contraire, notamment dans certains cancers tels que le cancer du sein où AKT1 et AKT2 interagissent avec les mêmes protéines mais avec une activité opposée (Hinz and Jücker, 2019; Riggio et al., 2017).

Il est donc attendu que selon le ligand qui active la voie PI3K/AKT/mTOR, mais aussi selon la localisation tissulaire, le NMD ne sera pas toujours efficace. Il est étrange de penser que les trois



isoformes peuvent avoir en commun certaines cibles sous certaines conditions et dans d'autres situations ne plus partager les mêmes substrats. Comme déjà évoqué auparavant, la conformation tertiaire de la protéine est fondamentale non seulement pour son activité mais aussi pour l'interaction avec les autres protéines. Dans notre cas de figure, les protéines UPF3X et UPF1 interagiraient avec AKT1 probablement à cause d'une séquence qui n'est pas commune aux deux autres isoformes. Nous sommes incapables aujourd'hui d'identifier les régions protéiques qui interagissent entre elles, sauf à l'aide de mutations qui excluraient ces interactions. La seule information que nous avons est que la protéine UPF1 serait phosphorylée probablement vers l'extrémité N-terminale de la protéine, et le domaine kinase d'AKT1 interagirait avec UPF1. Nous n'avons malheureusement pas de preuves à fournir mais il serait intéressant d'élucider la raison de cette spécificité d'isoforme, par exemple en regardant les sites d'AKT1 pouvant être phosphorylés ou subir des modifications post-traductionnelles et ainsi comparer avec les deux autres isoformes.

### **L'activation du NMD par AKT1 uniquement dans certaines conditions ?**

Le mécanisme du NMD dégrade des ARNm porteurs d'un PTC afin d'éviter la synthèse d'une protéine tronquée mais il a aussi la capacité de cibler des ARNm physiologiques pour la régulation de leur expression. Environ 5 à 15% des ARNm physiologiques sont dégradés par le NMD (Kurosaki and Maquat, 2016b; Lambert et al., 2020; Mendell et al., 2004; Seyedali and Berry, 2014).

L'implication de la protéine AKT1 dans le mécanisme du NMD a été prouvée pour les ARNm porteurs d'un PTC. Nous nous sommes posés la question si la protéine AKT1 avait un rôle dans la dégradation des ARNm physiologiques. D'après mes résultats, la protéine AKT1 régule le NMD uniquement des ARNm porteurs d'un PTC, contrairement à la protéine kinase SMG1 qui dégrade les ARNm avec PTC et les substrats naturels.

La seule explication que nous pouvons donner est que probablement, l'implication d'AKT1 dans le NMD est spécifique à certains ARNm. Il existerait ainsi une différence entre les deux kinases AKT1 et SMG1. En effet, nous pouvons penser que les deux kinases peuvent être activées à des moments distincts. La raison de cette spécificité n'est pas tout à fait claire et nous pourrions nous demander si la nature du PTC pourrait être un paramètre qui influence l'activité d'AKT1 dans le NMD. Une perspective serait en effet de trouver l'explication à cela et d'étudier l'efficacité du NMD pour d'autres ARNm porteurs de PTC, en utilisant aussi des lignées différentes.

## **Le rôle du NMD activé par AKT1 dans la tumorigenèse**

La modulation de l'expression de la kinase SMG1 ou d'un des facteurs du NMD a un impact sur l'activation du NMD (Usuki et al., 2004; Yamashita et al., 2001). De même, l'expression de la protéine AKT1 ou son état de phosphorylation influence la cascade de phosphorylation de la voie PI3K/AKT/mTOR (Yang et al., 2004) mais aussi l'efficacité du NMD. La surexpression ou l'activation constitutive d'AKT1 est souvent la cause de l'apparition de cancers tels que le cancer du sein et des ovaires (Altomare and Testa, 2005; Knobbe and Reifemberger, 2006; Revathidevi and Munirajan, 2019). Il suffit de penser que dans plus de 50% des cancers, la protéine AKT1 est retrouvée hyperactivée (Manning and Toker, 2017). Il est donc possible que des mutations d'AKT1 ou de la voie PI3K puissent moduler le NMD. La finalité de mon projet de thèse est d'accroître nos connaissances sur le fonctionnement du NMD qui pourraient être utiles au niveau clinique pour une médecine personnalisée envers des patients qui présentent certaines mutations, telles que des mutations d'AKT1.

D'après nos résultats, une corrélation peut être faite entre le NMD, la protéine AKT1 et la tumorigenèse. La corrélation entre le NMD et la tumorigenèse a été démontrée mais son rôle dans le développement des cancers est très complexe (Pawlicka et al., 2020). En effet, selon les cancers, le NMD peut avoir une efficacité inversée, avec d'un côté une très forte efficacité qui peut venir en aide ou être la cause du développement tumoral, ou bien d'un autre côté avec une inactivation laissant « fuir » des ARNm qui devraient être dégradés. L'implication du NMD dans les cancers peut être très spécifique et créer ainsi une complexité dans la compréhension du rôle du NMD dans la tumorigenèse.

Dans notre cas de figure, nous avons pu démontrer que la mutation en question induit une activité plus importante du NMD mais cette conséquence ne s'applique pas à toutes les mutations d'AKT1. Le NMD est ainsi un avantage dans la tumorigenèse ou peut-être en est même la cause. Il serait intéressant de prendre en considération un autre type de mutation qui est majoritairement retrouvée dans des cancers afin de voir si la tendance est la même, ou bien de voir si l'amplification du gène AKT1 conduit aux mêmes résultats. Pour confirmer nos résultats, nous devrions étudier l'impact d'AKT1 sur le NMD dans une lignée tumorale porteuse d'une mutation activatrice endogène d'AKT1.

Qu'est-ce qui cause cette différence d'efficacité du NMD dans les cancers ? Est-ce que cela a un lien avec la protéine AKT1 ? Cela dépend-il des mutations retrouvées ?

Ces interrogations ouvrent des possibilités de nouvelles études, par exemple d'étudier un type de cancer spécifique où le NMD est activé et de voir les mutations présentes.

## **Vers des perspectives cliniques : des stratégies thérapeutiques envisageables**

Le lien entre la protéine AKT1 et le NMD prouve que les cancers présentent différentes facettes qu'il faut prendre en considération. En effet, les thérapies ciblées ont vu un très grand développement ces dernières années puisque les cellules tumorales peuvent répondre de façon différente selon la mutation ou selon la localisation du cancer.

Les bénéfices de l'inhibition du NMD ont été énoncés lors de mon introduction. Dans notre cas de figure, le lien avec la voie PI3K/AKT/mTOR nous indique qu'une inhibition du NMD dans des cancers présentant une mutation d'AKT1, pourrait être une approche thérapeutique face au développement tumoral causé par la voie PI3K.

Des inhibiteurs du NMD ont déjà été identifiés tels que NMDI-1, NMDI-14 et l'amlexanox (Durand et al., 2007; Gonzalez-Hilarion et al., 2012; Martin et al., 2014). Nous avons déjà démontré que l'utilisation d'un inhibiteur d'AKT1 avait un effet sur l'efficacité du NMD. Il serait ainsi intéressant de regarder l'effet d'un inhibiteur du NMD sur la voie de signalisation PI3K.

Le développement d'inhibiteurs dirigés contre les deux voies représente une stratégie thérapeutique prometteuse puisque ces inhibiteurs cibleraient efficacement les altérations et les modifications sous plusieurs angles. C'est le cas d'un inhibiteur de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR qui a été développé, appelé Rigosertib, et qui semblerait aussi agir sur le NMD en l'inhibant (Hyoda et al., 2015). Cet inhibiteur agit principalement sur les microtubules, en déstabilisant ces derniers et ayant ainsi un impact négatif sur les cellules cancéreuses.

Il ne faut tout de même pas mettre de côté les effets indésirables que peut avoir l'inhibition de la voie PI3K et du NMD et voir le revers de la médaille. En effet, même si ces inhibiteurs seraient spécifiques à la voie PI3K et au NMD, toutes les voies PI3K et NMD seraient bloquées, pas uniquement dans les cellules tumorales mais aussi dans les cellules saines de l'organisme. La conséquence de cette inhibition pourrait être opposé à l'effet souhaité dans certains cas puisque toutes les fonctions cellulaires seraient modifiées, telles que la prolifération cellulaire, la régulation de l'apoptose ou la synthèse protéique. Pour cette raison, il faut toujours prendre en considération cas par cas afin de cibler au mieux la pathologie.

En conclusion, mon projet de thèse a permis d'identifier la deuxième kinase impliquée dans le NMD, la protéine AKT1. Son rôle central dans la signalisation en fait un acteur particulier dans le mécanisme de surveillance des ARNm qu'est le NMD et ouvre de nouvelles perspectives de régulation de ce dernier.

## Références bibliographiques

- Aartsma-Rus, A., van Ommen, G.-J.B., 2010. Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders. *Eur J Hum Genet* 18, 146–153. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2009.160>
- Abraham, R.T., 2004a. PI 3-kinase related kinases: “big” players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair (Amst.)* 3, 883–887. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.04.002>
- Abraham, R.T., 2004b. The ATM-related kinase, hSMG-1, bridges genome and RNA surveillance pathways. *DNA Repair (Amst.)* 3, 919–925. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.04.003>
- Abraham, R.T., 2001. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* 15, 2177–2196. <https://doi.org/10.1101/gad.914401>
- Alessi, D., Andjelkovic, M., Caudwell, B., 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1.
- Alkalaeva, E.Z., Pisarev, A.V., Frolova, L.Y., Kisselev, L.L., Pestova, T.V., 2006. In Vitro Reconstitution of Eukaryotic Translation Reveals Cooperativity between Release Factors eRF1 and eRF3. *Cell* 125, 1125–1136. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.035>
- Alrahbani, T., Sartor, F., Anderson, J., Miedzybrodzka, Z., McCaig, C., Müller, B., 2015. Full UPF3B function is critical for neuronal differentiation of neural stem cells. *Mol Brain* 8, 33. <https://doi.org/10.1186/s13041-015-0122-1>
- Altomare, D.A., Testa, J.R., 2005. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455–7464. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209085>
- Aman, M.J., Lamkin, T.D., Okada, H., Kurosaki, T., Ravichandran, K.S., 1998. The Inositol Phosphatase SHIP Inhibits Akt/PKB Activation in B Cells. *Journal of Biological Chemistry* 273, 33922–33928. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.33922>
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., Jacobson, A., 2004. A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432, 112–118. <https://doi.org/10.1038/nature03060>
- Anczuków, O., Ware, M.D., Buisson, M., Zetoune, A.B., Stoppa-Lyonnet, D., Sinilnikova, O.M., Mazoyer, S., 2008. Does the nonsense-mediated mRNA decay mechanism prevent the synthesis of truncated BRCA1, CHK2, and p53 proteins? *Hum. Mutat.* 29, 65–73. <https://doi.org/10.1002/humu.20590>
- Andersen, C.B.F., 2006. Structure of the Exon Junction Core Complex with a Trapped DEAD-Box ATPase Bound to RNA. *Science* 313, 1968–1972. <https://doi.org/10.1126/science.1131981>
- Andersen, G.R., Nissen, P., Nyborg, J., 2003. Elongation factors in protein biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 434–441. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00162-2)
- Andjelkovic, M., Alessi, D.R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N.J.C., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J.M., Hemmings, B.A., 1997. Role of Translocation in the Activation and Function of Protein Kinase B. *Journal of Biological Chemistry* 272, 31515–31524. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31515>
- Andrade, M.A., Bork, P., 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat. Genet.* 11, 115–116. <https://doi.org/10.1038/ng1095-115>
- Aoyagi, T., Matsui, T., 2011. Phosphoinositide-3 Kinase Signaling in Cardiac Hypertrophy and Heart Failure. *CPD* 17, 1818–1824. <https://doi.org/10.2174/138161211796390976>
- Applequist, S.E., Selg, M., Raman, C., Jäck, H.-M., 1997. Cloning and characterization of HUPF1, a human homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* nonsense mRNA-reducing UPF1 protein. *Nucleic Acids Res* 25, 814–821. <https://doi.org/10.1093/nar/25.4.814>
- Arden, K.C., Biggs III, W.H., 2002. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 403, 292–298. [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(02\)00207-2](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(02)00207-2)
- Arias-Palomo, E., Yamashita, A., Fernández, I.S., Núñez-Ramírez, R., Bamba, Y., Izumi, N., Ohno, S., Llorca, O., 2011. The nonsense-mediated mRNA decay SMG-1 kinase is regulated by large-scale conformational changes controlled by SMG-8. *Genes Dev* 25, 153–164. <https://doi.org/10.1101/gad.606911>
- Arribere, J.A., Fire, A.Z., 2018. Nonsense mRNA suppression via nonstop decay. *eLife* 7, e33292. <https://doi.org/10.7554/eLife.33292>
- Ashton-Beaucage, D., Udell, C.M., Lavoie, H., Baril, C., Lefrançois, M., Chagnon, P., Gendron, P., Caron-Lizotte, O., Bonneil, E., Thibault, P., Therrien, M., 2010. The exon junction complex controls the splicing of MAPK and other long intron-containing transcripts in *Drosophila*. *Cell* 143, 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.014>
- Avery, P., Vicente-Crespo, M., Francis, D., Nashchekina, O., Alonso, C.R., Palacios, I.M., 2011. *Drosophila* Upf1 and Upf2 loss of function inhibits cell growth and causes animal death in a Upf3-independent manner. *RNA* 17, 624–638. <https://doi.org/10.1261/rna.2404211>

- Aznarez, I., Nomakuchi, T.T., Tetenbaum-Novatt, J., Rahman, M.A., Fregoso, O., Rees, H., Krainer, A.R., 2018. Mechanism of Nonsense-Mediated mRNA Decay Stimulation by Splicing Factor SRSF1. *Cell Reports* 23, 2186–2198. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.04.039>
- Azzalin, C.M., Lingner, J., 2006a. The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr. Biol.* 16, 433–439. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.018>
- Azzalin, C.M., Lingner, J., 2006b. The double life of UPF1 in RNA and DNA stability pathways. *Cell Cycle* 5, 1496–1498. <https://doi.org/10.4161/cc.5.14.3093>
- Azzouz, N., Panasencko, O.O., Deluen, C., Hsieh, J., Theiler, G., Collart, M.A., 2009. Specific roles for the Ccr4-Not complex subunits in expression of the genome. *RNA* 15, 377–383. <https://doi.org/10.1261/rna.1348209>
- Baguet, A., Degot, S., Cougot, N., Bertrand, E., Chenard, M.-P., Wendling, C., Kessler, P., Le Hir, H., Rio, M.-C., Tomasetto, C., 2007. The exon-junction-complex-component metastatic lymph node 51 functions in stress-granule assembly. *Journal of Cell Science* 120, 2774–2784. <https://doi.org/10.1242/jcs.009225>
- Ballut, L., Marchadier, B., Baguet, A., Tomasetto, C., Séraphin, B., Le Hir, H., 2005. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nat Struct Mol Biol* 12, 861–869. <https://doi.org/10.1038/nsmb990>
- Banerjee, A.K., 1980. 5'-Terminal Cap Structure in Eucaryotic Messenger Ribonucleic Acids. *MICROBIOL. REV.* 44, 31.
- Bao, X., Huang, Y., Xu, W., Xiong, G., 2020. Functions and Clinical Significance of UPF3a Expression in Human Colorectal Cancer. *CMAR Volume* 12, 4271–4281. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S244486>
- Baralle, F.E., Giudice, J., 2017. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 437–451. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.27>
- Barbosa, I., Haque, N., Fiorini, F., Barrandon, C., Tomasetto, C., Blanchette, M., Le Hir, H., 2012. Human CWC22 escorts the helicase eIF4AIII to spliceosomes and promotes exon junction complex assembly. *Nat Struct Mol Biol* 19, 983–990. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2380>
- Bartel, D.P., 2009. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Baselga, J., Campone, M., Piccart, M., Burris, H.A., Rugo, H.S., Sahnoud, T., Noguchi, S., Gnant, M., Pritchard, K.I., Lebrun, F., Beck, J.T., Ito, Y., Yardley, D., Deleu, I., Perez, A., Bachelot, T., Vittori, L., Xu, Z., Mukhopadhyay, P., Lebwohl, D., Hortobagyi, G.N., 2012. Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med* 366, 520–529. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1109653>
- Baserga, S.J., Benz, E.J., 1988. Nonsense mutations in the human beta-globin gene affect mRNA metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85, 2056–2060. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.7.2056>
- Bashkurov, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.-M., Heyer, W.-D., 1997. A Mouse Cytoplasmic Exoribonuclease (mXRN1p) with Preference for G4 Tetraplex Substrates. *Journal of Cell Biology* 136, 761–773. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.4.761>
- Basu, S., Totty, N.F., Irwin, M.S., Sudol, M., Downward, J., 2003. Akt Phosphorylates the Yes-Associated Protein, YAP, to Induce Interaction with 14-3-3 and Attenuation of p73-Mediated Apoptosis. *Molecular Cell* 11, 11–23. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00776-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00776-1)
- Bateman, J.F., 2003. Tissue-specific RNA surveillance? Nonsense-mediated mRNA decay causes collagen X haploinsufficiency in Schmid metaphyseal chondrodysplasia cartilage. *Human Molecular Genetics* 12, 217–225. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg054>
- Bauer, T.M., Patel, M.R., Infante, J.R., 2015. Targeting PI3 kinase in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 146, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.006>
- Behm-Ansmant, I., Gatfield, D., Rehwinkel, J., Hilgers, V., Izaurralde, E., 2007. A conserved role for cytoplasmic poly(A)-binding protein 1 (PABPC1) in nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J* 26, 1591–1601. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601588>
- Belgrader, P., Cheng, J., Maquat, L.E., 1993. Evidence to implicate translation by ribosomes in the mechanism by which nonsense codons reduce the nuclear level of human triosephosphate isomerase mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 482–486. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.2.482>
- Belgrader, P., Cheng, J., Zhou, X., Stephenson, L.S., Maquat, L.E., 1994. Mammalian nonsense codons can be cis effectors of nuclear mRNA half-life. *Mol Cell Biol* 14, 8219–8228. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8219-8228.1994>
- Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., Tschlis, P., 1998. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17, 313–325. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201947>
- Bellacosa, A., Testa, Staal, S., Tschlis, P., 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254, 274–277. <https://doi.org/10.1126/science.1833819>
- Bicknell, A.A., Ricci, E.P., 2017. When mRNA translation meets decay. *Biochemical Society Transactions* 45, 339–351. <https://doi.org/10.1042/BST20160243>

