



HAL
open science

Mécanismes moléculaires et cellulaires de formation et de dissolution des “ processing bodies ” en conditions physiologiques et physiopathologiques

Olivia Vidal Cruchez

► **To cite this version:**

Olivia Vidal Cruchez. Mécanismes moléculaires et cellulaires de formation et de dissolution des “ processing bodies ” en conditions physiologiques et physiopathologiques. Biologie cellulaire. Université Côte d’Azur, 2021. Français. NNT : 2021COAZ6031 . tel-03611868

HAL Id: tel-03611868

<https://theses.hal.science/tel-03611868>

Submitted on 17 Mar 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.

THÈSE DE DOCTORAT

Mécanismes moléculaires et cellulaires
de formation et de dissolution
des « processing bodies » en conditions
physiologiques et physiopathologiques

Olivia VIDAL CRUCHEZ

Institut de Recherche sur le Cancer et le Vieillissement, Nice (IRCAN-U1081)

**Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en** Sciences de la vie
et de la Santé, Option Interactions
moléculaires et cellulaires
d'Université Côte d'Azur
Dirigée par : Dr. Patrick Brest
Soutenue le : 13 décembre 2021

Devant le jury, composé de :
Dr. Marion Peter, CRCN/HDR, IRCM-Université de
Montpellier
Dr. Isabelle Coste, CRCN, CRCL-Université Claude
Bernard Lyon
Dr. David Gilot, MCU, U1242-Université de Rennes
Dr. Georges Vassaux, DR2, IPMC-Université Côte d'Azur
Dr. Michele Trabucchi, DR2, C3M-Université Côte d'Azur
Pr. Fabrice Lalloue, PU, EA3842-Université de Limoges
Dr. Issam Ben-Sahra, Professeur assistant, Université de
NorthWestern, USA
Pr. Paul Hofman, PU-PH, IRCAN-CHU-Université Côte
d'Azur
Dr. Patrick Brest, CRCN/HDR, IRCAN-Université Côte
d'Azur

Mécanismes moléculaires et cellulaires de formation et de dissolution des « processing bodies » en conditions physiologiques et physiopathologiques

Jury :

Président du jury :

Pr. Paul Hofman, PU-PH, IRCAN-CHU-Université Côte d'Azur

Rapporteurs :

Dr. Marion Peter, CRCN/HDR, IRCM-Université de Montpellier

Dr. David Gilot, MCU, U1242-Université de Rennes

Examineurs :

Dr. Isabelle Coste, CRCN, CRCL-Université Claude Bernard Lyon

Dr. Georges Vassaux, DR2, IPMC-Université Côte d'Azur

Dr. Michele Trabucchi, DR2, C3M-Université Côte d'Azur

Pr. Fabrice Lalloue, PU, EA3842-Université de Limoges

Invités :

Dr. Issam Ben-Sahra, Professeur assistant, Université de NorthWestern, USA

Table des matières

Résumé	5
Abstract	6
Liste des figures	7
Liste des tableaux	7
Liste des abréviations	8
INTRODUCTION	12
Chapitre I- Mécanismes post-transcriptionnels de régulation des ARNm :.....	13
I- Dégradation des ARNs :.....	13
I.1- Dégradation des ARNs nucléaires :.....	13
I.1.1- Exosome : dégradation 3' vers 5' :.....	13
I.1.2- Dégradation par l'exoribonucléase 2 5' vers 3' :	14
I.2- Dégradation des ARNm cytoplasmiques :.....	16
I.2.1- Elimination de la queue poly(A) ou déadénylation :	16
I.2.2- Elimination de la coiffe ou decapping :.....	18
I.2.3- Différentes options de dégradation :.....	19
I.2.4- Dégradation des ARNm via les miARNs	19
I.3- Dégradation des ARNm aberrants :	21
I.3.1- Dégradation des ARNm non-sens (NMD) :	21
I.3.2- Dégradation des ARNm bloqués par les ribosomes (NGD) et sans codon stop (NSD) :.....	23
I.4- L'exoribonucléase 1 5' – 3' (XRN1) :.....	24
I.4.1- Généralités :	24
I.4.2- Structure et conservation :	25
I.4.3- Mécanismes d'actions :.....	26
I.4.4- Co-facteurs interagissant avec XRN1 :.....	27
I.4.5- Conséquences d'un défaut de XRN1 :.....	29
I.4.6- Pathologies associées à un défaut de XRN1 chez l'Homme	30
I.4.7- Outils moléculaires utilisant la protéine XRN1 :	33
II- Stockage des ARNs :	35
II.1- Composition des p-bodies :.....	35
II.1.1- Composition protéique :	35
II.1.2- Composition en ARNs :.....	37
II.2- Formation des p-bodies :.....	38

II.2.1- Séparation de phase liquide-liquide (LLPS) :.....	38
II.2.2- Domaines et régions importants pour la séparation de phase :	40
II.2.3- Régulation de la formation des p-bodies :.....	41
II.3- Rôles des processing bodies :.....	42
II.4- Interconnexions entre les p-bodies et les granules de stress :.....	45
II.5- Processing bodies et pathologies :.....	47
Chapitre II- Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) :	51
I- Diagnostic et classification :.....	51
II- Traitements des CPNPC :.....	53
II.1- Chirurgie :.....	53
II.2- Chimiothérapies :.....	54
II.2.1- Chimiothérapie néoadjuvante et adjuvante pour les stades précoces :.....	54
II.2.2- Chimiothérapie pour les stades avancés :	55
II.3- Thérapies ciblées :.....	55
II.3.1- Mutations de l'EGFR :.....	56
II.3.2- Mutations KRAS :.....	57
II.3.3- Mutations BRAF :.....	57
II.3.4- Réarrangement ALK & RET :.....	57
II.4- Immunothérapies :.....	58
Chapitre III- La voie de signalisation RAS-MAPK dans le cancer :	59
I- Acteurs de la voie de signalisation RAS-MAPK :.....	60
I.1- Récepteurs tyrosines kinases (RTK) :	60
I.2- Les GTPases RAS :.....	61
I.2.1- Structure et activation :	61
I.2.2- Les protéines RAS, carrefour de signalisation :.....	62
I.2.3- Les mutations oncogéniques de RAS et signalisation :.....	63
I.2.4- Différences entre les isoformes :.....	64
I.3- Les kinases RAF :.....	66
I.4- Les kinases MEK1/2 :.....	67
I.5- Les kinases ERK1/2 :	68
I.6- Régulation de la voie ERK-MAPK par ERK :	69
II- Les inhibiteurs de la voie des RAS-MAPK :.....	72
II.1- Inhibiteurs de RAS :.....	72
II.1.1- Inhibiteurs indirects :	72

II.1.1- Inhibiteurs de KRAS G12C :	73
II.2- RAF inhibiteurs :	75
II.3- Inhibiteurs de MEK :	77
II.3.1- Inhibiteurs de MEK de 1 ^{ère} génération :	77
II.3.2- Inhibiteurs de MEK de 2 ^{nde} génération :	78
II.4- Mécanismes de résistance non génétiques :	81
II.4.1- Résistance non génétique transitoire et stable :	83
RESULTATS.....	85
ARTICLE I.....	86
Abstract	88
Graphical abstract	89
Introduction.....	90
Results	92
Discussion	95
Material and methods.....	97
References	102
Figure legends	105
ARTICLE II.....	111
I- Introduction :	112
II- Matériels et méthodes :	114
II.1- Culture cellulaire :	114
II.1.1- Génération des lignées stables :	114
II.1.2- Transfection transitoire :	115
II.2- Immunofluorescence :	115
II.3- Immuno-blot :	116
II.4- Analyses statistiques :	116
III- Résultats :	119
IV- Discussion :	121
V- Références	123
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :	125
REFERENCES :	129
ANNEXES :	173

Titre :

Mécanismes moléculaires et cellulaires de formation et de dissolution des « processing bodies » en conditions physiologiques et physiopathologiques

Résumé :