- Biondi, R.M., Cheung, P.C.F., Casamayor, A., Deak, M., Currie, R.A., Alessi, D.R., 2000. Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J* 19, 979–988. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.5.979>
- Black, D.L., 2003. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. *Annual Review of Biochemistry* 72, 291–336. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720>
- Bladen, C.L., Salgado, D., Monges, S., Foncuberta, M.E., Kekou, K., Kosma, K., Dawkins, H., Lamont, L., Roy, A.J., Chamova, T., Guergueltcheva, V., Chan, S., Korngut, L., Campbell, C., Dai, Y., Wang, J., Barišić, N., Brabec, P., Lahdetie, J., Walter, M.C., Schreiber-Katz, O., Karcagi, V., Garami, M., Viswanathan, V., Bayat, F., Buccella, F., Kimura, E., Koeks, Z., van den Bergen, J.C., Rodrigues, M., Roxburgh, R., Lusakowska, A., Kostera-Pruszyk, A., Zimowski, J., Santos, R., Neagu, E., Artemieva, S., Rasic, V.M., Vojinovic, D., Posada, M., Bloetzer, C., Jeannet, P.-Y., Joncourt, F., Díaz-Manera, J., Gallardo, E., Karaduman, A.A., Topaloğlu, H., El Sherif, R., Stringer, A., Shatillo, A.V., Martin, A.S., Peay, H.L., Bellgard, M.I., Kirschner, J., Flanigan, K.M., Straub, V., Bushby, K., Verschuuren, J., Aartsma-Rus, A., Bérout, C., Lochmüller, H., 2015. The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Human Mutation* 36, 395–402. <https://doi.org/10.1002/humu.22758>
- Bobadilla, J.L., Macek, M., Fine, J.P., Farrell, P.M., 2002. Cystic fibrosis: A worldwide analysis of CFTR mutations? correlation with incidence data and application to screening. *Hum. Mutat.* 19, 575–606. <https://doi.org/10.1002/humu.10041>
- Boehm, V., Kueckelmann, S., Gerbracht, J.V., Kallabis, S., Britto-Borges, T., Altmüller, J., Krüger, M., Dieterich, C., Gehring, N.H., 2021. SMG5-SMG7 authorize nonsense-mediated mRNA decay by enabling SMG6 endonucleolytic activity. *Nat Commun* 12, 3965. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24046-3>
- Bono, F., Ebert, J., Unterholzner, L., Güttler, T., Izaurralde, E., Conti, E., 2004. Molecular insights into the interaction of PYM with the Mago-Y14 core of the exon junction complex. *EMBO Rep* 5, 304–310. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400091>
- Bordeira-Cariço, R., Pêgo, A.P., Santos, M., Oliveira, C., 2012. Cancer syndromes and therapy by stop-codon readthrough. *Trends in Molecular Medicine* 18, 667–678. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.09.004>
- Borman, A.M., 2000. Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Research* 28, 4068–4075. <https://doi.org/10.1093/nar/28.21.4068>
- Bourgeois, C.F., Lejeune, F., Stévenin, J., 2004. Broad Specificity of SR (Serine / Arginine) Proteins in the Regulation of Alternative Splicing of Pre-Messenger RNA, in: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. Elsevier, pp. 37–88. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(04\)78002-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(04)78002-2)
- Braun, K.A., Young, E.T., 2014. Coupling mRNA Synthesis and Decay. *Molecular and Cellular Biology* 34, 4078–4087. <https://doi.org/10.1128/MCB.00535-14>
- Brazil, D.P., Hemmings, B.A., 2001. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences* 26, 657–664. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01958-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01958-2)
- Bresson, S., Tollervey, D., 2018. Surveillance-ready transcription: nuclear RNA decay as a default fate. *Open Biol.* 8, 170270. <https://doi.org/10.1098/rsob.170270>
- Brocke, K.S., al., 2002. The human intronless melanocortin 4-receptor gene is NMD insensitive. *Human Molecular Genetics* 11, 331–335. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.3.331>
- Brogna, S., Wen, J., 2009. Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanisms. *Nat Struct Mol Biol* 16, 107–113. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1550>
- Brogna, J., Sieracki, E., Gao, T., Newton, A.C., 2007. PHLPP and a Second Isoform, PHLPP2, Differentially Attenuate the Amplitude of Akt Signaling by Regulating Distinct Akt Isoforms. *Molecular Cell* 25, 917–931. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.017>
- Brown, E.J., Albers, M.W., Bum Shin, T., Ichikawa, K., Keith, C.T., Lane, W.S., Schreiber, S.L., 1994. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* 369, 756–758. <https://doi.org/10.1038/369756a0>
- Brown, J.S., Banerji, U., 2017. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacology & Therapeutics* 172, 101–115. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.12.001>
- Browne, G.J., Proud, C.G., 2002. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells: Control of translation elongation. *European Journal of Biochemistry* 269, 5360–5368. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03290.x>
- Brumbaugh, K.M., Otterness, D.M., Geisen, C., Oliveira, V., Brognard, J., Li, X., Lejeune, F., Tibbetts, R.S., Maquat, L.E., Abraham, R.T., 2004. The mRNA surveillance protein hSMG-1 functions in genotoxic stress response pathways in mammalian cells. *Mol. Cell* 14, 585–598. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.05.005>
- Bruno, I.G., Karam, R., Huang, L., Bhardwaj, A., Lou, C.H., Shum, E.Y., Song, H.-W., Corbett, M.A., Gifford, W.D., Geetz, J., Pfaff, S.L., Wilkinson, M.F., 2011. Identification of a MicroRNA that Activates Gene Expression by Repressing Nonsense-Mediated RNA Decay. *Molecular Cell* 42, 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.04.018>

- Buckanovich, R.J., Posner, J.B., Darnell, R.B., 1993. Nova, the paraneoplastic Ri antigen, is homologous to an RNA-binding protein and is specifically expressed in the developing motor system. *Neuron* 11, 657–672. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90077-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90077-5)
- Busetto, V., Barbosa, I., Basquin, J., Marquet, É., Hocq, R., Hennion, M., Paternina, J.A., Namane, A., Conti, E., Bensaude, O., Le Hir, H., 2020. Structural and functional insights into CWC27/CWC22 heterodimer linking the exon junction complex to spliceosomes. *Nucleic Acids Research* 48, 5670–5683. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa267>
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., Uhlik, M., Lin, A., Du, J., Qian, Y.-W., Zeckner, D.J., Tucker-Kellogg, G., Touchman, J., Patel, K., Mousses, S., Bittner, M., Schevitz, R., Lai, M.-H.T., Blanchard, K.L., Thomas, J.E., 2007. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448, 439–444. <https://doi.org/10.1038/nature05933>
- Carracedo, A., Pandolfi, P.P., 2008. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene* 27, 5527–5541. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.247>
- Carson, D.A., Lois, A., 1995. Cancer progression and p53. *The Lancet* 346, 1009–1011. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)91693-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)91693-8)
- Cartegni, L., Chew, S.L., Krainer, A.R., 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3, 285–298. <https://doi.org/10.1038/nrg775>
- Carter, M.S., Doskow, J., Morris, P., Li, S., Nhim, R.P., Sandstedt, S., Wilkinson, M.F., 1995. A Regulatory Mechanism That Detects Premature Nonsense Codons in T-cell Receptor Transcripts in Vivo Is Reversed by Protein Synthesis Inhibitors in Vitro. *Journal of Biological Chemistry* 270, 28995–29003. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28995>
- Carter, M.S., Li, S., Wilkinson, M.F., 1996. A splicing-dependent regulatory mechanism that detects translation signals. *EMBO J* 15, 5965–5975.
- Cenni, V., Marmioli, S., de Pol, A., Maraldi, N.M., Sirri, A., Riccio, M., Lattanzi, G., Santi, S., 2003. Targeting of the Akt/PKB kinase to the actin skeleton. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60, 2710–2720. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3349-4>
- Chakrabarti, S., Bonneau, F., Schüssler, S., Eppinger, E., Conti, E., 2014. Phospho-dependent and phospho-independent interactions of the helicase UPF1 with the NMD factors SMG5–SMG7 and SMG6. *Nucleic Acids Res* 42, 9447–9460. <https://doi.org/10.1093/nar/gku578>
- Chakrabarti, S., Jayachandran, U., Bonneau, F., Fiorini, F., Basquin, C., Domcke, S., Le Hir, H., Conti, E., 2011. Molecular mechanisms for the RNA-dependent ATPase activity of Upf1 and its regulation by Upf2. *Mol. Cell* 41, 693–703. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.02.010>
- Chamieh, H., Ballut, L., Bonneau, F., Le Hir, H., 2008. NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 85–93. <https://doi.org/10.1038/nsmb1330>
- Chan, C.C., 2004. eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* 10, 200–209. <https://doi.org/10.1261/rna.5230104>
- Chan, W.-K., Bhalla, A.D., Le Hir, H., Nguyen, L.S., Huang, L., Gécz, J., Wilkinson, M.F., 2009. A UPF3-mediated regulatory switch that maintains RNA surveillance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 747–753. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1612>
- Chan, W.-K., Huang, L., Gudikote, J.P., Chang, Y.-F., Imam, J.S., MacLean, J.A., Wilkinson, M.F., 2007. An alternative branch of the nonsense-mediated decay pathway. *EMBO J.* 26, 1820–1830. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601628>
- Charenton, C., Graille, M., 2018. mRNA decapping: finding the right structures. *Phil. Trans. R. Soc. B* 373, 20180164. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0164>
- Chazal, P.-E., Dagueuet, E., Wendling, C., Ulryck, N., Tomasetto, C., Sargueil, B., Le Hir, H., 2013. EJC core component MLN51 interacts with eIF3 and activates translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 5903–5908. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218732110>
- Chen, C.-Y.A., Shyu, A.-B., 2011. Mechanisms of deadenylation-dependent decay: Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *WIREs RNA* 2, 167–183. <https://doi.org/10.1002/wrna.40>
- Chen, R., Kim, O., Yang, J., Sato, K., Eisenmann, K.M., McCarthy, J., Chen, H., Qiu, Y., 2001. Regulation of Akt/PKB Activation by Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 31858–31862. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100271200>
- Chen, W.S., 2001. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the akt1 gene. *Genes & Development* 15, 2203–2208. <https://doi.org/10.1101/gad.913901>
- Chen, Y., Huang, L., Dong, Y., Tao, C., Zhang, R., Shao, H., Shen, H., 2020. Effect of AKT1 (p. E17K) Hotspot Mutation on Malignant Tumorigenesis and Prognosis. *Front. Cell Dev. Biol.* 8, 573599. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.573599>
- Chen, Y.Q., Chen, H.H., Rhoad, A.E., Warner, L., Caggiano, T.J., Failli, A., Zhang, H.Z., Hsiao, C.L., Nakanishi, K., Molnarkimber, K.L., 1994. A Putative Sirolimus (Rapamycin) Effector Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 203, 1–7. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1994.2140>
- Chen, Z.F., Behringer, R.R., 1995. twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes & Development* 9, 686–699. <https://doi.org/10.1101/gad.9.6.686>

- Cheng, J., Belgrader, P., Zhou, X., Maquat, L.E., 1994. Introns are cis effectors of the nonsense-codon-mediated reduction in nuclear mRNA abundance. *Mol Cell Biol* 14, 6317–6325. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.9.6317-6325.1994>
- Cheng, J., Maquat, L.E., 1993. Nonsense codons can reduce the abundance of nuclear mRNA without affecting the abundance of pre-mRNA or the half-life of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol* 13, 1892–1902. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.3.1892-1902.1993>
- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.A., Watson, D.K., Testa, J.R., 1996. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 3636–3641. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3636>
- Cheng, Z., Muhlrud, D., Lim, M.K., Parker, R., Song, H., 2007. Structural and functional insights into the human Upf1 helicase core. *EMBO J* 26, 253–264. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601464>
- Cheraghchi-Bashi, A., Parker, C.A., Curry, E., Salazar, J.-F., Gungor, H., Saleem, A., Cunnea, P., Rama, N., Salinas, C., Mills, G.B., Morris, S.R., Kumar, R., Gabra, H., Stronach, E.A., 2015. A putative biomarker signature for clinically effective AKT inhibition: correlation of *in vitro*, *in vivo* and clinical data identifies the importance of modulation of the mTORC1 pathway. *Oncotarget* 6, 41736–41749. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6153>
- Chin, Y.R., Toker, A., 2010a. The Actin-Bundling Protein Palladin Is an Akt1-Specific Substrate that Regulates Breast Cancer Cell Migration. *Molecular Cell* 38, 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.02.031>
- Chin, Y.R., Toker, A., 2010b. Akt2 regulates expression of the actin-bundling protein palladin. *FEBS Letters* 584, 4769–4774. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.056>
- Chiu, S.-Y., 2004. The pioneer translation initiation complex is functionally distinct from but structurally overlaps with the steady-state translation initiation complex. *Genes & Development* 18, 745–754. <https://doi.org/10.1101/gad.1170204>
- Chiu, S.-Y., Serin, G., Ohara, O., Maquat, L.E., 2003. Characterization of human Smg5/7a: a protein with similarities to *Caenorhabditis elegans* SMG5 and SMG7 that functions in the dephosphorylation of Upf1. *RNA* 9, 77–87. <https://doi.org/10.1261/rna.2137903>
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., Dziembowski, A., 2013. RNA decay machines: The exosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 552–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2013.01.006>
- Cho, H., 2001. Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKBbeta). *Science* 292, 1728–1731. <https://doi.org/10.1126/science.292.5522.1728>
- Cho, H., Han, S., Choe, J., Park, S.G., Choi, S.S., Kim, Y.K., 2013. SMG5–PNRC2 is functionally dominant compared with SMG5–SMG7 in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Nucleic Acids Research* 41, 1319–1328. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1222>
- Cho, H., Kim, K.M., Han, S., Choe, J., Park, S.G., Choi, S.S., Kim, Y.K., 2012. Staufen1-Mediated mRNA Decay Functions in Adipogenesis. *Molecular Cell* 46, 495–506. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.009>
- Cho, H., Kim, K.M., Kim, Y.K., 2009. Human Proline-Rich Nuclear Receptor Coregulatory Protein 2 Mediates an Interaction between mRNA Surveillance Machinery and Decapping Complex. *Molecular Cell* 33, 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.022>
- Choudhary, C., Kumar, C., Gnad, F., Nielsen, M.L., Rehman, M., Walther, T.C., Olsen, J.V., Mann, M., 2009. Lysine Acetylation Targets Protein Complexes and Co-Regulates Major Cellular Functions. *Science* 325, 834–840. <https://doi.org/10.1126/science.1175371>
- Chuang, T.-W., Lee, K.-M., Tarn, W.-Y., 2015. Function and Pathological Implications of Exon Junction Complex Factor Y14. *Biomolecules* 5, 343–355. <https://doi.org/10.3390/biom5020343>
- Chung, C.Y., Potikyan, G., Firtel, R.A., 2001. Control of Cell Polarity and Chemotaxis by Akt/PKB and PI3 Kinase through the Regulation of PAKa. *Molecular Cell* 7, 937–947. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00247-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00247-7)
- Chung, H.S., Wang, S.-B., Venkatraman, V., Murray, C.I., Van Eyk, J.E., 2013. Cysteine Oxidative Posttranslational Modifications: Emerging Regulation in the Cardiovascular System. *Circ Res* 112, 382–392. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.112.268680>
- Clerici, M., Deniaud, A., Boehm, V., Gehring, N.H., Schaffitzel, C., Cusack, S., 2014. Structural and functional analysis of the three MIF4G domains of nonsense-mediated decay factor UPF2. *Nucleic Acids Res.* 42, 2673–2686. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1197>
- Coffer, P.J., Woodgett, J.R., 1991. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 201, 475–481. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16305.x>
- Cohen, M.M., 2013. The AKT genes and their roles in various disorders. *Am. J. Med. Genet.* 161, 2931–2937. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36101>
- Connor, A., Wiersma, E., Shulman, M.J., 1994. On the linkage between RNA processing and RNA translatability. *Journal of Biological Chemistry* 269, 25178–25184. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31514-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31514-4)
- Conti, E., Izaurralde, E., 2005. Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 316–325. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.04.005>