Les « processing bodies » ou p-bodies sont des structures sans membranes (MLO : Membraneless Organelles) formées par un processus connu sous le nom de séparation de phase liquide-liquide (LLPS). Les p-bodies sont des agrégats de protéines et d'ARNs localisés dans le cytoplasme des cellules. Ils ont été caractérisés comme étant un lieu de stockage des ARNs réprimés, puisque les ARNs qui y sont accumulés, sont stables et non traduits. Pour autant, l'absence de membrane rend leur contenu rapidement mobilisable par les cellules, suggérant un rôle important dans les réponses immédiates au stress.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressée, à la fois au mécanisme de formation et de dissolution des p-bodies. Tout d'abord, j'ai mis en évidence l'effet de la dissolution des p-bodies sur les ARNm. L'induction de la dissolution des p-bodies conduit à une augmentation de la traduction des ARNm qui y sont stockés et réprimés tels que les oncogènes *KRAS* et *NRAS*. Il semble alors, que ce réservoir d'ARNm constitue un mécanisme dynamique d'adaptation au stress cellulaire, et en particulier pour le développement de cellules résistantes aux MEKi.

Ensuite, afin de mieux comprendre la formation des p-bodies, j'ai étudié la localisation de l'exoribonucléase 1 (XRN1). Cette enzyme comme son nom l'indique est impliquée dans la dégradation des ARNs, mais est retrouvée accumulée dans les p-bodies sous forme inactive. Dans ce contexte, afin de déterminer le rôle de la protéine XRN1 dans les p-bodies, je me suis intéressée aux régions importantes pour son adressage dans les p-bodies. Ainsi, j'ai pu montrer que les zones permettant l'accumulation de XRN1 dans les p-bodies se trouvent dans la partie C-terminale de la protéine au niveau des acides aminés 1406-1468 et 1607-1706. Ces résultats indiquent donc que ces deux régions conservées chez les vertébrés sont indispensables à la localisation de la protéine de façon indépendante de la partie catalytique située en N-terminal.

En conclusion, j'ai, au cours de ma thèse, travaillé sur deux aspects des p-bodies : la séquestration protéique et la séquestration des ARNs. Ces travaux permettent de mieux comprendre le rôle joué par p-bodies dans des processus physiologiques ou physiopathologiques tels que le cancer.

Mots clés :

« Processing bodies », cancer du poumon, XRN1, MAPK, inhibiteurs de MEK, régulation des ARNm

Title :

Molecular and cellular mechanisms of formation and dissolution of "processing bodys" under physiological and physiopathological conditions

Abstract

« Processing bodies » or p-bodies are Membraneless Organelles (MLO) formed by a processus called liquid liquid phase separation (LLPS). P-bodies are aggregates of proteins and RNAs localized in cell cytoplasm. They were characterized as a storage place of repressed RNAs, without degradation nor decay. However, membraneless properties makes their content quickly mobilizable by cells, suggesting an important role for immediate responses to stress. During my thesis, I was interested both in mechanisms of p-bodies formation and dissolution.

First, I highlighted the impact of p-bodies dissolution on mRNAs translation. Indeed, P-bodies dissolution induction leads to increased translation of these repressed and stored mRNAs, like *KRAS* and *NRAS* oncogenes. It seems that this mRNA pool constitutes a dynamic adaptation mechanism to cellular stress, in particular for MEKi drug tolerant cancer cell onset.

In a second part of my thesis, in order to understand p-bodies formation, I studied exoribonuclease 1 (XRN1) localization. This crucial enzyme for RNAs decay is also found accumulated in p-bodies in an inactive form. In this context, to determine XRN1 role in p-bodies, I have been interested in p-bodies localization signal regions. Thus, I showed that region leading to XRN1 accumulation are found in C-terminal part of the protein at amino acid level: 1406-1468 et 1607-1706. These results indicate that these two conserved regions in vertebrates are indispensable for protein localization independently of the catalytic part localized in N-terminal part of XRN1 protein.

To conclude, during my thesis I have worked on two p-bodies aspects: protein and RNA sequestration. These data will contribute to better understand p-bodies role in physiological and physiopathological diseases like cancer.

Keywords :

« Processing bodies », lung cancer, XRN1, MAPK, MEK inhibitors, mRNA regulation

Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'exosome

Figure 2 : Principales voies de dégradation de l'ARNm

Figure 3 : Recrutement du complexe de decapping via la déadénylation

Figure 4 : Reconnaissance micro-ARN – ARN cible

Figure 5 : Dégradation des ARN non-sens (NMD)

Figure 6 : Organisation des domaines de XRN1

Figure 7 : Modèle structurel du site catalytique de la protéine Xrn1 de *S. cerevisiae*

Figure 8 : Modèle de déroulement de duplex ARN/ADN et son hydrolyse par Xrn1

Figure 9 : Structure des séquences d'ARN résistantes à la dégradation par XRN1 du virus Zika (xrARN)

Figure 10 : Formation des ARN sous-génomique des flavivirus

Figure 11 : Séparation de phase

Figure 12 : Régulateurs des p-bodies

Figure 13 : Stratégie de traitements du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) de stade IV

Figure 14 : Mutations promotrices dans le CPNPC

Figure 15 : Mécanisme d'activation de la voie de signalisation des MAPK

Figure 16 : Activation des protéines RAS

Figure 17 : Protéines effectrices de RAS

Figure 18 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de RAF dans un fond génétique BRAFV600E versus BRAF sauvage

Figure 19 : Mécanisme de résistance non génétique transitoire et stable

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition protéique des p-bodies – Partie 1

Tableau 1 : Composition protéique des p-bodies – Partie 2

Tableau 2 : Groupement des stades du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC)

Tableau 3 : Mutations les plus fréquentes des gènes RAS

Liste des abréviations

3'UTR : 3' Untranslated Transcribed Region, Région 3' transcrite non traduite

5'UTR : 5' Untranslated Transcribed Region, Région 5' transcrite non traduite

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*

ADC : Adénocarcinome

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARE : AU Rich Element, élément riche en Adénine et en Uracile

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNsg : ARN sous-génomique

ARNt : ARN de transfert

bioID : Proximity-Dependent biotinylation

BVDV : Bovine Viral Diarrhea Virus, virus de la diarrhée bovine

C. elegans : *Caenorhabditis elegans*

C. neoformans : *Cryptococcus neoformans*

cCLAP : chemical Cross-Linking coupled to Affinity Purification

CIR : C-terminal Interacting Region

CPNPC : Carcinome Pulmonaire Non à Petites Cellules

CPPC : Carcinome Pulmonaire à Petites Cellules

CTC : Cellules Tumorales Circulantes

CUB : Codon Usage Bias, biais d'utilisation des codons

D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*

DBM : DCP1-binding motif, motif de liaison à DCP1

DENV-2 : Dengue Virus serotype 2, virus de la Dengue de type 2

DI : Déficiences Intellectuelles

DSB : Double Strand Break, cassure double brin

DTP : Drug-Tolerant persister Phenotype, phénotype persistant tolérant aux médicaments

EGF : Epithelial Growth Factor

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor

EJC : Exon-Junction Complex, complexe de jonction d'exon

EMCV : Encephalomyocarditis Virus, virus de l'encéphalomyocartie

FAK : Focal Adhesion Kinase

FAPS : Fluorescence-Activated Particle Sorting, tri des particules activées par fluorescence

FDA : Food and Drug Administration

FTI : FarnesylTransferase Inhibitor, inhibiteurs de la farsényl transférase

G4 : Les tétraplexes G4, G-quadruplexes

GAP : GTPase Activating Protein, protéine activatrice de GTPase

GC : Guanine et Cytosine

GDP : Guanosine DiPhosphate

GDS : Guanine nucleotide Dissociation Stimulator, stimulateur de dissociation de nucléotide guanine

GEF : Guanine nucleotide Exchange Factors, facteur d'échange de nucléotide guanine

GFP : Green Fluorescence Protein, protéine verte fluorescente

GTP : Guanosine TriPhosphate

HRAS : Harvey Ras

ICMT : isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase

IDR : Intrinsically Disordered Regions, régions intrinsèquement désordonnées

IFN-I : Interféron de type I

Imp7 : importine 7

ISET : Isolation by Size of Epithelial Tumor cells, isolement par taille de cellules tumorales épithéliales