- Conus, N.M., Hannan, K.M., Cristiano, B.E., Hemmings, B.A., Pearson, R.B., 2002. Direct Identification of Tyrosine 474 as a Regulatory Phosphorylation Site for the Akt Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277, 38021–38028. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203387200>
- Correa-Cerro, L.S., 2005. DHCR7 nonsense mutations and characterisation of mRNA nonsense mediated decay in Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Journal of Medical Genetics* 42, 350–357. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.022749>
- Cougot, N., Babajko, S., Séraphin, B., 2004. Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *Journal of Cell Biology* 165, 31–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.200309008>
- Crawford, G.E., Faulkner, J.A., Crosbie, R.H., Campbell, K.P., Froehner, S.C., Chamberlain, J.S., 2000. Assembly of the Dystrophin-Associated Protein Complex Does Not Require the Dystrophin CooH-Terminal Domain. *Journal of Cell Biology* 150, 1399–1410. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1399>
- Crick, F., 1970. Central dogma of molecular biology. *Nature* 227, 561–563. <https://doi.org/10.1038/227561a0>
- Cui, Y., Hagan, K.W., Zhang, S., Peltz, S.W., 1995. Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 9, 423–436. <https://doi.org/10.1101/gad.9.4.423>
- Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Paushkin, S.V., Han, X., Weng, Y., Perlick, H.A., Dietz, H.C., Ter-Avanesyan, M.D., Peltz, S.W., 1998. The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev* 12, 1665–1677.
- Dang, Y., Low, W.-K., Xu, J., Gehring, N.H., Dietz, H.C., Romo, D., Liu, J.O., 2009. Inhibition of Nonsense-mediated mRNA Decay by the Natural Product Pateamine A through Eukaryotic Initiation Factor 4AIII. *Journal of Biological Chemistry* 284, 23613–23621. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.009985>
- Darmon, S.K., Lutz, C.S., 2012. Novel upstream and downstream sequence elements contribute to polyadenylation efficiency. *RNA Biology* 9, 1255–1265. <https://doi.org/10.4161/rna.21957>
- Datta, S.R., Brunet, A., Greenberg, M.E., 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes & Development* 13, 2905–2927. <https://doi.org/10.1101/gad.13.22.2905>
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M.E., 1997. Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery. *Cell* 91, 231–241. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80405-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80405-5)
- Decker, C.J., Parker, R., 2012. P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a012286–a012286. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012286>
- Decker, C.J., Parker, R., 1994. Mechanisms of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends in Biochemical Sciences* 19, 336–340. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90073-6](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90073-6)
- Degot, S., Le Hir, H., Alpy, F., Kedinger, V., Stoll, I., Wendling, C., Seraphin, B., Rio, M.-C., Tomasetto, C., 2004. Association of the Breast Cancer Protein MLN51 with the Exon Junction Complex via Its Speckle Localizer and RNA Binding Module. *Journal of Biological Chemistry* 279, 33702–33715. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402754200>
- Degot, S., Régnier, C.H., Wendling, C., Chenard, M.-P., Rio, M.-C., Tomasetto, C., 2002. Metastatic Lymph Node 51, a novel nucleo-cytoplasmic protein overexpressed in breast cancer. *Oncogene* 21, 4422–4434. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205611>
- Deniaud, A., Karuppasamy, M., Bock, T., Masiulis, S., Huard, K., Garzoni, F., Kerschgens, K., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., Beck, M., Neu-Yilik, G., Schaffitzel, C., 2015. A network of SMG-8, SMG-9 and SMG-1 C-terminal insertion domain regulates UPF1 substrate recruitment and phosphorylation. *Nucleic Acids Res.* 43, 7600–7611. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv668>
- Dennis, M.D., Jefferson, L.S., Kimball, S.R., 2012. Role of p70S6K1-mediated Phosphorylation of eIF4B and PDCD4 Proteins in the Regulation of Protein Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 287, 42890–42899. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.404822>
- DeStefano, M.A., Jacinto, E., 2013. Regulation of insulin receptor substrate-1 by mTORC2 (mammalian target of rapamycin complex 2). *Biochemical Society Transactions* 41, 896–901. <https://doi.org/10.1042/BST20130018>
- Dever, T.E., Dinman, J.D., Green, R., 2018. Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10, a032649. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032649>
- Dever, T.E., Green, R., 2012. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a013706–a013706. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>
- Di Maira, G., Brustolon, F., Pinna, L.A., Ruzzene, M., 2009. Dephosphorylation and inactivation of Akt/PKB is counteracted by protein kinase CK2 in HEK 293T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3363–3373. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0108-1>
- Dimmeler, S., Dernbach, E., Zeiher, A.M., 2000. Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at Ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS Letters* 477, 258–262. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01657-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01657-4)

- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., Zeiher, A.M., 1999. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601–605. <https://doi.org/10.1038/21224>
- Ding, L., Spencer, A., Morita, K., Han, M., 2005. The Developmental Timing Regulator AIN-1 Interacts with miRISCs and May Target the Argonaute Protein ALG-1 to Cytoplasmic P Bodies in *C. elegans*. *Molecular Cell* 19, 437–447. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.013>
- Doble, B.W., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *Journal of Cell Science* 116, 1175–1186. <https://doi.org/10.1242/jcs.00384>
- Doidge, R., Mittal, S., Aslam, A., Winkler, G.S., 2012. Deadenylation of cytoplasmic mRNA by the mammalian Ccr4–Not complex. *Biochemical Society Transactions* 40, 896–901. <https://doi.org/10.1042/BST20120074>
- Doma, M.K., Parker, R., 2006. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561–564. <https://doi.org/10.1038/nature04530>
- Dominski, Z., Kole, R., 1993. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 8673–8677. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8673>
- Dorard, C., de Thonel, A., Collura, A., Marisa, L., Svrcek, M., Lagrange, A., Jegou, G., Wanherdrick, K., Joly, A.L., Buhard, O., Gobbo, J., Penard-Lacronique, V., Zouali, H., Tubacher, E., Kirzin, S., Selves, J., Milano, G., Etienne-Grimaldi, M.-C., Bengrine-Lefèvre, L., Louvet, C., Tournigand, C., Lefèvre, J.H., Parc, Y., Tiret, E., Fléjou, J.-F., Gaub, M.-P., Garrido, C., Duval, A., 2011. Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 17, 1283–1289. <https://doi.org/10.1038/nm.2457>
- Dos D. Sarbassov, Ali, S.M., Kim, D.-H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D.M., 2004. Rictor, a Novel Binding Partner of mTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway that Regulates the Cytoskeleton. *Current Biology* 14, 1296–1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>
- Dudás, J., Ladányi, A., Ingruber, J., Steinbichler, T.B., Riechelmann, H., 2020. Epithelial to Mesenchymal Transition: A Mechanism that Fuels Cancer Radio/Chemoresistance. *Cells* 9, 428. <https://doi.org/10.3390/cells9020428>
- Dummler, B., Tschopp, O., Hynx, D., Yang, Z.-Z., Dirnhofer, S., Hemmings, B.A., 2006. Life with a Single Isoform of Akt: Mice Lacking Akt2 and Akt3 Are Viable but Display Impaired Glucose Homeostasis and Growth Deficiencies. *MCB* 26, 8042–8051. <https://doi.org/10.1128/MCB.00722-06>
- Durand, S., Cougot, N., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C.-H., Grierson, D.S., Bertrand, E., Tazi, J., Lejeune, F., 2007. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *Journal of Cell Biology* 178, 1145–1160. <https://doi.org/10.1083/jcb.200611086>
- Durand, S., Lykke-Andersen, J., 2013. Nonsense-mediated mRNA decay occurs during eIF4F-dependent translation in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 20, 702–709. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2575>
- Easton, R.M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D.W., Mizrahi, M., Forman, M.S., Lee, V.M.-Y., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., Birnbaum, M.J., 2005. Role for Akt3/Protein Kinase  $\beta$  in Attainment of Normal Brain Size. *MCB* 25, 1869–1878. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.5.1869-1878.2005>
- Eberle, A.B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O., Jensen, T.H., 2009. SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 49–55. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1530>
- Eberle, A.B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R.Z., Mühlemann, O., 2008. Posttranscriptional Gene Regulation by Spatial Rearrangement of the 3' Untranslated Region. *PLoS Biol* 6, e92. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060092>
- Eckmann, C.R., Rammelt, C., Wahle, E., 2011. Control of poly(A) tail length. *WIREs RNA* 2, 348–361. <https://doi.org/10.1002/wrna.56>
- Eliseev, B., Yeramala, L., Leitner, A., Karuppasamy, M., Raimondeau, E., Huard, K., Alkalaeva, E., Aebersold, R., Schaffitzel, C., 2018. Structure of a human cap-dependent 48S translation pre-initiation complex. *Nucleic Acids Research* 46, 2678–2689. <https://doi.org/10.1093/nar/gky054>
- Emamian, E.S., Hall, D., Birnbaum, M.J., Karayiorgou, M., Gogos, J.A., 2004. Convergent evidence for impaired AKT1-GSK3 $\beta$  signaling in schizophrenia. *Nat Genet* 36, 131–137. <https://doi.org/10.1038/ng1296>
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., 2007a. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrm2080>
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., Izaurralde, E., 2007b. P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing. *Mol Cell Biol* 27, 3970–3981. <https://doi.org/10.1128/MCB.00128-07>
- Fabrega, C., Hausmann, S., Shen, V., Shuman, S., Lima, C.D., 2004. Structure and Mechanism of mRNA Cap (Guanine-N7) Methyltransferase. *Molecular Cell* 13, 77–89. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00522-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00522-7)
- Fan, S., Yuan, R., Ma, Y.X., Meng, Q., Goldberg, I.D., Rosen, E.M., 2001. Mutant BRCA1 genes antagonize phenotype of wild-type BRCA1. *Oncogene* 20, 8215–8235. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205033>
- Fanen, P., Wohlhuter-Haddad, A., Hinzpeter, A., 2014. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 52, 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.023>

- Fang, X., Yu, S.X., Lu, Y., Bast, R.C., Woodgett, J.R., Mills, G.B., 2000. Phosphorylation and inactivation of glycogen synthase kinase 3 by protein kinase A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 11960–11965. <https://doi.org/10.1073/pnas.220413597>
- Fatscher, T., Gehring, N.H., 2016. Harnessing short poly(A)-binding protein-interacting peptides for the suppression of nonsense-mediated mRNA decay. *Sci Rep* 6, 37311. <https://doi.org/10.1038/srep37311>
- Fenger-Grøn, M., Fillman, C., Norrild, B., Lykke-Andersen, J., 2005. Multiple Processing Body Factors and the ARE Binding Protein TTP Activate mRNA Decapping. *Molecular Cell* 20, 905–915. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.10.031>
- Fernández, I.S., Yamashita, A., Arias-Palomo, E., Bamba, Y., Bartolomé, R.A., Canales, M.A., Teixidó, J., Ohno, S., Llorca, O., 2011. Characterization of SMG-9, an essential component of the nonsense-mediated mRNA decay SMG1C complex. *Nucleic Acids Res.* 39, 347–358. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq749>
- Fernández-Hernando, C., Ackah, E., Yu, J., Suárez, Y., Murata, T., Iwakiri, Y., Prendergast, J., Miao, R.Q., Birnbaum, M.J., Sessa, W.C., 2007. Loss of Akt1 Leads to Severe Atherosclerosis and Occlusive Coronary Artery Disease. *Cell Metabolism* 6, 446–457. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.007>
- Filippa, N., Sable, C.L., Filloux, C., Hemmings, B., Van Obberghen, E., 1999. Mechanism of Protein Kinase B Activation by Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase. *Mol Cell Biol* 19, 4989–5000. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.7.4989>
- Finley, D., 2009. Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 477–513. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081507.101607>
- Fiorini, F., Boudvillain, M., Le Hir, H., 2013. Tight intramolecular regulation of the human Upf1 helicase by its N- and C-terminal domains. *Nucleic Acids Research* 41, 2404–2415. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1320>
- Fischer, N., 2002. The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. *The EMBO Journal* 21, 2788–2797. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2788>
- Forget, B.G., Benz, E.J., Skoultschi, A., Baglioni, C., Housman, D., 1974. Absence of Messenger RNA for Beta Globin Chain in  $\beta^0$ -Thalassaemia. *Nature* 247, 379–381. <https://doi.org/10.1038/247379a0>
- Franks, T.M., Lykke-Andersen, J., 2008. The Control of mRNA Decapping and P-Body Formation. *Molecular Cell* 32, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.001>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.043>
- Fribourg, S., Gatfield, D., Izaurralde, E., Conti, E., 2003. A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14–Mago complex. *Nat Struct Mol Biol* 10, 433–439. <https://doi.org/10.1038/nsb926>
- Frischmeyer, P.A., 1999. Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease. *Human Molecular Genetics* 8, 1893–1900. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.10.1893>
- Frischmeyer-Guerrero, P.A., Montgomery, R.A., Warren, D.S., Cooke, S.K., Lutz, J., Sonnenday, C.J., Guerrero, A.L., Dietz, H.C., 2011. Perturbation of thymocyte development in nonsense-mediated decay (NMD)-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 10638–10643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019352108>
- Fu, W., Hall, M.N., 2020. Regulation of mTORC2 Signaling. *Genes* 11, 1045. <https://doi.org/10.3390/genes11091045>
- Fu, X.-D., Ares, M., 2014. Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* 15, 689–701. <https://doi.org/10.1038/nrg3778>
- Fujita, E., Jinbo, A., Matuzaki, H., Konishi, H., Kikkawa, U., Momoi, T., 1999. Akt Phosphorylation Site Found in Human Caspase-9 Is Absent in Mouse Caspase-9. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 264, 550–555. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1387>
- Fukuhara, N., Ebert, J., Unterholzner, L., Lindner, D., Izaurralde, E., Conti, E., 2005. SMG7 Is a 14-3-3-like Adaptor in the Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway. *Molecular cell* 17, 537–47. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.01.010>
- Furuichi, Y., 2015. Discovery of m<sup>7</sup>G-cap in eukaryotic mRNAs. *Proceedings of the Japan Academy. Ser. B: Physical and Biological Sciences* 91, 394–409. <https://doi.org/10.2183/pjab.91.394>
- Galy, V., Gadal, O., Fromont-Racine, M., Romano, A., Jacquier, A., Nehrbass, U., 2004. Nuclear Retention of Unspliced mRNAs in Yeast Is Mediated by Perinuclear Mlp1. *Cell* 116, 63–73. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01026-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01026-2)
- Gandy, J.C., Rountree, A.E., Bijur, G.N., 2006. Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Letters* 580, 3051–3058. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.051>
- Gao, D., Inuzuka, H., Tseng, A., Chin, R.Y., Toker, A., Wei, W., 2009. Phosphorylation by Akt1 promotes cytoplasmic localization of Skp2 and impairs APCCdh1-mediated Skp2 destruction. *Nat Cell Biol* 11, 397–408. <https://doi.org/10.1038/ncb1847>
- Gao, Q., Das, B., Sherman, F., Maquat, L.E., 2005. Cap-binding protein 1-mediated and eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated pioneer rounds of translation in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 4258–4263. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500684102>

- Gardner, L.B., 2010. Nonsense-Mediated RNA Decay Regulation by Cellular Stress: Implications for Tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 8, 295–308. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0502>
- Gardner, L.B., 2008. Hypoxic Inhibition of Nonsense-Mediated RNA Decay Regulates Gene Expression and the Integrated Stress Response. *MCB* 28, 3729–3741. <https://doi.org/10.1128/MCB.02284-07>
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., McNeish, J.D., Coleman, K.G., 2003. Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB $\beta$ . *J. Clin. Invest.* 112, 197–208. <https://doi.org/10.1172/JCI16885>
- Gatfield, D., Izaurralde, E., 2004. Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature* 429, 575–578. <https://doi.org/10.1038/nature02559>
- Gehring, N.H., Kunz, J.B., Neu-Yilik, G., Breit, S., Viegas, M.H., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2005. Exon-junction complex components specify distinct routes of nonsense-mediated mRNA decay with differential cofactor requirements. *Mol. Cell* 20, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.08.012>
- Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2003. Y14 and hUpf3b form an NMD-activating complex. *Mol. Cell* 11, 939–949. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00142-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00142-4)
- George, S., 2004. A Family with Severe Insulin Resistance and Diabetes Due to a Mutation in AKT2. *Science* 304, 1325–1328. <https://doi.org/10.1126/science.1096706>
- Gerbracht, J.V., Boehm, V., Britto-Borges, T., Kallabis, S., Wiederstein, J.L., Ciriello, S., Aschemeier, D.U., Krüger, M., Frese, C.K., Altmüller, J., Dieterich, C., Gehring, N.H., 2020. CASC3 promotes transcriptome-wide activation of nonsense-mediated decay by the exon junction complex. *Nucleic Acids Research* 48, 8626–8644. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa564>
- Ghosh, A., Lima, C.D., 2010. Enzymology of RNA cap synthesis. *WIREs RNA* 1, 152–172. <https://doi.org/10.1002/wrna.19>
- Giampietri, C., Petrungaro, S., Conti, S., Facchiano, A., Filippini, A., Ziparo, E., 2015. Cancer Microenvironment and Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Mediators of Inflammation* 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/417281>
- Gilboa, E., 2013. Expression of new antigens on tumor cells by inhibiting nonsense-mediated mRNA decay. *Immunol Res* 57, 44–51. <https://doi.org/10.1007/s12026-013-8442-7>
- Glavan, F., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E., Conti, E., 2006. Structures of the PIN domains of SMG6 and SMG5 reveal a nuclease within the mRNA surveillance complex. *EMBO J.* 25, 5117–5125. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601377>
- Gonatopoulos-Pournatzis, T., Cowling, V.H., 2014. Cap-binding complex (CBC). *Biochem J* 457, 231–242. <https://doi.org/10.1042/BJ20131214>
- Gong, C., Kim, Y.K., Woeller, C.F., Tang, Y., Maquat, L.E., 2009. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes & Development* 23, 54–66. <https://doi.org/10.1101/gad.1717309>
- González, C.I., Ruiz-Echevarría, M.J., Vasudevan, S., Henry, M.F., Peltz, S.W., 2000. The Yeast hnRNP-like Protein Hrp1/Nab4 Marks a Transcript for Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Molecular Cell* 5, 489–499. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80443-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80443-8)
- Gonzalez, E., McGraw, T.E., 2009a. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502–2508.
- Gonzalez, E., McGraw, T.E., 2009b. The Akt kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* 8, 2502–2508. <https://doi.org/10.4161/cc.8.16.9335>
- Gonzalez-Hilarion, S., Beghyn, T., Jia, J., Debreuck, N., Berte, G., Mamchaoui, K., Mouly, V., Gruenert, D.C., Déprez, B., Lejeune, F., 2012. Rescue of nonsense mutations by amlexanox in human cells. *Orphanet J Rare Dis* 7, 58. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-58>
- Gowravaram, M., Bonneau, F., Kanaan, J., Maciej, V.D., Fiorini, F., Raj, S., Croquette, V., Le Hir, H., Chakrabarti, S., 2018. A conserved structural element in the RNA helicase UPF1 regulates its catalytic activity in an isoform-specific manner. *Nucleic Acids Research* 46, 2648–2659. <https://doi.org/10.1093/nar/gky040>
- Green, R.E., Lewis, B.P., Hillman, R.T., Blanchette, M., Lareau, L.F., Garnett, A.T., Rio, D.C., Brenner, S.E., 2003. Widespread predicted nonsense-mediated mRNA decay of alternatively-spliced transcripts of human normal and disease genes. *Bioinformatics* 19, i118–i121. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg1015>
- Gross, J.D., Moerke, N.J., von der Haar, T., Lugovskoy, A.A., Sachs, A.B., McCarthy, J.E.G., Wagner, G., 2003. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. *Cell* 115, 739–750. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00975-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00975-9)
- Grover, A., Houlden, H., Baker, M., Adamson, J., Lewis, J., Prihar, G., Pickering-Brown, S., Duff, K., Hutton, M., 1999. 5' Splice Site Mutations in tau Associated with the Inherited Dementia FTDP-17 Affect a Stem-Loop Structure That Regulates Alternative Splicing of Exon 10. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15134–15143. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.15134>
- Guertin, D.A., Sabatini, D.M., 2009. The Pharmacology of mTOR Inhibition. *Science Signaling* 2, pe24–pe24. <https://doi.org/10.1126/scisignal.267pe24>