K. lactis : *Kluyveromyces lactis*

KRAS : Kirsten Ras

LLPS : Liquid Liquid Phase Separation, séparation de phase liquide-liquide

m7G : 7-methylguanosine, coiffe

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

miARN : micro-ARN

MLO : MembraneLess Organelles, organites sans membrane

MRD : minimal residual disease, maladie résiduelle minimale

MRE : miRNA Response Element, élément de réponse miARN

mRNP : Messenger ribonucleoprotein

NDV : Newcastle Disease Virus, virus de la maladie de Newcastle

NGD : No Go Decay

NMD : Nonsense Mediated Decay, dégradation des ARNm non-sens

NRAS : Neuroblastoma RAS

NSD : Non-Stop Decay

ORF : Open Reading Frame, cadre de lecture ouvert

p-bodies / PB : processing bodies

PABP : poly(A)-binding protein, protéine de liaison à la queue poly(A)

PD-1 : programmed cell death protein 1

PD-L1 : Programmed death-ligand 1

PDE- δ : phosphodiesterase- δ

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

piARN : Piwi-ARN

PIP3 : phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate

PIP2 : phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate

poly(A) : polyAdénilé

poly(U) : polyUridiné

PTC : Premature Termination Codon, codon de terminaison prématuré

Rai1 : Rat1-interacting protein

RAS : Rat Sarcoma Virus

RBD : Ras binding domain, domaine de liaison à RAS

RBP : RNA-binding protein, protéine de liaison à l'ARN

RISC : RNA Induced Silencing Complex

RNP : RiboNucléoProtéine

Rrp : Ribosomal RNA processing

RTK : Récepteur Tyrosine Kinase

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

S. pombe : *Schizosaccharomyces pombe*

SG : Stress Granule, granule de stress

SGav : granule de stress antiviral

siARN : small interfering ARN

SL : Stem Loop

smFISH : single molecule Fluorescente *In Situ* Hybridization

smiFISH : single molecule inexpensive Fluorescente *In Situ* Hybridization

snoARNs : small nucleolar RNA

SOS : Son of Sevenless

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TERRA : Telomeric Repeat containing RNA

TGF α : Transforming Growth Factor α

TGF β : Transforming growth factor β

TNM : Tumor-Node-Metastasis

TTP : tristétraproline

VHC : Virus de l'hépatite C

WNV : West Nile Virus, virus du Nil occidental

XRN1 : Exoribonucléase-1

XRN2 : Exoribonucléase-2

xrRNA : RNA Xrn1 resistant, ARN résistant à XRN1

INTRODUCTION

Chapitre I-Mécanismes post-transcriptionnels de régulation des ARNm :

Le processus de l'expression des gènes jusqu'à la traduction en protéines dans les cellules eucaryotes doit être très finement régulé. Cette régulation fait intervenir de nombreux mécanismes complexes allant de l'ouverture de la chromatine jusqu'à la dégradation des protéines. Parmi tous ces mécanismes possibles de régulation, ceux associés à l'ARNm (ARN messenger) constituent une entité propre et très vaste. Dans cette partie d'introduction, nous nous intéresserons aux mécanismes post-transcriptionnels de régulation des ARNm et plus particulièrement au stockage et à la dégradation ainsi que les conséquences possibles de leur dérégulation dans un contexte physiopathologique.

I-Dégradation des ARNs :

I.1-Dégradation des ARNs nucléaires :

L'expression des gènes eucaryotes débute par la transcription et la prise en charge des pré-ARNm naissants dans le noyau. Les étapes de maturation comprennent principalement l'ajout de la coiffe au niveau de l'extrémité 5', l'épissage pour éliminer les introns, ainsi que le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3'. L'ARNm mature est ensuite transporté du noyau vers le cytoplasme pour la traduction.

Dans le noyau, c'est le complexe ARN exosome, qui possède à la fois des activités endo- et exoribonucléases 3' vers 5', et l'exoribonucléase 2 (XRN2), qui vont éliminer les acides nucléiques dans le sens 5' vers 3', qui sont principalement en charge de la dégradation des ARNs nucléaires (Allmang et al., 1999; Houseley and Tollervey, 2009; Miki and Großhans, 2013).