- Guiraud, S., Chen, H., Burns, D.T., Davies, K.E., 2015. Advances in genetic therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy: Therapeutic strategies for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Physiol* 100, 1458–1467. <https://doi.org/10.1113/EP085308>
- Guiraud, S., Davies, K.E., 2017. Pharmacological advances for treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Current Opinion in Pharmacology* 34, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2017.04.002>
- Gulen, M.F., Bulek, K., Xiao, H., Yu, M., Gao, J., Sun, L., Beurel, E., Kaidanovich-Beilin, O., Fox, P.L., DiCorleto, P.E., Wang, J., Qin, J., Wald, D.N., Woodgett, J.R., Jope, R.S., Carman, J., Dongre, A., Li, X., 2012. Inactivation of the Enzyme GSK3 $\alpha$  by the Kinase IKKi Promotes AKT-mTOR Signaling Pathway that Mediates Interleukin-1-Induced Th17 Cell Maintenance. *Immunity* 37, 800–812. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.019>
- Hall, G.W., Thein, S., 1994. Nonsense Codon Mutations in the Terminal Exon of the P-Globin Gene Are Not Associated With a Reduction in P-mRNA Accumulation: A Mechanism for the Phenotype of Dominant P-Thalassemia 7.
- Hanada, M., Feng, J., Hemmings, B.A., 2004. Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1697, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2003.11.009>
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., Yonezawa, K., 2002. Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. *Cell* 110, 177–189. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00833-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00833-4)
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R., Stojdl, D.F., Bell, J.C., Hettmann, T., Leiden, J.M., Ron, D., 2003. An Integrated Stress Response Regulates Amino Acid Metabolism and Resistance to Oxidative Stress. *Molecular Cell* 11, 619–633. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00105-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00105-9)
- Harigaya, Y., Parker, R., 2010. No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *WIREs RNA* 1, 132–141. <https://doi.org/10.1002/wrna.17>
- Harper, S.Q., Hauser, M.A., DelloRusso, C., Duan, D., Crawford, R.W., Phelps, S.F., Harper, H.A., Robinson, A.S., Engelhardt, J.F., Brooks, S.V., Chamberlain, J.S., 2002. Modular flexibility of dystrophin: Implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* 8, 253–261. <https://doi.org/10.1038/nm0302-253>
- Harris, A., Argent, B.E., 1993. The cystic fibrosis and its product CFTR. *Seminars in Cell Biology* 4, 37–44. <https://doi.org/10.1006/scel.1993.1005>
- Harris, S.L., Levine, A.J., 2005. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 24, 2899–2908. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208615>
- Hashem, Y., des Georges, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H.Y., Grassucci, R.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., Frank, J., 2013. Structure of the Mammalian Ribosomal 43S Preinitiation Complex Bound to the Scanning Factor DHX29. *Cell* 153, 1108–1119. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.036>
- Hastings, M.L., Krainer, A.R., 2001. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 302–309. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00212-X](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00212-X)
- Hawkins, J.D., 1988. A survey on intron and exon lengths. *Nucl Acids Res* 16, 9893–9908. <https://doi.org/10.1093/nar/16.21.9893>
- Hay, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* 18, 1926–1945. <https://doi.org/10.1101/gad.1212704>
- He, F., Brown, A.H., Jacobson, A., 1997. Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway. *Mol Cell Biol* 17, 1580–1594.
- He, F., Jacobson, A., 1995. Identification of a novel component of the nonsense-mediated mRNA decay pathway by use of an interacting protein screen. *Genes Dev.* 9, 437–454. <https://doi.org/10.1101/gad.9.4.437>
- He, L., Liu, Xinhua, Yang, J., Li, W., Liu, S., Liu, Xujun, Yang, Z., Ren, J., Wang, Y., Shan, L., Guan, C., Pei, F., Lei, L., Zhang, Y., Yi, X., Yang, X., Liang, J., Liu, R., Sun, L., Shang, Y., 2018. Imbalance of the reciprocally inhibitory loop between the ubiquitin-specific protease USP43 and EGFR/PI3K/AKT drives breast carcinogenesis. *Cell Res* 28, 934–951. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0079-6>
- Hemmings, B.A., Restuccia, D.F., 2012. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a011189–a011189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
- Hendry, L.B., Mahesh, V.B., Bransome, E.D., Ewing, D.E., 2007. Small molecule intercalation with double stranded DNA: Implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 623, 53–71. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.03.009>
- Heo, Y.-A., 2020. Golodirsen: First Approval. *Drugs* 80, 329–333. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01267-2>
- Héron-Milhavet, L., Franckhauser, C., Rana, V., Berthenet, C., Fisher, D., Hemmings, B.A., Fernandez, A., Lamb, N.J.C., 2006. Only Akt1 Is Required for Proliferation, while Akt2 Promotes Cell Cycle Exit through p21 Binding. *MCB* 26, 8267–8280. <https://doi.org/10.1128/MCB.00201-06>

- Hers, I., Vincent, E.E., Tavaré, J.M., 2011. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling* 23, 1515–1527. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.05.004>
- Hieronymus, H., 2004. Genome-wide mRNA surveillance is coupled to mRNA export. *Genes & Development* 18, 2652–2662. <https://doi.org/10.1101/gad.1241204>
- Higgs, D.R., Goodbourn, S.E., Lamb, J., Clegg, J.B., Weatherall, D.J., Proudfoot, N.J., 1983. Alpha-thalassaemia caused by a polyadenylation signal mutation. *Nature* 306, 398–400. <https://doi.org/10.1038/306398a0>
- Hill, M.M., Andjelkovic, M., Brazil, D.P., Ferrari, S., Fabbro, D., Hemmings, B.A., 2001. Insulin-stimulated Protein Kinase B Phosphorylation on Ser-473 Is Independent of Its Activity and Occurs through a Staurosporine-insensitive Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 276, 25643–25646. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100174200>
- Hinz, N., Jücker, M., 2019. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Commun Signal* 17, 154. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0450-3>
- Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P.K., Pan, B.-S., Kotani, H., 2010. MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs *In vitro* and *In vivo*. *Mol Cancer Ther* 9, 1956–1967. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1012>
- Hocine, S., Singer, R.H., Grunwald, D., 2010. RNA Processing and Export. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2, a000752–a000752. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000752>
- Hodgkin, J., Papp, A., Pulak, R., Ambros, V., Anderson, P., 1989. A new kind of informational suppression in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 123, 301–313.
- Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2004. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet* 36, 801–808. <https://doi.org/10.1038/ng1403>
- Hornbeck, P.V., Chabra, I., Kornhauser, J.M., Skrzypek, E., Zhang, B., 2004. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *PROTEOMICS* 4, 1551–1561. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300772>
- Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., Katada, T., 1999. The Eukaryotic Polypeptide Chain Releasing Factor (eRF3/GSPT) Carrying the Translation Termination Signal to the 3'-Poly(A) Tail of mRNA. *Journal of Biological Chemistry* 274, 16677–16680. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.16677>
- Hosoda, N., Kim, Y.K., Lejeune, F., Maquat, L.E., 2005. CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 12, 893–901. <https://doi.org/10.1038/nsmb995>
- Houseley, J., Tollervey, D., 2009. The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell* 136, 763–776. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.019>
- Huang, L., Lou, C.-H., Chan, W., Shum, E.Y., Shao, A., Stone, E., Karam, R., Song, H.-W., Wilkinson, M.F., 2011. RNA homeostasis governed by cell type-specific and branched feedback loops acting on NMD. *Mol. Cell* 43, 950–961. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.031>
- Huang, L., Wilkinson, M.F., 2012. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: Regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *WIREs RNA* 3, 807–828. <https://doi.org/10.1002/wrna.1137>
- Huang, W.-C., Chen, C.-C., 2005. Akt Phosphorylation of p300 at Ser-1834 Is Essential for Its Histone Acetyltransferase and Transcriptional Activity. *Mol Cell Biol* 25, 6592–6602. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.15.6592-6602.2005>
- Huang, Y.J., LiPuma, J.J., 2016. The Microbiome in Cystic Fibrosis. *Clinics in Chest Medicine* 37, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2015.10.003>
- Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I., Kovacevic, Z., Lesovoy, V., Schmidt-Wolf, I.G.H., Barbarash, O., Gokmen, E., O'Toole, T., Lustgarten, S., Moore, L., Motzer, R.J., 2007. Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 356, 2271–2281. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa066838>
- Humphries, R., Ley, T., Anagnou, N., Baur, A., Nienhuis, A., 1984. Beta O-39 thalassemia gene: a premature termination codon causes beta-mRNA deficiency without affecting cytoplasmic beta-mRNA stability.
- 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. <https://doi.org/10.1261/rna.1386208>
- Hussain, K., Challis, B., Rocha, N., Payne, F., Minic, M., Thompson, A., Daly, A., Scott, C., Harris, J., Smillie, B.J.L., Savage, D.B., Ramaswami, U., De Lonlay, P., O'Rahilly, S., Barroso, I., Sempke, R.K., 2011. An Activating Mutation of AKT2 and Human Hypoglycemia. *Science* 334, 474–474. <https://doi.org/10.1126/science.1210878>
- Hwang, J., Sato, H., Tang, Y., Matsuda, D., Maquat, L.E., 2010. UPF1 Association with the Cap-Binding Protein, CBP80, Promotes Nonsense-Mediated mRNA Decay at Two Distinct Steps. *Molecular Cell* 39, 396–409. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.004>
- Hyoda, T., Tsujioka, T., Nakahara, T., Suemori, S., Okamoto, S., Kataoka, M., Tohyama, K., 2015. Rigosertib induces cell death of a myelodysplastic syndrome-derived cell line by DNA damage-induced G2/M arrest. *Cancer Sci* 106, 287–293. <https://doi.org/10.1111/cas.12605>
- Imamachi, N., Tani, H., Akimitsu, N., 2012. Up-frameshift protein 1 (UPF1): multitasking entertainer in RNA decay. *Drug Discov Ther* 6, 55–61.

- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Lührmann, R., Achsel, T., 2002. The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrml in distinct cytoplasmic foci. *RNA* 8, 1489–1501.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., Guan, K.-L., 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648–657. <https://doi.org/10.1038/ncb839>
- Inoue, K., Khajavi, M., Ohyama, T., Hirabayashi, S., Wilson, J., Reggin, J.D., Mancias, P., Butler, I.J., Wilkinson, M.F., Wegner, M., Lupski, J.R., 2004. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* 36, 361–369. <https://doi.org/10.1038/ng1322>
- Inoue, K., Ohyama, T., Sakuragi, Y., Yamamoto, R., Inoue, N.A., Li-Hua, Y., Goto, Y. -i., Wegner, M., Lupski, J.R., 2007. Translation of SOX10 3' untranslated region causes a complex severe neurocristopathy by generation of a deleterious functional domain. *Human Molecular Genetics* 16, 3037–3046. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm262>
- Irie, H.Y., Pearline, R.V., Grueneberg, D., Hsia, M., Ravichandran, P., Kothari, N., Natesan, S., Brugge, J.S., 2005. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial–mesenchymal transition. *Journal of Cell Biology* 171, 1023–1034. <https://doi.org/10.1083/jcb.200505087>
- Ishigaki, Yasuhito, Li, X., Serin, G., Maquat, L.E., 2001. Evidence for a Pioneer Round of mRNA Translation. *Cell* 106, 607–617. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00475-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00475-5)
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., Maquat, L.E., 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell* 106, 607–617. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00475-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00475-5)
- Isken, O., Kim, Y.K., Hosoda, N., Mayeur, G.L., Hershey, J.W.B., Maquat, L.E., 2008. Upf1 Phosphorylation Triggers Translational Repression during Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Cell* 133, 314–327. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.030>
- Isken, O., Maquat, L.E., 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet* 9, 699–712. <https://doi.org/10.1038/nrg2402>
- Ivanov, A., Mikhailova, T., Eliseev, B., Yeramala, L., Sokolova, E., Susorov, D., Shuvalov, A., Schaffitzel, C., Alkalaeva, E., 2016. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Res* 44, 7766–7776. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw635>
- Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2008. Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* 27, 736–747. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.17>
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., Su, B., 2006. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* 127, 125–137. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.033>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrm2838>
- Janku, F., Yap, T.A., Meric-Bernstam, F., 2018. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol* 15, 273–291. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.28>
- Jia, J., Furlan, A., Gonzalez-Hilarion, S., Leroy, C., Gruenert, D.C., Tulasne, D., Lejeune, F., 2015. Caspases shutdown nonsense-mediated mRNA decay during apoptosis. *Cell Death Differ* 22, 1754–1763. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.18>
- Jia, J., Werkmeister, E., Gonzalez-Hilarion, S., Leroy, C., Gruenert, D.C., Lafont, F., Tulasne, D., Lejeune, F., 2017. Premature termination codon readthrough in human cells occurs in novel cytoplasmic foci and requires UPF proteins. *J Cell Sci* 130, 3009–3022. <https://doi.org/10.1242/jcs.198176>
- Jiao, X., Chang, J.H., Kilic, T., Tong, L., Kiledjian, M., 2013. A Mammalian Pre-mRNA 5' End Capping Quality Control Mechanism and an Unexpected Link of Capping to Pre-mRNA Processing. *Molecular Cell* 50, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.02.017>
- Jones, P.F., Jakubowicz, T., Pitossi, F.J., Maurer, F., Hemmings, B.A., 1991. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 4171–4175. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.10.4171>
- Kadlec, J., Izaurralde, E., Cusack, S., 2004. The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nat Struct Mol Biol* 11, 330–337. <https://doi.org/10.1038/nsmb741>
- Kaizuka, T., Hara, T., Oshiro, N., Kikkawa, U., Yonezawa, K., Takehana, K., Iemura, S., Natsume, T., Mizushima, N., 2010. Tti1 and Tel2 Are Critical Factors in Mammalian Target of Rapamycin Complex Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 285, 20109–20116. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121699>
- Kalyna, M., Simpson, C.G., Syed, N.H., Lewandowska, D., Marquez, Y., Kusenda, B., Marshall, J., Fuller, J., Cardle, L., McNicol, J., Dinh, H.Q., Barta, A., Brown, J.W.S., 2012. Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research* 40, 2454–2469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr932>

- Kane, L.P., Shapiro, V.S., Stokoe, D., Weiss, A., 1999. Induction of NF- $\kappa$ B by the Akt/PKB kinase. *Current Biology* 9, 601–S1. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80265-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80265-6)
- Karam, R., Carvalho, J., Bruno, I., Graziadio, C., Senz, J., Huntsman, D., Carneiro, F., Seruca, R., Wilkinson, M.F., Oliveira, C., 2008. The NMD mRNA surveillance pathway downregulates aberrant E-cadherin transcripts in gastric cancer cells and in CDH1 mutation carriers. *Oncogene* 27, 4255–4260. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.62>
- Karam, R., Lou, C., Kroeger, H., Huang, L., Lin, J.H., Wilkinson, M.F., 2015. The unfolded protein response is shaped by the NMD pathway. *EMBO Rep* 16, 599–609. <https://doi.org/10.15252/embr.201439696>
- Karam, R., Wengrod, J., Gardner, L.B., Wilkinson, M.F., 2013. Regulation of nonsense-mediated mRNA decay: Implications for physiology and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 624–633. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.03.002>
- Kashima, I., 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development* 20, 355–367. <https://doi.org/10.1101/gad.1389006>
- Kashima, I., Jonas, S., Jayachandran, U., Buchwald, G., Conti, E., Lupas, A.N., Izaurralde, E., 2010. SMG6 interacts with the exon junction complex via two conserved EJC-binding motifs (EBMs) required for nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 24, 2440–2450. <https://doi.org/10.1101/gad.604610>
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., Ohno, S., 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 20, 355–367. <https://doi.org/10.1101/gad.1389006>
- Käuffer, N.F., Potashkin, J., 2000. Analysis of the splicing machinery in fission yeast: a comparison with budding yeast and mammals. *Nucleic Acids Res.* 28, 3003–3010. <https://doi.org/10.1093/nar/28.16.3003>
- Kaurah, P., MacMillan, A., Boyd, N., Senz, J., De Luca, A., Chun, N., Suriano, G., Zaor, S., Van Manen, L., Gilpin, C., Nikkel, S., Connolly-Wilson, M., Weissman, S., Rubinstein, W.S., Sebold, C., Greenstein, R., Stroop, J., Yim, D., Panzini, B., McKinnon, W., Greenblatt, M., Wirtzfeld, D., Fontaine, D., Coit, D., Yoon, S., Chung, D., Lauwers, G., Pizzuti, A., Vaccaro, C., Redal, M.A., Oliveira, C., Tischkowitz, M., Olschwang, S., Gallinger, S., Lynch, H., Green, J., Ford, J., Pharoah, P., Fernandez, B., Huntsman, D., 2007. Founder and Recurrent CDH1 Mutations in Families With Hereditary Diffuse Gastric Cancer. *JAMA* 297, 2360. <https://doi.org/10.1001/jama.297.21.2360>
- Kerem, B., Chiba-Falek, O., Kerem, E., 1997. Cystic Fibrosis in Jews: Frequency and Mutation Distribution. *Genetic Testing* 1, 35–39. <https://doi.org/10.1089/gte.1997.1.35>
- Khajavi, M., Inoue, K., Lupski, J.R., 2006. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 14, 1074–1081. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201649>
- Khan, K.H., Yap, T.A., Yan, L., Cunningham, D., 2013. Targeting the PI3K-AKT-mTOR signaling network in cancer. *Chin J Cancer* 32, 253–265. <https://doi.org/10.5732/cjc.013.10057>
- Kim, S.-H., Juhn, Y.-S., Song, Y.-S., 2007. Akt Involvement in Paclitaxel Chemoresistance of Human Ovarian Cancer Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1095, 82–89. <https://doi.org/10.1196/annals.1397.012>
- Kim, Y.K., Furic, L., DesGroseillers, L., Maquat, L.E., 2005. Mammalian Staufen1 Recruits Upf1 to Specific mRNA 3'UTRs so as to Elicit mRNA Decay. *Cell* 120, 195–208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.050>
- Kim, Y.K., Maquat, L.E., 2019. UPFront and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond. *RNA* 25, 407–422. <https://doi.org/10.1261/rna.070136.118>
- Klumpen, H., Beijnen, J.H., Gurney, H., Schellens, J.H.M., 2010. Inhibitors of mTOR. *The Oncologist* 15, 1262–1269. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2010-0196>
- Knobbe, C.B., Reifenberger, G., 2006. Genetic Alterations and Aberrant Expression of Genes Related to the Phosphatidylinositol-3'-Kinase/Protein Kinase B (Akt) Signal Transduction Pathway in Glioblastomas. *Brain Pathology* 13, 507–518. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2003.tb00481.x>
- Koenig, M., Monaco, A.P., Kunkel, L.M., 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–228. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90383-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90383-2)
- Köhler, A., Hurt, E., 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 761–773. <https://doi.org/10.1038/nrm2255>
- Kole, R., Krieg, A.M., 2015. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 87, 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.008>
- Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Kuroda, S., Ono, Y., Kikkawa, U., 1997. Activation of protein kinase B (Akt/RAC-protein kinase) by cellular stress and its association with heat shock protein Hsp27. *FEBS Letters* 410, 493–498. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00541-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00541-3)
- Kozak, M., 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44, 283–292. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90762-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90762-2)
- Kozlov, G., Gehring, K., 2010. Molecular Basis of eRF3 Recognition by the MLE Domain of Poly(A)-Binding Protein. *PLoS ONE* 5, e10169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010169>



- Kramer, S., McLennan, A.G., 2019. The complex enzymology of mRNA decapping: Enzymes of four classes cleave pyrophosphate bonds. *WIREs RNA* 10, e1511. <https://doi.org/10.1002/wrna.1511>
- Krasilnikov, M., 2000. Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation.
- Kühn, U., Wahle, E., 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1678, 67–84. <https://doi.org/10.1016/j.bbexp.2004.03.008>
- Kulkarni, M., Ozgur, S., Stoecklin, G., 2010. On track with P-bodies. *Biochemical Society Transactions* 38, 242–251. <https://doi.org/10.1042/BST0380242>
- Kumar, C.C., Madison, V., 2005. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* 24, 7493–7501. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209087>
- Kumar, G.R., Glaunsinger, B.A., 2010. Nuclear import of cytoplasmic poly(A) binding protein restricts gene expression via hyperadenylation and nuclear retention of mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4996–5008. <https://doi.org/10.1128/MCB.00600-10>
- Kupriyanova, T.A., Kandror, K.V., 1999. Akt-2 Binds to Glut4-containing Vesicles and Phosphorylates Their Component Proteins in Response to Insulin. *Journal of Biological Chemistry* 274, 1458–1464. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.3.1458>
- Kurosaki, T., Maquat, L.E., 2016a. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci* 129, 461–467. <https://doi.org/10.1242/jcs.181008>
- Kurosaki, T., Maquat, L.E., 2016b. Nonsense-mediated mRNA decay in humans at a glance. *J Cell Sci* 129, 461–467. <https://doi.org/10.1242/jcs.181008>
- Łabno, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., 2016a. Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863, 3125–3147. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.023>
- Łabno, A., Warkocki, Z., Kuliński, T., Krawczyk, P.S., Bijata, K., Tomecki, R., Dziembowski, A., 2016b. Perlman syndrome nuclease DIS3L2 controls cytoplasmic non-coding RNAs and provides surveillance pathway for maturing snRNAs. *Nucleic Acids Res* gkw649. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw649>
- Labrador, M., Corces, V.G., 2003. Extensive exon reshuffling over evolutionary time coupled to trans-splicing in *Drosophila*. *Genome Res.* 13, 2220–2228. <https://doi.org/10.1101/gr.1440703>
- Labunskyy, V.M., Hatfield, D.L., Gladyshev, V.N., 2014. Selenoproteins: Molecular Pathways and Physiological Roles. *Physiological Reviews* 94, 739–777. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2013>
- Lambert, J.-M., Ashi, M.O., Srour, N., Delpy, L., Saulière, J., 2020. Mechanisms and Regulation of Nonsense-Mediated mRNA Decay and Nonsense-Associated Altered Splicing in Lymphocytes. *IJMS* 21, 1335. <https://doi.org/10.3390/ijms21041335>
- Lambert, J.-M., Srour, N., Delpy, L., 2019. The Yin and Yang of RNA surveillance in B lymphocytes and antibody-secreting plasma cells. *BMB Rep.* 52, 671–678. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.12.232>
- Lanneau, D., Brunet, M., Frisan, E., Solary, E., Fontenay, M., Garrido, C., 2008. Heat shock proteins: essential proteins for apoptosis regulation. *J Cellular Mol Med* 12, 743–761. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00273.x>
- Laplante, M., Sabatini, D.M., 2012. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell* 149, 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Lareau, L.F., Brenner, S.E., 2015. Regulation of Splicing Factors by Alternative Splicing and NMD Is Conserved between Kingdoms Yet Evolutionarily Flexible. *Molecular Biology and Evolution* 32, 1072–1079. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv002>
- Lau, C.-K., Diem, M.D., Dreyfuss, G., Van Duyne, G.D., 2003. Structure of the Y14-Magoh Core of the Exon Junction Complex. *Current Biology* 13, 933–941. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00328-2)
- Le Hir, H., 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *The EMBO Journal* 20, 4987–4997. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4987>
- Le Hir, H., Andersen, G.R., 2008. Structural insights into the exon junction complex. *Current Opinion in Structural Biology* 18, 112–119. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2007.11.002>
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., Moore, M.J., 2001. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 20, 4987–4997. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.4987>
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L.E., Moore, M.J., 2000a. The spliceosome deposits multiple proteins 20–24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *The EMBO Journal* 19, 6860–6869. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6860>
- Le Hir, H., Moore, M.J., Maquat, L.E., 2000b. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev.* 14, 1098–1108.
- Le Hir, H., Nott, A., Moore, M.J., 2003. How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00052-5)

- Le Hir, H., Saulière, J., Wang, Z., 2016. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 41–54. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.7>
- Lee, Y., Rio, D.C., 2015. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 291–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- 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. <https://doi.org/10.1101/gad.5.12a.2303>
- Lejeune, F., 2016. Triple Effect of Nonsense-Mediated mRNA Decay Inhibition as a Therapeutic Approach for Cancer. *Single Cell Biol* 5. <https://doi.org/10.4172/2168-9431.1000136>
- Lejeune, F., Cavaloc, Y., Stevenin, J., 2001. Alternative Splicing of Intron 3 of the Serine/Arginine-rich Protein 9G8 Gene. *Journal of Biological Chemistry* 276, 7850–7858. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009510200>
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., Maquat, L.E., 2002. The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J* 21, 3536–3545. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf345>
- Lejeune, F., Li, X., Maquat, L.E., 2003. Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells Involves Decapping, Deadenylation, and Exonucleolytic Activities. *Molecular Cell* 12, 675–687. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00349-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00349-6)
- Lejeune, F., Maquat, L.E., 2005. Mechanistic links between nonsense-mediated mRNA decay and pre-mRNA splicing in mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology* 17, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.03.002>
- Lejeune, F., Ranganathan, A.C., Maquat, L.E., 2004. eIF4G is required for the pioneer round of translation in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 11, 992–1000. <https://doi.org/10.1038/nsmb824>
- Lemay, J.-F., Lemieux, C., St-André, O., Bachand, F., 2010. Crossing the borders: poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biol* 7, 291–295. <https://doi.org/10.4161/rna.7.3.11649>
- Lemmon, M., Ferguson, K., 2000. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains.
- Lewis, B.P., Green, R.E., Brenner, S.E., 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 189–192. <https://doi.org/10.1073/pnas.0136770100>
- Li, D., Mastaglia, F.L., Fletcher, S., Wilton, S.D., 2018. Precision Medicine through Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon Skipping. *Trends in Pharmacological Sciences* 39, 982–994. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.09.001>
- Li, L., Lingaraju, M., Basquin, C., Basquin, J., Conti, E., 2017. Structure of a SMG8-SMG9 complex identifies a G-domain heterodimer in the NMD effector proteins. *RNA* 23, 1028–1034. <https://doi.org/10.1261/rna.061200.117>
- Li, R., Wei, J., Jiang, C., Liu, D., Deng, L., Zhang, K., Wang, P., 2013. Akt SUMOylation Regulates Cell Proliferation and Tumorigenesis. *Cancer Res* 73, 5742–5753. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0538>
- Li, S., Wilkinson, M.F., 1998a. Nonsense Surveillance in Lymphocytes? *Immunity* 8, 135–141. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80466-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80466-5)
- Li, S., Wilkinson, M.F., 1998b. Nonsense Surveillance in Lymphocytes? *Immunity* 8, 135–141. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80466-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80466-5)
- Liang, J., Zubovitz, J., Petrocelli, T., Kotchetkov, R., Connor, M.K., Han, K., Lee, J.-H., Ciarallo, S., Catzavelos, C., Beniston, R., Franssen, E., Slingerland, J.M., 2002. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. *Nat Med* 8, 1153–1160. <https://doi.org/10.1038/nm761>
- Liang, X., Wang, R., Guo, Y., Cheng, Z., Lv, D., Luo, M., He, A., Luo, S., Xia, Y., 2021. Phosphorylation of Akt at Thr308 regulates p-eNOS Ser1177 during physiological conditions. *FEBS Open Bio* 11, 1953–1964. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13194>
- Licatalosi, D.D., Darnell, R.B., 2010. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat Rev Genet* 11, 75–87. <https://doi.org/10.1038/nrg2673>
- Lim, K.R., Maruyama, R., Yokota, T., 2017. Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *DDDT Volume11*, 533–545. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97635>
- Linder, P., Jankowsky, E., 2011. From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 505–516. <https://doi.org/10.1038/nrm3154>
- Liu, C., Karam, R., Zhou, Y., Su, F., Ji, Y., Li, G., Xu, G., Lu, L., Wang, C., Song, M., Zhu, J., Wang, Y., Zhao, Y., Foo, W.C., Zuo, M., Valasek, M.A., Javle, M., Wilkinson, M.F., Lu, Y., 2014. The UPF1 RNA surveillance gene is commonly mutated in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Med* 20, 596–598. <https://doi.org/10.1038/nm.3548>
- Liu, J., 2004. Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., Parker, R., 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719–723. <https://doi.org/10.1038/ncb1274>
- Liu, P., Cheng, H., Roberts, T.M., Zhao, J.J., 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 8, 627–644. <https://doi.org/10.1038/nrd2926>

- Loh, B., Jonas, S., Izaurralde, E., 2013. The SMG5-SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4-NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. *Genes & Development* 27, 2125–2138. <https://doi.org/10.1101/gad.226951.113>
- López-Perrote, A., Castaño, R., Melero, R., Zamarro, T., Kurosawa, H., Ohnishi, T., Uchiyama, A., Aoyagi, K., Buchwald, G., Kataoka, N., Yamashita, A., Llorca, O., 2016. Human nonsense-mediated mRNA decay factor UPF2 interacts directly with eRF3 and the SURF complex. *Nucleic Acids Res.* 44, 1909–1923. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1527>
- Losson, R., Lacroute, F., 1979. Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76, 5134–5137. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.10.5134>
- Lu, J., Plank, T.-D., Su, F., Shi, X., Liu, C., Ji, Y., Li, S., Huynh, A., Shi, C., Zhu, B., Yang, G., Wu, Y., Wilkinson, M.F., Lu, Y., 2016. The nonsense-mediated RNA decay pathway is disrupted in inflammatory myofibroblastic tumors. *Journal of Clinical Investigation* 126, 3058–3062. <https://doi.org/10.1172/JCI86508>
- Lu, Q.L., Mann, C.J., Lou, F., Bou-Gharios, G., Morris, G.E., Xue, S., Fletcher, S., Partridge, T.A., Wilton, S.D., 2003. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 9, 1009–1014. <https://doi.org/10.1038/nm897>
- Lund-Palau, H., Turnbull, A.R., Bush, A., Bardin, E., Cameron, L., Soren, O., Wierre-Gore, N., Alton, E.W.F.W., Bundy, J.G., Connett, G., Faust, S.N., Filloux, A., Freemont, P., Jones, A., Khoo, V., Morales, S., Murphy, R., Pabary, R., Simbo, A., Schelenz, S., Takats, Z., Webb, J., Williams, H.D., Davies, J.C., 2016. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Review of Respiratory Medicine* 10, 685–697. <https://doi.org/10.1080/17476348.2016.1177460>
- Luo, Y., Na, Z., Slavoff, S.A., 2018. P-Bodies: Composition, Properties, and Functions. *Biochemistry* 57, 2424–2431. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162>
- Lykke-Andersen, J., 2001. Communication of the Position of Exon-Exon Junctions to the mRNA Surveillance Machinery by the Protein RNPS1. *Science* 293, 1836–1839. <https://doi.org/10.1126/science.1062786>
- Lykke-Andersen, J., Shu, M.-D., Steitz, J.A., 2000. Human Upf Proteins Target an mRNA for Nonsense-Mediated Decay When Bound Downstream of a Termination Codon. *Cell* 103, 1121–1131. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00214-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00214-2)
- Ma, Q., Tatsuno, T., Nakamura, Y., Ishigaki, Y., 2019. The stability of Magoh and Y14 depends on their heterodimer formation and nuclear localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 511, 631–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.097>
- Ma, X.M., Blenis, J., 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 307–318. <https://doi.org/10.1038/nrm2672>
- Maira, S.-M., Pecchi, S., Huang, A., Burger, M., Knapp, M., Sterker, D., Schnell, C., Guthy, D., Nagel, T., Wiesmann, M., Brachmann, S., Fritsch, C., Dorsch, M., Chène, P., Shoemaker, K., De Pover, A., Menezes, D., Martiny-Baron, G., Fabbro, D., Wilson, C.J., Schlegel, R., Hofmann, F., García-Echeverría, C., Sellers, W.R., Voliva, C.F., 2012. Identification and Characterization of NVP-BKM120, an Orally Available Pan-Class I PI3-Kinase Inhibitor. *Mol Cancer Ther* 11, 317–328. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0474>
- Mandel, C.R., Bai, Y., Tong, L., 2008. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 1099–1122. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7474-3>
- Manning, B.D., Cantley, L.C., 2007. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Manning, B.D., Toker, A., 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* 169, 381–405. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.001>
- Maquat, L.E., 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 89–99. <https://doi.org/10.1038/nrm1310>
- Maquat, L.E., 1995. When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells. *RNA* 1, 453–465.
- Maquat, L.E., Kinniburgh, A.J., Rachmilewitz, E.A., Ross, J., 1981. Unstable  $\beta$ -globin mRNA in mRNA-deficient  $\beta$ 0 thalassemia. *Cell* 27, 543–553. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90396-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90396-2)
- Maquat, L.E., Li, X., 2001. Mammalian heat shock p70 and histone H4 transcripts, which derive from naturally intronless genes, are immune to nonsense-mediated decay. *RNA* 7, 445–456. <https://doi.org/10.1017/S1355838201002229>
- Maquat, L.E., Tam, W.-Y., Isken, O., 2010. The Pioneer Round of Translation: Features and Functions. *Cell* 142, 368–374. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.022>
- Martin, L., Grigoryan, A., Wang, D., Wang, J., Breda, L., Rivella, S., Cardozo, T., Gardner, L.B., 2014. Identification and Characterization of Small Molecules That Inhibit Nonsense-Mediated RNA Decay and Suppress Nonsense p53 Mutations. *Cancer Res* 74, 3104–3113. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2235>
- Martin, S.A., Paoletti, E., Moss, B., 1975. Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions. *J. Biol. Chem.* 250, 9322–9329.