I.1.1-Exosome : dégradation 3' vers 5' :

Chez les eucaryotes, la principale activité exonucléase dans le sens 3' vers 5' est assurée par l'exosome et est présente à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme. L'exosome est donc impliqué dans la dégradation d'une grande variété de transcrits non fonctionnels comme les pré-ARNr, les pré-ARNt, les snARN (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Gudipati et al., 2012; Kawamoto et al., 2021). L'exosome eucaryote est un complexe ribonucléolytique conservé au

cours de l'évolution qui se compose de 9 sous-unités (appelées les protéines Rrp pour « Ribosomal RNA Processing ») (**Fig.1**). Le cœur de l'exosome est arrangé en deux couches circulaires superposées avec un anneau central, appelé l'Exo9 (Chlebowski et al., 2013). La partie basse de l'Exo9 est constituée de 6 sous-unités RRP41 (*EXOSC4*), RRP42 (*EXOSC7*), RRP43 (*EXOSC8*), RRP45 (*EXOSC9*), RRP46 (*EXOSC5*) et MTR3 (*EXOSC6*) qui possèdent toutes un domaine RNase PH. Les trois autres protéines restantes, RRP4 (*EXOSC2*), RRP40 (*EXOSC3*) et CSL4 (*EXOSC1*), s'assemblent et forment la couche supérieure (Singh et al., 2018; Stowell et al., 2016). Les protéines RRP4 et RRP40 possèdent toutes deux les domaines de liaisons à l'ARN S1 et KH, et la protéine CSL4 contient un domaine KH et un motif en doigt de zinc. L'assemblage de ces deux structures forme un canal central appelé le noyau de l'exosome dans lequel peut se loger uniquement de l'ARN simple brin (Singh et al., 2018). Bien que chaque sous-unité de l'exosome ait un site potentiel d'exoribonucléase 3' – 5', le complexe Exo9 est catalytiquement inactif. Pour compenser cette absence d'activité, l'Exo9 s'assemble avec l'exo/endoribonucléase RRP44/DIS3 (*DIS3*) endonucléolytique (Schneider et al., 2009) pour former l'Exo10^{DIS} (Chlebowski et al., 2013) et/ou l'exonucléase Rrp6 (*EXOSC10*) (Kilchert et al., 2016) pour former l'Exo11^{DIS+Rrp6} (Liu et al., 2006), qui se lie au bas et au haut du noyau de l'exosome, respectivement. En plus du noyau et de ses composants catalytiques, l'exosome se lie à ses co-facteurs C1D (*C1D*) et Mpp6 (*MPP6*). Ces deux protéines sont exclusivement nucléaires et contribueraient à la fonction du noyau de l'exosome en aidant l'interaction entre l'hélicase à ARN Mtr4 (chez la levure) et l'exosome pour l'entrée de l'ARN dans l'exosome et sa dégradation (Kim et al., 2016; Singh et al., 2018).

1.1.2-Dégradation par l'exoribonucléase 2 5' vers 3' :

Chez les eucaryotes, la protéine responsable de la dégradation 5' est l'exoribonucléase 2 (XRN2 ou Rat1 chez la levure) (Miki and Großhans, 2013). Elle élimine principalement les ARNs avec une extrémité 5' nue, tel que les introns épissés, ou les fragments d'ARNs restants après dégradation par leurs extrémités 3' (Miki and Großhans, 2013). Lorsque les ARNs possèdent une coiffe, la protéine Rat1/XRN2 forme un complexe avec la pyrophosphate Rai1 (Rat1-interacting protein) entraînant l'élimination de la coiffe et la déphosphorylation rapide des transcrits par Rai1 (Xiang et al., 2009a). Une fois la coiffe retirée, Rat1 peut alors dégrader les transcrits (Bresson and Tollervey, 2018).