- Martins-Dias, P., Romão, L., 2021. Nonsense suppression therapies in human genetic diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 78, 4677–4701. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03809-7>
- Masse, I., Molin, L., Mouchiroud, L., Vanhems, P., Palladino, F., Billaud, M., Solari, F., 2008. A novel role for the SMG-1 kinase in lifespan and oxidative stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 3, e3354.
- Matera, A.G., Wang, Z., 2014. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 108–121. <https://doi.org/10.1038/nrm3742>
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C.E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., Elledge, S.J., 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316, 1160–1166. <https://doi.org/10.1126/science.1140321>
- McCarthy, V.A., Harris, A., 2005. The CFTR gene and regulation of its expression. *Pediatr. Pulmonol.* 40, 1–8. <https://doi.org/10.1002/ppul.20199>
- Medghalchi, S.M., 2001. Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Human Molecular Genetics* 10, 99–105. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.2.99>
- Meister, G., Landthaler, M., Peters, L., Chen, P.Y., Urlaub, H., Lührmann, R., Tuschl, T., 2005. Identification of Novel Argonaute-Associated Proteins. *Current Biology* 15, 2149–2155. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.10.048>
- Melero, R., Buchwald, G., Castaño, R., Raabe, M., Gil, D., Lázaro, M., Urlaub, H., Conti, E., Llorca, O., 2012. The cryo-EM structure of the UPF-EJC complex shows UPF1 poised toward the RNA 3' end. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 498–505, S1-2. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2287>
- Melero, R., Uchiyama, A., Castaño, R., Kataoka, N., Kurosawa, H., Ohno, S., Yamashita, A., Llorca, O., 2014. Structures of SMG1-UPFs complexes: SMG1 contributes to regulate UPF2-dependent activation of UPF1 in NMD. *Structure* 22, 1105–1119. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.05.015>
- Mendell, J.T., Medghalchi, S.M., Lake, R.G., Noensie, E.N., Dietz, H.C., 2000. Novel Upf2p Orthologues Suggest a Functional Link between Translation Initiation and Nonsense Surveillance Complexes. *Molecular and Cellular Biology* 20, 8944–8957. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.23.8944-8957.2000>
- Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F., Dietz, H.C., 2004. Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* 36, 1073–1078. <https://doi.org/10.1038/ng1429>
- Metze, S., Herzog, V.A., Ruepp, M.-D., Muhlemann, O., 2013. Comparison of EJC-enhanced and EJC-independent NMD in human cells reveals two partially redundant degradation pathways. *RNA* 19, 1432–1448. <https://doi.org/10.1261/rna.038893.113>
- Michell, B.J., Griffiths, J.E., Mitchelhill, K.I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P.R.O., Kemp, B.E., Pearson, R.B., 1999. The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Current Biology* 9, 845-S1. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80371-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80371-6)
- Migliaccio, N., Sanges, C., Ruggiero, I., Martucci, N.M., Rippa, E., Arcari, P., Lamberti, A., 2013. Raf kinases in signal transduction and interaction with translation machinery. *BioMolecular Concepts* 4, 391–399. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0003>
- Milac, A.L., Bojarska, E., Wypijewska del Nogat, A., 2014. Decapping Scavenger (DcpS) enzyme: Advances in its structure, activity and roles in the cap-dependent mRNA metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1839, 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.04.007>
- Miller, J.N., Pearce, D.A., 2014. Nonsense-mediated decay in genetic disease: Friend or foe? *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 762, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2014.05.001>
- Millis, S.Z., Ikeda, S., Reddy, S., Gatalica, Z., Kurzrock, R., 2016. Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncol* 2, 1565. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.0891>
- Mirzaa, G.M., Conway, R.L., Gripp, K.W., Lerman-Sagie, T., Siegel, D.H., deVries, L.S., Lev, D., Kramer, N., Hopkins, E., Graham, J.M., Dobyns, W.B., 2012. Megalencephaly-capillary malformation (MCAP) and megalencephaly-polydactyly-polymicrogyria-hydrocephalus (MPPH) syndromes: Two closely related disorders of brain overgrowth and abnormal brain and body morphogenesis. *Am. J. Med. Genet.* 158A, 269–291. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34402>
- Misteli, T., Cáceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F., Spector, D.L., 1998. Serine Phosphorylation of SR Proteins Is Required for Their Recruitment to Sites of Transcription In Vivo. *J Cell Biol* 143, 297–307.
- Mitchell, P., 2014. Exosome substrate targeting: the long and short of it. *Biochemical Society Transactions* 42, 1129–1134. <https://doi.org/10.1042/BST20140088>
- Mitchell, P., Tollervey, D., 2000. mRNA stability in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 193–198. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(00\)00063-0](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(00)00063-0)
- Moelling, K., Schad, K., Bosse, M., Zimmermann, S., Schwenecker, M., 2002. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *Journal of Biological Chemistry* 277, 31099–31106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111974200>

- Mondal, S., Subramanian, K.K., Sakai, J., Bajrami, B., Luo, H.R., 2012. Phosphoinositide lipid phosphatase SHIP1 and PTEN coordinate to regulate cell migration and adhesion. *MBoC* 23, 1219–1230. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-10-0889>
- Montero, J.-A., Kilian, B., Chan, J., Bayliss, P.E., Heisenberg, C.-P., 2003. Phosphoinositide 3-Kinase Is Required for Process Outgrowth and Cell Polarization of Gastrulating Mesendodermal Cells. *Current Biology* 13, 1279–1289. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00505-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00505-0)
- Montero, J.C., Chen, X., Ocaña, A., Pandiella, A., 2012. Predominance of mTORC1 over mTORC2 in the Regulation of Proliferation of Ovarian Cancer Cells: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 11, 1342–1352. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0723>
- Moraes, K.C.M., 2010. RNA Surveillance: Molecular Approaches in Transcript Quality Control and their Implications in Clinical Diseases. *Mol Med* 16, 53–68. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00026>
- Moriarty, P.M., Reddy, C.C., Maquat, L.E., 1998. Selenium Deficiency Reduces the Abundance of mRNA for Se-Dependent Glutathione Peroxidase 1 by a UGA-Dependent Mechanism Likely To Be Nonsense Codon-Mediated Decay of Cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol* 18, 2932–2939. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.5.2932>
- Mort, M., Ivanov, D., Cooper, D.N., Chuzhanova, N.A., 2008. A meta-analysis of nonsense mutations causing human genetic disease. *Hum. Mutat.* 29, 1037–1047. <https://doi.org/10.1002/humu.20763>
- Moule, S.K., Welsh, G.I., Edgell, N.J., Foulstone, E.J., Proud, C.G., Denton, R.M., 1997. Regulation of Protein Kinase B and Glycogen Synthase Kinase-3 by Insulin and  $\beta$ -Adrenergic Agonists in Rat Epididymal Fat Cells. *Journal of Biological Chemistry* 272, 7713–7719. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.12.7713>
- Muhlemann, O., Eberle, A., Stalder, L., Zamudioorozco, R., 2008. Recognition and elimination of nonsense mRNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1779, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2008.06.012>
- Mundi, P.S., Sachdev, J., McCourt, C., Kalinsky, K., 2016. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development: AKT in cancer. *Br J Clin Pharmacol* 82, 943–956. <https://doi.org/10.1111/bcp.13021>
- Murachelli, A.G., Ebert, J., Basquin, C., Le Hir, H., Conti, E., 2012. The structure of the ASAP core complex reveals the existence of a Pinin-containing PSAP complex. *Nat Struct Mol Biol* 19, 378–386. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2242>
- Muramatsu, T., Heckmann, K., Kitanaka, C., Kuchino, Y., 2001. Molecular mechanism of stop codon recognition by eRF1: a wobble hypothesis for peptide anticodons. *FEBS Letters* 488, 105–109. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02391-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02391-7)
- Nagarajan, V.K., Jones, C.I., Newbury, S.F., Green, P.J., 2013. XRN 5'→3' exoribonucleases: Structure, mechanisms and functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 590–603. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2013.03.005>
- Nagy, E., Maquat, L.E., 1998. A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 198–199. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01208-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01208-0)
- Neu-Yilik, G., Gehring, N.H., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., 2004. Nonsense-mediated mRNA decay: from vacuum cleaner to Swiss army knife. *Genome Biol* 5, 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-4-218>
- Neu-Yilik, G., Raimondeau, E., Eliseev, B., Yeramala, L., Amthor, B., Deniaud, A., Huard, K., Kerschgens, K., Hentze, M.W., Schaffitzel, C., Kulozik, A.E., 2017. Dual function of UPF3B in early and late translation termination. *EMBO J* 36, 2968–2986. <https://doi.org/10.15252/embj.201797079>
- New, D.C., Wu, K., Kwok, A.W.S., Wong, Y.H., 2007. G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis: Regulation of Akt signaling pathways by GPCRs. *FEBS Journal* 274, 6025–6036. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06116.x>
- New drug: Lumacaftor/ivacaftor for cystic fibrosis, 2019. *Aust Prescr* 42, 170–171. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2019.058>
- Nguyen, L.S., Jolly, L., Shoubridge, C., Chan, W.K., Huang, L., Laumonier, F., Raynaud, M., Hackett, A., Field, M., Rodriguez, J., Srivastava, A.K., Lee, Y., Long, R., Addington, A.M., Rapoport, J.L., Suren, S., Hahn, C.N., Gamble, J., Wilkinson, M.F., Corbett, M.A., Gecz, J., 2012. Transcriptome profiling of UPF3B/NMD-deficient lymphoblastoid cells from patients with various forms of intellectual disability. *Mol Psychiatry* 17, 1103–1115. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.163>
- Nicholson, P., Gkratsou, A., Josi, C., Colombo, M., Mühlemann, O., 2018. Dissecting the functions of SMG5, SMG7, and PNR2 in nonsense-mediated mRNA decay of human cells. *RNA* 24, 557–573. <https://doi.org/10.1261/rna.063719.117>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gku645>
- Niederberger, T., Hartung, S., Hopfner, K.-P., Tresch, A., 2011. Processive RNA decay by the exosome: Merits of a quantitative Bayesian sampling approach. *RNA Biology* 8, 55–60. <https://doi.org/10.4161/rna.8.1.14067>
- Noble, C.G., Song, H., 2007. MLN51 Stimulates the RNA-Helicase Activity of eIF4AIII. *PLoS ONE* 2, e303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000303>

- Nogueira, G., Fernandes, R., García-Moreno, J.F., Romão, L., 2021. Nonsense-mediated RNA decay and its bipolar function in cancer. *Mol Cancer* 20, 72. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01364-0>
- Nungaray, N., Arriola, M., Gutierrez, M.J., Oliva, E., Hernández, E., Gonzalez, E., Andres, A., Morales, J.M., 2005. Rapamycin at Six Years Can Exhibit Normal Renal Function Without Proteinuria or Neoplasia After Renal Transplantation. A Single-Center Experience. *Transplantation Proceedings* 37, 3727–3728. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.09.125>
- Obata, T., Yaffe, M.B., Leparo, G.G., Piro, E.T., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Kikkawa, R., Cantley, L.C., 2000. Peptide and Protein Library Screening Defines Optimal Substrate Motifs for AKT/PKB. *Journal of Biological Chemistry* 275, 36108–36115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005497200>
- Ogami, K., Chen, Y., Manley, J., 2018. RNA Surveillance by the Nuclear RNA Exosome: Mechanisms and Significance. *ncRNA* 4, 8. <https://doi.org/10.3390/ncrna4010008>
- Ogawara, Y., Kishishita, S., Obata, T., Isazawa, Y., Suzuki, T., Tanaka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2002. Akt Enhances Mdm2-mediated Ubiquitination and Degradation of p53. *Journal of Biological Chemistry* 277, 21843–21850. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109745200>
- Ohnishi, T., Yamashita, A., Kashima, I., Schell, T., Anders, K.R., Grimson, A., Hachiya, T., Hentze, M.W., Anderson, P., Ohno, S., 2003. Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* 12, 1187–1200. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00443-x](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00443-x)
- Okada, M., Jang, S.-W., Ye, K., 2008. Akt phosphorylation and nuclear phosphoinositide association mediate mRNA export and cell proliferation activities by ALY. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 8649–8654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802533105>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr791>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.020>
- Palma, M., Lejeune, F., 2021. Deciphering the molecular mechanism of stop codon readthrough. *Biol Rev* 96, 310–329. <https://doi.org/10.1111/brv.12657>
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., Blencowe, B.J., 2008. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* 40, 1413–1415. <https://doi.org/10.1038/ng.259>
- Pap, M., Cooper, G.M., 1998. Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway. *Journal of Biological Chemistry* 273, 19929–19932. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.19929>
- Paranjape, S.M., Mogayzel, P.J., 2018. Cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Paediatric Respiratory Reviews* 25, 64–72. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2017.03.001>
- Park, E., Maquat, L.E., 2013. Staufen-mediated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 4, 423–435. <https://doi.org/10.1002/wrna.1168>
- Park, J., Ahn, S., Jayabalan, A.K., Ohn, T., Koh, H.C., Hwang, J., 2016. Insulin Signaling Augments eIF4E-Dependent Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1859, 896–905. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.12.006>
- Park, S.A., Ahn, S.I., Gallo, J.-M., 2016. Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *BMB Reports* 49, 405–413. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.8.084>
- Park, S.Y., Ryu, J., Lee, W., 2005. O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Exp Mol Med* 37, 220–229. <https://doi.org/10.1038/emm.2005.30>
- Parker, R., Sheth, U., 2007. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell* 25, 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>
- Pastor, F., Kolonias, D., Giangrande, P.H., Gilboa, E., 2010. Induction of tumour immunity by targeted inhibition of nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 465, 227–230. <https://doi.org/10.1038/nature08999>
- Pawlicka, K., Kalathiya, U., Alfaro, J., 2020. Nonsense-Mediated mRNA Decay: Pathologies and the Potential for Novel Therapeutics. *Cancers* 12, 765. <https://doi.org/10.3390/cancers12030765>
- Pearce, L.R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A.F.M., Gourlay, R., Magnuson, M.A., Alessi, D.R., 2007. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochemical Journal* 405, 513–522. <https://doi.org/10.1042/BJ20070540>
- Peng, X. -d., 2003. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes & Development* 17, 1352–1365. <https://doi.org/10.1101/gad.1089403>

- Pérez-García, M.J., Ceña, V., de Pablo, Y., Llovera, M., Comella, J.X., Soler, R.M., 2004. Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Increases Intracellular Calcium Concentration. *Journal of Biological Chemistry* 279, 6132–6142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308367200>
- Perkins, N.D., 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrm2083>
- Perrin-Vidoz, L., 2002. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Human Molecular Genetics* 11, 2805–2814. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.23.2805>
- Peso, L. d., 1997. Interleukin-3-Induced Phosphorylation of BAD Through the Protein Kinase Akt. *Science* 278, 687–689. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.687>
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., Hellen, C.U.T., 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 7029–7036. <https://doi.org/10.1073/pnas.111145798>
- Peterson, R.T., Schreiber, S.L., 1999. Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Current Biology* 9, R521–R524. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80326-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80326-1)
- Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., Sabatini, D.M., 2009. DEPTOR Is an mTOR Inhibitor Frequently Overexpressed in Multiple Myeloma Cells and Required for Their Survival. *Cell* 137, 873–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.046>
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S.V., Hainaut, P., Olivier, M., 2007. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 28, 622–629. <https://doi.org/10.1002/humu.20495>
- Pichavant, C., Aartsma-Rus, A., Clemens, P.R., Davies, K.E., Dickson, G., Takeda, S., Wilton, S.D., Wolff, J.A., Wooddell, C.I., Xiao, X., Tremblay, J.P., 2011. Current Status of Pharmaceutical and Genetic Therapeutic Approaches to Treat DMD. *Molecular Therapy* 19, 830–840. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.59>
- Pisarev, A.V., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2007. Recycling of Eukaryotic Posttermination Ribosomal Complexes. *Cell* 131, 286–299. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.041>
- 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. *Molecular Cell* 37, 196–210. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.034>
- Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., 2014. eIF5 and eIF5B together stimulate 48S initiation complex formation during ribosomal scanning. *Nucleic Acids Research* 42, 12052–12069. <https://doi.org/10.1093/nar/gku877>
- Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Komar, A.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., 2008. Translation Initiation on Mammalian mRNAs with Structured 5'UTRs Requires DEXH-Box Protein DHX29. *Cell* 135, 1237–1250. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.037>
- Popp, M.W., Maquat, L.E., 2018. Nonsense-mediated mRNA Decay and Cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 48, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.10.007>
- Popp, M.W., Maquat, L.E., 2015a. Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay facilitates the response to chemotherapeutics. *Nat Commun* 6, 6632. <https://doi.org/10.1038/ncomms7632>
- Popp, M.W., Maquat, L.E., 2015b. Attenuation of nonsense-mediated mRNA decay facilitates the response to chemotherapeutics. *Nat Commun* 6, 6632. <https://doi.org/10.1038/ncomms7632>
- Popp, M.W.-L., Maquat, L.E., 2014. The dharmas of nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Mol. Cells* 37, 1–8. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2193>
- Popp, M.W.-L., Maquat, L.E., 2013. Organizing Principles of Mammalian Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Annu. Rev. Genet.* 47, 139–165. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-111212-133424>
- Proudfoot, N.J., Furger, A., Dye, M.J., 2002. Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell* 108, 501–512. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00617-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00617-7)
- Pulak, R., Anderson, P., 1993. mRNA surveillance by the *Caenorhabditis elegans* smg genes. *Genes Dev.* 7, 1885–1897. <https://doi.org/10.1101/gad.7.10.1885>
- Qian, Y., Corum, L., Meng, Q., Blenis, J., Zheng, J.Z., Shi, X., Flynn, D.C., Jiang, B.-H., 2004. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 286, C153–C163. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00142.2003>
- Ragon, B.K., Kantarjian, H., Jabbour, E., Ravandi, F., Cortes, J., Borthakur, G., DeBose, L., Zeng, Z., Schneider, H., Pemmaraju, N., Garcia-Manero, G., Kornblau, S., Wierda, W., Burger, J., DiNardo, C.D., Andreeff, M., Konopleva, M., Daver, N., 2017. Buparlisib, a PI3K inhibitor, demonstrates acceptable tolerability and preliminary activity in a phase I trial of patients with advanced leukemias: Buparlisib in Advanced Leukemia. *Am. J. Hematol.* 92, 7–11. <https://doi.org/10.1002/ajh.24568>
- Reed, R., Maniatis, T., 1988. The role of the mammalian branchpoint sequence in pre-mRNA splicing. *Genes & Development* 2, 1268–1276. <https://doi.org/10.1101/gad.2.10.1268>

- Rees, D.C., Johnson, E., Lewinson, O., 2009. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 218–227. <https://doi.org/10.1038/nrm2646>
- Reichenbach, P., Höss, M., Azzalin, C.M., Nabholz, M., Bucher, P., Lingner, J., 2003. Azzalin and Lingner. *Current Biology* 13, 568–574. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00173-8)
- Rena, G., Guo, S., Cichy, S.C., Unterman, T.G., Cohen, P., 1999. Phosphorylation of the Transcription Factor Forkhead Family Member FKHR by Protein Kinase B. *Journal of Biological Chemistry* 274, 17179–17183. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17179>
- Revathidevi, S., Munirajan, A.K., 2019. Akt in cancer: Mediator and more. *Seminars in Cancer Biology* 59, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.002>
- Riggio, M., Perrone, M.C., Polo, M.L., Rodriguez, M.J., May, M., Abba, M., Lanari, C., Novaro, V., 2017. AKT1 and AKT2 isoforms play distinct roles during breast cancer progression through the regulation of specific downstream proteins. *Sci Rep* 7, 44244. <https://doi.org/10.1038/srep44244>
- Risso, G., Blaustein, M., Pozzi, B., Mammi, P., Srebrow, A., 2015. Akt/PKB: one kinase, many modifications. *Biochemical Journal* 468, 203–214. <https://doi.org/10.1042/BJ20150041>
- Rivière, J.-B., Mirzaa, G.M., O’Roak, B.J., Beddaoui, M., Alcantara, D., Conway, R.L., St-Onge, J., Schwartzenruber, J.A., Gripp, K.W., Nikkel, S.M., Worthylake, T., Sullivan, C.T., Ward, T.R., Butler, H.E., Kramer, N.A., Albrecht, B., Armour, C.M., Armstrong, L., Caluseriu, O., Cytrynbaum, C., Drolet, B.A., Innes, A.M., Lauzon, J.L., Lin, A.E., Mancini, G.M.S., Meschino, W.S., Reggin, J.D., Saggari, A.K., Lerman-Sagie, T., Uyanik, G., Weksberg, R., Zirn, B., Beaulieu, C.L., Majewski, J., Bulman, D.E., O’Driscoll, M., Shendure, J., Graham, J.M., Boycott, K.M., Dobyns, W.B., 2012. De novo germline and postzygotic mutations in AKT3, PIK3R2 and PIK3CA cause a spectrum of related megalencephaly syndromes. *Nat Genet* 44, 934–940. <https://doi.org/10.1038/ng.2331>
- Roberts, D.J., Tan-Sah, V.P., Smith, J.M., Miyamoto, S., 2013. Akt Phosphorylates HK-II at Thr-473 and Increases Mitochondrial HK-II Association to Protect Cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry* 288, 23798–23806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.482026>
- Robey, R.B., Hay, N., 2009. Is Akt the “Warburg kinase”?—Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 19, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.11.010>
- Rodon, J., Dienstmann, R., Serra, V., Tabernero, J., 2013. Development of PI3K inhibitors: lessons learned from early clinical trials. *Nat Rev Clin Oncol* 10, 143–153. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.10>
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C., Stutz, F., 2004. Nuclear export of RNA. *Biol. Cell* 96, 639–655. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.04.014>
- Rogers, G.W., Richter, N.J., Lima, W.F., Merrick, W.C., 2001. Modulation of the Helicase Activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *Journal of Biological Chemistry* 276, 30914–30922. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100157200>
- Rössig, L., Badorff, C., Holzmann, Y., Zeiher, A.M., Dimmeler, S., 2002. Glycogen Synthase Kinase-3 Couples AKT-dependent Signaling to the Regulation of p21Cip1 Degradation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 9684–9689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106157200>
- Rowntree, R.K., Harris, A., 2003. The Phenotypic Consequences of CFTR Mutations. *Ann Human Genet* 67, 471–485. <https://doi.org/10.1046/j.1469-1809.2003.00028.x>
- Roy, H.K., 2002. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23, 201–205. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.1.201>
- Rufener, S.C., Mühlemann, O., 2013. eIF4E-bound mRNPs are substrates for nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol* 20, 710–717. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2576>
- Sable, C.L., Filippa, N., Hemmings, B., Van Obberghen, E., 1997. cAMP stimulates protein kinase B in a Wortmannin-insensitive manner. *FEBS Letters* 409, 253–257. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00518-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00518-8)
- Sakamoto, K., Holman, G.D., 2008. Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 295, E29–E37. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90331.2008>
- Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., Sabatini, D.M., 2007. PRAS40 Is an Insulin-Regulated Inhibitor of the mTORC1 Protein Kinase. *Molecular Cell* 25, 903–915. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.003>
- Santuray, R.T., Johnson, D.E., Grandis, J.R., 2018. New Therapies in Head and Neck Cancer. *Trends in Cancer* 4, 385–396. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.03.006>
- Sarbassov, D.D., 2005. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* 307, 1098–1101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>
- Sasaki, C., Lin, H., Morin, P., Longo, D., 2000. Truncation of the extracellular region abrogates cell contact but retains the growth-suppressive activity of E-cadherin. *Cancer Res*.
- Saulière, J., Murigneux, V., Wang, Z., Marquet, E., Barbosa, I., Le Tonquèze, O., Audic, Y., Paillard, L., Crollius, H.R., Le Hir, H., 2012. CLIP-seq of eIF4AIII reveals transcriptome-wide mapping of the human exon junction complex. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1124–1131. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2420>



- Saura, C., Roda, D., Roselló, S., Oliveira, M., Macarulla, T., Pérez-Fidalgo, J.A., Morales-Barrera, R., Sanchis-García, J.M., Musib, L., Budha, N., Zhu, J., Nannini, M., Chan, W.Y., Sanabria Bohórquez, S.M., Meng, R.D., Lin, K., Yan, Y., Patel, P., Baselga, J., Tabernero, J., Cervantes, A., 2017. A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive AKT Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of AKT in Patients with Solid Tumors. *Cancer Discov* 7, 102–113. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0512>
- Scaglioni, D., Catapano, F., Ellis, M., Torelli, S., Chambers, D., Feng, L., Beck, M., Sewry, C., Monforte, M., Harriman, S., Koenig, E., Malhotra, J., Popplewell, L., Guglieri, M., Straub, V., Mercuri, E., Servais, L., Phadke, R., Morgan, J., Muntoni, F., 2021. The administration of antisense oligonucleotide golodirsen reduces pathological regeneration in patients with Duchenne muscular dystrophy. *acta neuropathol commun* 9, 7. <https://doi.org/10.1186/s40478-020-01106-1>
- Schell, T., Köcher, T., Wilm, M., Seraphin, B., Kulozik, A.E., Hentze, M.W., 2003. Complexes between the nonsense-mediated mRNA decay pathway factor human upf1 (up-frameshift protein 1) and essential nonsense-mediated mRNA decay factors in HeLa cells. *Biochemical Journal* 373, 775–783. <https://doi.org/10.1042/bj20021920>
- Schmidt, M., Fernandez de Mattos, S., van der Horst, A., Klompaker, R., Kops, G.J.P.L., Lam, E.W.-F., Burgering, B.M.T., Medema, R.H., 2002. Cell Cycle Inhibition by FoxO Forkhead Transcription Factors Involves Downregulation of Cyclin D. *MCB* 22, 7842–7852. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.22.7842-7852.2002>
- Schmucker, D., Clemens, J.C., Shu, H., Worby, C.A., Xiao, J., Muda, M., Dixon, J.E., Zipursky, S.L., 2000. Drosophila Dscam Is an Axon Guidance Receptor Exhibiting Extraordinary Molecular Diversity. *Cell* 101, 671–684. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80878-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80878-8)
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., Tollervy, 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. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn1020>
- Schoenberg, D.R., 2011. Mechanisms of endonuclease-mediated mRNA decay: Endonuclease-mediated mRNA decay. *WIREs RNA* 2, 582–600. <https://doi.org/10.1002/wrna.78>
- Schwerk, C., Prasad, J., Degenhardt, K., Erdjument-Bromage, H., White, E., Tempst, P., Kidd, V.J., Manley, J.L., Lahti, J.M., Reinberg, D., 2003. ASAP, a Novel Protein Complex Involved in RNA Processing and Apoptosis. *MCB* 23, 2981–2990. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2981-2990.2003>
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., Ambros, V., 2004. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5, R13. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r13>
- Serin, G., Gersappe, A., Black, J.D., Aronoff, R., Maquat, L.E., 2001. Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.* 21, 209–223. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.1.209-223.2001>
- Seyedali, A., Berry, M.J., 2014. Nonsense-mediated decay factors are involved in the regulation of selenoprotein mRNA levels during selenium deficiency. *RNA* 20, 1248–1256. <https://doi.org/10.1261/rna.043463.113>
- Shaheen, R., Anazi, S., Ben-Omran, T., Seidahmed, M.Z., Caddle, L.B., Palmer, K., Ali, R., Alshidi, T., Hagos, S., Goodwin, L., Hashem, M., Wakil, S.M., Abouelhoda, M., Colak, D., Murray, S.A., Alkuraya, F.S., 2016. Mutations in SMG9, Encoding an Essential Component of Nonsense-Mediated Decay Machinery, Cause a Multiple Congenital Anomaly Syndrome in Humans and Mice. *Am. J. Hum. Genet.* 98, 643–652. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.02.010>
- Shatkin, A.J., 1976. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9, 645–653. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(76\)90128-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(76)90128-8)
- Shepard, P.J., Hertel, K.J., 2009. The SR protein family. *Genome Biol* 10, 242. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-10-242>
- Sheppard, D.N., Carson, M.R., Ostedgaard, L.S., Denning, G.M., Welsh, M.J., 1994. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in a model epithelium. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 266, L405–L413. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1994.266.4.L405>
- Sheth, U., Parker, R., 2006. Targeting of Aberrant mRNAs to Cytoplasmic Processing Bodies. *Cell* 125, 1095–1109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.037>
- Sheth, U., Parker, R., 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808. <https://doi.org/10.1126/science.1082320>
- Shi, Z., Yu, X., Yuan, M., Lv, W., Feng, T., Bai, R., Zhong, H., 2019. Activation of the PERK-ATF4 pathway promotes chemoresistance in colon cancer cells. *Sci Rep* 9, 3210. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39547-x>
- Shin, I., Yakes, F.M., Rojo, F., Shin, N.-Y., Bakin, A.V., Baselga, J., Arteaga, C.L., 2002. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med* 8, 1145–1152. <https://doi.org/10.1038/nm759>
- Shirley, R.L., Ford, A.S., Richards, M.R., Albertini, M., Culbertson, M.R., 2002. Nuclear import of Upf3p is mediated by importin- $\alpha$ - $\beta$  and export to the cytoplasm is required for a functional nonsense-mediated mRNA decay pathway in yeast. *Genetics* 161, 1465–1482.

- Shirley, R.L., Lelivelt, M.J., Schenkman, L.R., Dahlseid, J.N., Culbertson, M.R., 1998. A factor required for nonsense-mediated mRNA decay in yeast is exported from the nucleus to the cytoplasm by a nuclear export signal sequence. *J. Cell. Sci.* 111 ( Pt 21), 3129–3143.
- Shum, E.Y., Jones, S.H., Shao, A., Dumdie, J., Krause, M.D., Chan, W.-K., Lou, C.-H., Espinoza, J.L., Song, H.-W., Phan, M.H., Ramaiah, M., Huang, L., McCarrey, J.R., Peterson, K.J., De Rooij, D.G., Cook-Andersen, H., Wilkinson, M.F., 2016. The Antagonistic Gene Paralogs Upf3a and Upf3b Govern Nonsense-Mediated RNA Decay. *Cell* 165, 382–395. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.046>
- Sierakowska, H., Sambade, M.J., Agrawal, S., Kole, R., 1996. Repair of thalassemic human  $\alpha$ -globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 12840–12844. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.12840>
- Silva, A.L., Romão, L., 2009. The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: To decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Letters* 583, 499–505. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.12.058>
- Singh, G., Jakob, S., Kleedehn, M.G., Lykke-Andersen, J., 2007. Communication with the Exon-Junction Complex and Activation of Nonsense-Mediated Decay by Human Upf Proteins Occur in the Cytoplasm. *Molecular Cell* 27, 780–792. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.030>
- Singh, G., Kucukural, A., Cenik, C., Leszyk, J.D., Shaffer, S.A., Weng, Z., Moore, M.J., 2012. The Cellular EJC Interactome Reveals Higher-Order mRNP Structure and an EJC-SR Protein Nexus. *Cell* 151, 750–764. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.007>
- Singh, G., Rebbapragada, I., Lykke-Andersen, J., 2008. A Competition between Stimulators and Antagonists of Upf Complex Recruitment Governs Human Nonsense-Mediated mRNA Decay. *PLoS Biol* 6, e111. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060111>
- Skeen, J.E., Bhaskar, P.T., Chen, C.-C., Chen, W.S., Peng, X., Nogueira, V., Hahn-Windgassen, A., Kiyokawa, H., Hay, N., 2006. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell* 10, 269–280. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.08.022>
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A.G., 2009. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136, 731–745. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.042>
- Song, G., Ouyang, G., Bao, S., 2005. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cellular Mol Med* 9, 59–71. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x>
- Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A., Barford, D., 2000. The Crystal Structure of Human Eukaryotic Release Factor eRF1—Mechanism of Stop Codon Recognition and Peptidyl-tRNA Hydrolysis. *Cell* 100, 311–321. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80667-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80667-4)
- Song, M., Bode, A.M., Dong, Z., Lee, M.-H., 2019. AKT as a Therapeutic Target for Cancer. *Cancer Res* 79, 1019–1031. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-2738>
- Soussi, T., Wiman, K.G., 2015. TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ* 22, 1239–1249. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.53>
- Staal, S.P., Hartley, J.W., Rowe, W.P., 1977. Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74, 3065–3067. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.7.3065>
- Steitz, T.A., 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 242–253. <https://doi.org/10.1038/nrm2352>
- Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T., 1998. Protein Kinase B Kinases That Mediate Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate-Dependent Activation of Protein Kinase B. *Science* 279, 710–714. <https://doi.org/10.1126/science.279.5351.710>
- Strambio-De-Castillia, C., Niepel, M., Rout, M.P., 2010. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 490–501. <https://doi.org/10.1038/nrm2928>
- Sun, X., Maquat, L.E., 2002. Nonsense-Mediated Decay: Assaying for Effects on Selenoprotein mRNAs, in: *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)47007-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)47007-3)
- Sundaresan, N.R., Pillai, V.B., Wolfgeher, D., Samant, S., Vasudevan, P., Parekh, V., Raghuraman, H., Cunningham, J.M., Gupta, M., Gupta, M.P., 2011. The Deacetylase SIRT1 Promotes Membrane Localization and Activation of Akt and PDK1 During Tumorigenesis and Cardiac Hypertrophy. *Science Signaling* 4, ra46–ra46. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001465>
- Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stévenin, J., Soret, J., 2001. SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *The EMBO Journal* 20, 1785–1796. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.7.1785>
- Taha, C., Liu, Z., Jin, J., Al-Hasani, H., Sonenberg, N., Klip, A., 1999. Opposite Translational Control of GLUT1 and GLUT4 Glucose Transporter mRNAs in Response to Insulin. *Journal of Biological Chemistry* 274, 33085–33091. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.33085>

- Takeshima, Y., Yagi, M., Wada, H., Ishibashi, K., Nishiyama, A., Kakumoto, M., Sakaeda, T., Saura, R., Okumura, K., Matsuo, M., 2006. Intravenous Infusion of an Antisense Oligonucleotide Results in Exon Skipping in Muscle Dystrophin mRNA of Duchenne Muscular Dystrophy. *Pediatr Res* 59, 690–694. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000215047.51278.7c>
- Takikawa, M., Ohki, R., 2017. A vicious partnership between AKT and PHLDA3 to facilitate neuroendocrine tumors. *Cancer Sci* 108, 1101–1108. <https://doi.org/10.1111/cas.13235>
- Tange, T.O., 2005. Biochemical analysis of the EJC reveals two new factors and a stable tetrameric protein core. *RNA* 11, 1869–1883. <https://doi.org/10.1261/rna.2155905>
- Tange, T.Ø., Nott, A., Moore, M.J., 2004. The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Current Opinion in Cell Biology* 16, 279–284. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.03.012>
- Tarpey, P.S., Lucy Raymond, F., Nguyen, L.S., Rodriguez, J., Hackett, A., Vandeleur, L., Smith, R., Shoubridge, C., Edkins, S., Stevens, C., O'Meara, S., Tofts, C., Barthorpe, S., Buck, G., Cole, J., Halliday, K., Hills, K., Jones, D., Mironenko, T., Perry, J., Varian, J., West, S., Widaa, S., Teague, J., Dicks, E., Butler, A., Menzies, A., Richardson, D., Jenkinson, A., Shepherd, R., Raine, K., Moon, J., Luo, Y., Parnau, J., Bhat, S.S., Gardner, A., Corbett, M., Brooks, D., Thomas, P., Parkinson-Lawrence, E., Porteous, M.E., Warner, J.P., Sanderson, T., Pearson, P., Simensen, R.J., Skinner, C., Hoganson, G., Superneau, D., Wooster, R., Bobrow, M., Turner, G., Stevenson, R.E., Schwartz, C.E., Andrew Futreal, P., Srivastava, A.K., Stratton, M.R., Géczy, J., 2007. Mutations in UPF3B, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. *Nat Genet* 39, 1127–1133. <https://doi.org/10.1038/ng2100>
- Tatsuno, T., Nakamura, Y., Ma, S., Tomosugi, N., Ishigaki, Y., 2016. Nonsense-mediated mRNA decay factor Upf2 exists in both the nucleoplasm and the cytoplasm. *Mol Med Rep* 14, 655–660. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5331>
- Tee, A.R., Anjum, R., Blenis, J., 2003. Inactivation of the Tuberous Sclerosis Complex-1 and -2 Gene Products Occurs by Phosphoinositide 3-Kinase/Akt-dependent and -independent Phosphorylation of Tuberin. *Journal of Biological Chemistry* 278, 37288–37296. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303257200>
- Thein, S.L., Hesketh, C., Taylor, P., Temperley, I.J., Hutchinson, R.M., Old, J.M., Wood, W.G., Clegg, J.B., Weatherall, D.J., 1990. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 3924–3928. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.10.3924>
- Thermann, R., 1998. Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *The EMBO Journal* 17, 3484–3494. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.12.3484>
- Thorpe, L.M., Yuzugullu, H., Zhao, J.J., 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nat Rev Cancer* 15, 7–24. <https://doi.org/10.1038/nrc3860>
- Tinguely, A., Chemin, G., Péron, S., Sirac, C., Reynaud, S., Cogné, M., Delpy, L., 2012. Cross Talk between Immunoglobulin Heavy-Chain Transcription and RNA Surveillance during B Cell Development. *Mol Cell Biol* 32, 107–117. <https://doi.org/10.1128/MCB.06138-11>
- Toker, A., Marmiroli, S., 2014. Signaling specificity in the Akt pathway in biology and disease. *Advances in Biological Regulation* 55, 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.04.001>
- Tomasetto, C., Régnier, C., Moog-Lutz, C., Mattei, M.G., Chenard, M.P., Lidereau, R., Basset, P., Rio, M.C., 1995. Identification of Four Novel Human Genes Amplified and Overexpressed in Breast Carcinoma and Localized to the q11-q21.3 Region of Chromosome 17. *Genomics* 28, 367–376. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1163>
- Toulany, M., Baumann, M., Rodemann, H.P., 2007. Stimulated PI3K-AKT Signaling Mediated through Ligand or Radiation-Induced EGFR Depends Indirectly, but not Directly, on Constitutive K-Ras Activity. *Mol Cancer Res* 5, 863–872. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0297>
- Trcek, T., Sato, H., Singer, R.H., Maquat, L.E., 2013. Temporal and spatial characterization of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & Development* 27, 541–551. <https://doi.org/10.1101/gad.209635.112>
- Trzaska, C., Amand, S., Bailly, C., Leroy, C., Marchand, V., Duvernois-Berthet, E., Saliou, J.-M., Benhabiles, H., Werkmeister, E., Chassat, T., Guilbert, R., Hannebique, D., Mouray, A., Copin, M.-C., Moreau, P.-A., Adriaenssens, E., Kulozik, A., Westhof, E., Tulasne, D., Motorin, Y., Rebuffat, S., Lejeune, F., 2020. 2,6-Diaminopurine as a highly potent corrector of UGA nonsense mutations. *Nat Commun* 11, 1509. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15140-z>
- Tschopp, O., 2005. Essential role of protein kinase B (PKB /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* 132, 2943–2954. <https://doi.org/10.1242/dev.01864>
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrud, D., Parker, R., 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 21, 1427–1436. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1427>
- Tudek, A., Lloret-Llinares, M., Jensen, T.H., 2018. The multitasking polyA tail: nuclear RNA maturation, degradation and export. *Phil. Trans. R. Soc. B* 373, 20180169. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0169>
- Tuffery-Giraud, S., Bérout, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.-P., Bernard, R., Cossée, M., Boisseau, P., Blayau, M., Creveaux, I., Guiochon-Mantel, A., de Martinville, B., Philippe, C., Monnier, N., Bieth, E., Van Kien, P.K., Desmet, F.-O., Humbertclaude, V., Kaplan, J.-C., Chelly, J., Claustres, M., 2009.

- Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* 30, 934–945. <https://doi.org/10.1002/humu.20976>
- Tzschach, A., Grasshoff, U., Beck-Woedl, S., Dufke, C., Bauer, C., Kehrer, M., Evers, C., Moog, U., Oehl-Jaschkowitz, B., Di Donato, N., Maiwald, R., Jung, C., Kuechler, A., Schulz, S., Meinecke, P., Spranger, S., Kohlhase, J., Seidel, J., Reif, S., Rieger, M., Riess, A., Sturm, M., Bickmann, J., Schroeder, C., Dufke, A., Riess, O., Bauer, P., 2015. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. *Eur J Hum Genet* 23, 1513–1518. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.5>
- Uchida, N., Hoshino, S., Katada, T., 2004. Identification of a Human Cytoplasmic Poly(A) Nuclease Complex Stimulated by Poly(A)-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 279, 1383–1391. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309125200>
- Unterholzner, L., Izaurralde, E., 2004. SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* 16, 587–596. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.10.013>
- Usuki, F., Yamashita, A., Higuchi, I., Ohnishi, T., Shiraiishi, T., Osame, M., Ohno, S., 2004. Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay rescues the phenotype in Ullrich's disease. *Ann Neurol.* 55, 740–744. <https://doi.org/10.1002/ana.20107>
- van Dijk, E., 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *The EMBO Journal* 21, 6915–6924. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf678>
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., Séraphin, B., 2002. Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J* 21, 6915–6924. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf678>
- van Hoof, A., Wagner, E.J., 2011. A brief survey of mRNA surveillance. *Trends in Biochemical Sciences* 36, 585–592. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.07.005>
- van Leeuwen, F.W., de Kleijn, D.P.V., van den Hurk, H.H., Neubauer, A., Sonnemans, M.A.F., Sluijs, J.A., Köycü, S., Ramdijlal, R.D.J., Salehi, A., Martens, G.J.M., Grosveld, F.G., Burbach, J.P.H., Hol, E.M., 1998. Frameshift Mutants of  $\beta$  Amyloid Precursor Protein and Ubiquitin-B in Alzheimer's and Down Patients. *Science* 279, 242–247. <https://doi.org/10.1126/science.279.5348.242>
- Vanhaesebroeck, B., Stephens, L., Hawkins, P., 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 195–203. <https://doi.org/10.1038/nrm3290>
- Visa, N., Alzhanova-Ericsson, A.T., Sun, X., Kiseleva, E., Björkroth, B., Wurtz, T., Daneholt, B., 1996. A Pre-mRNA-Binding Protein Accompanies the RNA from the Gene through the Nuclear Pores and into Polysomes. *Cell* 84, 253–264. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80980-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80980-0)
- Vitari, A.C., Deak, M., Collins, B.J., Morrice, N., Prescott, A.R., Phelan, A., Humphreys, S., Alessi, D.R., 2004. WNK1, the kinase mutated in an inherited high-blood-pressure syndrome, is a novel PKB (protein kinase B)/Akt substrate. *Biochemical Journal* 378, 257–268. <https://doi.org/10.1042/bj20031692>
- Voit, T., Topaloglu, H., Straub, V., Muntoni, F., Deconinck, N., Campion, G., De Kimpe, S.J., Eagle, M., Guglieri, M., Hood, S., Liefwaard, L., Loubakos, A., Morgan, A., Nakielny, J., Quarcoo, N., Ricotti, V., Rolfe, K., Servais, L., Wardell, C., Wilson, R., Wright, P., Kraus, J.E., 2014. Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *The Lancet Neurology* 13, 987–996. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70195-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70195-4)
- von Arnim, A.G., Jia, Q., Vaughn, J.N., 2014. Regulation of plant translation by upstream open reading frames. *Plant Science* 214, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.09.006>
- Wagner, E., Lykke-Andersen, J., 2002. mRNA surveillance: the perfect persist. *J. Cell Sci.* 115, 3033.
- Wahl, M.C., Will, C.L., Lührmann, R., 2009. The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* 136, 701–718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>
- Walker, E.H., Pacold, M.E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P.T., Wymann, M.P., Williams, R.L., 2000. Structural Determinants of Phosphoinositide 3-Kinase Inhibition by Wortmannin, LY294002, Quercetin, Myricetin, and Staurosporine. *Molecular Cell* 6, 909–919. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00089-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00089-4)
- Wang, D., Wengrod, J., Gardner, L.B., 2011a. Overexpression of the c-myc Oncogene Inhibits Nonsense-mediated RNA Decay in B Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 286, 40038–40043. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.266361>
- Wang, D., Zavadil, J., Martin, L., Parisi, F., Friedman, E., Levy, D., Harding, H., Ron, D., Gardner, L.B., 2011b. Inhibition of Nonsense-Mediated RNA Decay by the Tumor Microenvironment Promotes Tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 31, 3670–3680. <https://doi.org/10.1128/MCB.05704-11>
- Wang, L.-H., Wu, C.-F., Rajasekaran, N., Shin, Y.K., 2018. Loss of Tumor Suppressor Gene Function in Human Cancer: An Overview. *Cell Physiol Biochem* 51, 2647–2693. <https://doi.org/10.1159/000495956>
- Wang, W., al., 2001. The role of Upf proteins in modulating the translation read-through of nonsense-containing transcripts. *The EMBO Journal* 20, 880–890. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.4.880>
- Wang, W., Cajigas, I.J., Peltz, S.W., Wilkinson, M.F., González, C.I., 2006. Role for Upf2p Phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Mol Cell Biol* 26, 3390–3400. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.9.3390-3400.2006>

- Wang, Z., Kiledjian, M., 2001. Functional Link between the Mammalian Exosome and mRNA Decapping. *Cell* 107, 751–762. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00592-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00592-X)
- Wani, R., Qian, J., Yin, L., Bechtold, E., King, S.B., Poole, L.B., Paek, E., Tsang, A.W., Furdui, C.M., 2011. Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 10550–10555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011665108>
- Weischenfeldt, J., Damgaard, I., Bryder, D., Theilgaard-Monch, K., Thoren, L.A., Nielsen, F.C., Jacobsen, S.E.W., Nerlov, C., Porse, B.T., 2008. NMD is essential for hematopoietic stem and progenitor cells and for eliminating by-products of programmed DNA rearrangements. *Genes & Development* 22, 1381–1396. <https://doi.org/10.1101/gad.468808>
- Welcker, M., Singer, J., Loeb, K.R., Grim, J., Bloecher, A., Gurien-West, M., Clurman, B.E., Roberts, J.M., 2003. Multisite Phosphorylation by Cdk2 and GSK3 Controls Cyclin E Degradation. *Molecular Cell* 12, 381–392. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00287-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00287-9)
- Wen, J., Brogna, S., 2010. Splicing-dependent NMD does not require the EJC in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 29, 1537–1551. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.48>
- Weng, Y., Czaplinski, K., Peltz, S.W., 1998. ATP is a cofactor of the Upf1 protein that modulates its translation termination and RNA binding activities. *RNA* 4, 205–214.
- Weng, Y., Czaplinski, K., Peltz, S.W., 1996. Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5477–5490. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.10.5477>
- Wichroski, M.J., Robb, G.B., Rana, T.M., 2006. Human Retroviral Host Restriction Factors APOBEC3G and APOBEC3F Localize to mRNA Processing Bodies. *PLoS Pathog* 2, e41. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020041>
- Wiederhold, K., Passmore, L.A., 2010. Cytoplasmic deadenylation: regulation of mRNA fate. *Biochemical Society Transactions* 38, 1531–1536. <https://doi.org/10.1042/BST0381531>
- Wieman, H.L., Wofford, J.A., Rathmell, J.C., 2007. Cytokine Stimulation Promotes Glucose Uptake via Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Regulation of Glut1 Activity and Trafficking. *MBoc* 18, 1437–1446. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-07-0593>
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., Weil, D., 2005. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *Journal of Cell Science* 118, 981–992. <https://doi.org/10.1242/jcs.01692>
- Wilkinson, M.F., Shyu, A.-B., 2002. RNA surveillance by nuclear scanning? *Nat Cell Biol* 4, E144–E147. <https://doi.org/10.1038/ncb0602-e144>
- Will, C.L., Luhrmann, R., 2011. Spliceosome Structure and Function. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a003707–a003707. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003707>
- Williams, M.R., Arthur, J.S.C., Balendran, A., van der Kaay, J., Poli, V., Cohen, P., Alessi, D.R., 2000. The role of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 in activating AGC kinases defined in embryonic stem cells. *Current Biology* 10, 439–448. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00441-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00441-3)
- Wilson, D.N., Doudna Cate, J.H., 2012. The Structure and Function of the Eukaryotic Ribosome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4, a011536–a011536. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011536>
- Wilton, S.D., Lloyd, F., Carville, K., Fletcher, S., Honeyman, K., Agrawal, S., Kole, R., 1999. Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscular Disorders* 9, 330–338. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(99\)00010-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(99)00010-3)
- Wittmann, J., Hol, E.M., Jack, H.-M., 2006. hUPF2 Silencing Identifies Physiologic Substrates of Mammalian Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Molecular and Cellular Biology* 26, 1272–1287. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.4.1272-1287.2006>
- Wiza, C., Nascimento, E.B.M., Ouwens, D.M., 2012. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 302, E1453–E1460. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00660.2011>
- Wollerton, M.C., Gooding, C., Wagner, E.J., Garcia-Blanco, M.A., Smith, C.W.J., 2004. Autoregulation of Polypyrimidine Tract Binding Protein by Alternative Splicing Leading to Nonsense-Mediated Decay. *Molecular Cell* 13, 91–100. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00502-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00502-1)
- Woodward, L.A., Mabin, J.W., Gangras, P., Singh, G., 2017. The exon junction complex: a lifelong guardian of mRNA fate: EJC: assembly, structure, and function. *WIREs RNA* 8, e1411. <https://doi.org/10.1002/wrna.1411>
- Wu, R., Kausar, H., Johnson, P., Montoya-Durango, D.E., Merchant, M., Rane, M.J., 2007. Hsp27 Regulates Akt Activation and Polymorphonuclear Leukocyte Apoptosis by Scaffolding MK2 to Akt Signal Complex. *Journal of Biological Chemistry* 282, 21598–21608. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611316200>
- Xu, X., Sakon, M., Nagano, H., 2004. Akt2 expression correlates with prognosis of human hepatocellular carcinoma.
- Xue, G., Hemmings, B.A., 2013. PKB/Akt-Dependent Regulation of Cell Motility. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 105, 393–404. <https://doi.org/10.1093/jnci/djs648>
- Yamashita, A., 2013. Role of SMG-1-mediated Upf1 phosphorylation in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Cells* 18, 161–175. <https://doi.org/10.1111/gtc.12033>

- Yamashita, A., Chang, T.-C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.-Y.A., Shyu, A.-B., 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1054–1063. <https://doi.org/10.1038/nsmb1016>
- Yamashita, A., Izumi, N., Kashima, I., Ohnishi, T., Saari, B., Katsuhata, Y., Muramatsu, R., Morita, T., Iwamatsu, A., Hachiya, T., Kurata, R., Hirano, H., Anderson, P., Ohno, S., 2009. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 23, 1091–1105. <https://doi.org/10.1101/gad.1767209>
- Yamashita, A., Ohnishi, T., Kashima, I., Taya, Y., Ohno, S., 2001. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* 15, 2215–2228. <https://doi.org/10.1101/gad.913001>
- Yang, H., Rudge, D.G., Koos, J.D., Vaidialingam, B., Yang, H.J., Pavletich, N.P., 2013. mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497, 217–223. <https://doi.org/10.1038/nature12122>
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Baudry, A., Dümmler, B., Hynx, D., Hemmings, B.A., 2004. Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochemical Society Transactions* 32, 350–354. <https://doi.org/10.1042/bst0320350>
- Yang, Z.-Z., Tschopp, O., Di-Poi, N., Bruder, E., Baudry, A., Dümmler, B., Wahli, W., Hemmings, B.A., 2005. Dosage-Dependent Effects of Akt1/Protein Kinase B $\alpha$  (PKB $\alpha$ ) and Akt3/PKB $\gamma$  on Thymus, Skin, and Cardiovascular and Nervous System Development in Mice. *MCB* 25, 10407–10418. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10407-10418.2005>
- Yap, T.A., Yan, L., Patnaik, A., Fearen, I., Olmos, D., Papadopoulos, K., Baird, R.D., Delgado, L., Taylor, A., Lupinacci, L., Riisnaes, R., Pope, L.L., Heaton, S.P., Thomas, G., Garrett, M.D., Sullivan, D.M., de Bono, J.S., Tolcher, A.W., 2011. First-in-Man Clinical Trial of the Oral Pan-AKT Inhibitor MK-2206 in Patients With Advanced Solid Tumors. *JCO* 29, 4688–4695. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.5263>
- Yepiskoposyan, H., Aeschmann, F., Nilsson, D., Okoniewski, M., Muhlemann, O., 2011. Autoregulation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in human cells. *RNA* 17, 2108–2118. <https://doi.org/10.1261/rna.030247.111>
- You, K.T., Li, L.S., Kim, N.-G., Kang, H.J., Koh, K.H., Chwae, Y.-J., Kim, K.M., Kim, Y.K., Park, S.M., Jang, S.K., Kim, H., 2007. Selective Translational Repression of Truncated Proteins from Frameshift Mutation-Derived mRNAs in Tumors. *PLoS Biol* 5, e109. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050109>
- Yu, J.H., Yang, W.-H., Gulick, T., Bloch, K.D., Bloch, D.B., 2005. Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* 11, 1795–1802. <https://doi.org/10.1261/rna.2142405>
- Zaghlool, A., Ameer, A., Cavalier, L., Feuk, L., 2014. Splicing in the Human Brain, in: *International Review of Neurobiology*. Elsevier, pp. 95–125. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801105-8.00005-9>
- Zetoune, A.B., Fontanière, S., Magnin, D., Anczuków, O., Buisson, M., Zhang, C.X., Mazoyer, S., 2008. Comparison of nonsense-mediated mRNA decay efficiency in various murine tissues. *BMC Genet* 9, 83. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-9-83>
- Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., LaDuca, J.P., Maquat, L.E., 1998a. At Least One Intron Is Required for the Nonsense-Mediated Decay of Triosephosphate Isomerase mRNA: a Possible Link between Nuclear Splicing and Cytoplasmic Translation. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5272–5283. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.9.5272>
- Zhang, J., Sun, X., Qian, Y., Maquat, L.E., 1998b. Intron function in the nonsense-mediated decay of  $\beta$ -globin mRNA: Indications that pre-mRNA splicing in the nucleus can influence mRNA translation in the cytoplasm. *RNA* 4, 801–815. <https://doi.org/10.1017/S1355838298971849>
- Zhang, L., Xu, Z., Wu, Y., Liao, J., Zeng, F., Shi, L., 2018. Akt/eNOS and MAPK Signaling Pathways Mediated the Phenotypic Switching of Thoracic Aorta Vascular Smooth Muscle Cells in Aging/Hypertensive Rats. *Physiol Res* 543–553. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933779>
- Zhang, M., Heldin, A., Palomar-Siles, M., Öhlin, S., Bykov, V.J.N., Wiman, K.G., 2018. Synergistic Rescue of Nonsense Mutant Tumor Suppressor p53 by Combination Treatment with Aminoglycosides and Mdm2 Inhibitors. *Front. Oncol.* 7, 323. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00323>
- Zhang, X., Tang, N., Hadden, T.J., Rishi, A.K., 2011. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813, 1978–1986. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.03.010>
- Zhao, X., Nogawa, A., Matsunaga, T., Takegami, T., Nakagawa, H., Ishigaki, Y., 2014. Proteasome inhibitors and knockdown of SMG1 cause accumulation of Upf1 and Upf2 in human cells. *International Journal of Oncology* 44, 222–228. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2149>
- Zheng, C.L., Fu, X.-D., Gribskov, M., 2005. Characteristics and regulatory elements defining constitutive splicing and different modes of alternative splicing in human and mouse. *RNA* 11, 1777–1787. <https://doi.org/10.1261/rna.2660805>
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., Shyu, A.-B., 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *Journal of Cell Biology* 182, 89–101. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801196>

- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.-H., Hung, M.-C., 2001. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3, 245–252. <https://doi.org/10.1038/35060032>
- Zhou, G.-L., Tucker, D.F., Bae, S.S., Bhatheja, K., Birnbaum, M.J., Field, J., 2006. Opposing Roles for Akt1 and Akt2 in Rac/Pak Signaling and Cell Migration. *Journal of Biological Chemistry* 281, 36443–36453. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600788200>
- Zhou, Z., Luo, M.J., Straesser, K., Katahira, J., Hurt, E., Reed, R., 2000. The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* 407, 401–405. <https://doi.org/10.1038/35030160>
- Zupanic, A., Meplan, C., Huguenin, G.V.B., Hesketh, J.E., Shanley, D.P., 2016. Modeling and gene knockdown to assess the contribution of nonsense-mediated decay, premature termination, and selenocysteine insertion to the selenoprotein hierarchy. *RNA* 22, 1076–1084. <https://doi.org/10.1261/rna.055749.115>