Chez la levure bourgeonnante, la production de transcrits non coiffés causée par l'inactivation

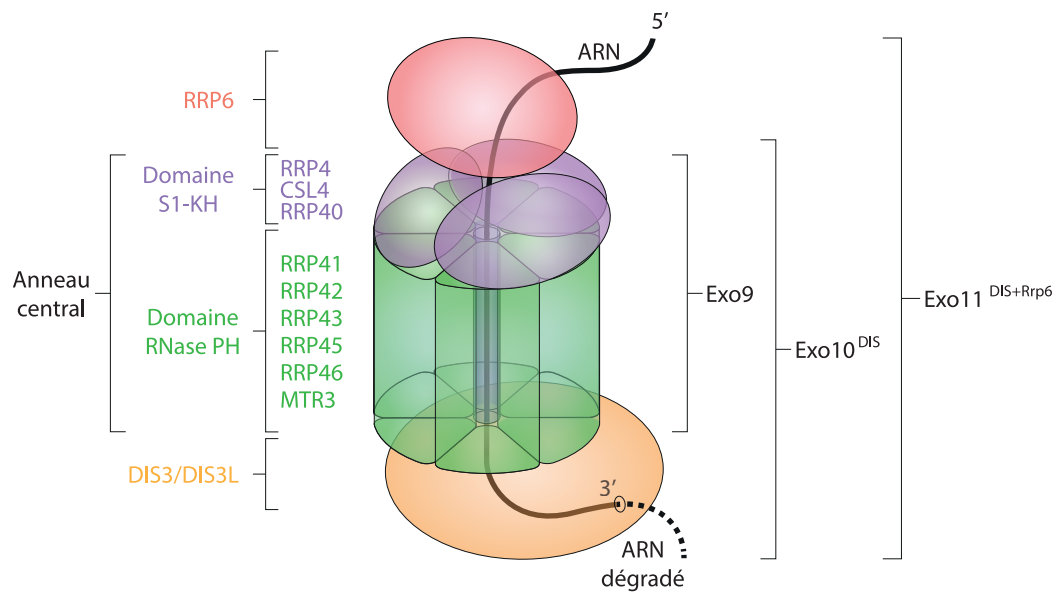


Figure 1 : Structure de l'exosome.

La partie basse de l'Exo9 est constituée de 6 sous-unités RRP41, RRP42, RRP43, RRP45, RRP46 et MTR3 qui possèdent toutes un domaine RNase PH (Vert). Les trois autres protéines : RRP4, RRP40 et CSL4 s'assemblent et forment la couche supérieure (Violet). Les protéines RRP4 et RRP40 possèdent toutes deux les domaines de liaisons à l'ARN S1 et KH, et la protéine CSL4 contient un domaine KH et un motif en doigt de zinc. L'assemblage de ces deux structures forme l'Exo9 aussi appelé le noyau central de l'exosome dans lequel peut se loger uniquement de l'ARN simple brin. L'exo9 s'assemble avec l'exo/endoribonucléase RRP44/DIS3 endonucléolytique (dans le cytoplasme ou dans le noyau) ou avec DIS3L (uniquement dans le cytoplasme) pour former l'Exo10^{DIS} et/ou l'exonucléase RRP6 pour former l'Exo11^{DIS+Rrp6}, qui se lie au bas et au haut du noyau de l'exosome, respectivement. (Adapté d'après (Kilchert et al., 2016)).

de la machinerie de la coiffe elle-même ou indirectement par une mutation dans l'ARN polymérase II, conduit au recrutement de Xrn2 lors de la transcription et à une terminaison prématurée (Jimeno-González et al., 2010). XRN2 est aussi requis pour la terminaison de la transcription chez la levure et les mammifères (Kim et al., 2004; West et al., 2004). Elle est aussi nécessaire à la biogénèse de plusieurs snoARNs (small nucleolar RNA) (Chanfreau et al., 1998; Petfalski et al., 1998; Qu et al., 1999) et importante dans la modification des pré-ARNs de transfert (ARNt) (Boisvert et al., 2007). Une fois que la Polymérase II (Pol II) a transcrit un signal polyadénylé (poly(A)), le transcrit est clivé et le fragment 5' polyadénylé en 3'. XRN2 dégradera alors le fragment 3' libéré du transcrit jusqu'à se heurter à Pol II (Dengl and Cramer, 2009; Luo et al., 2006; Skourti-Stathaki et al., 2011). Enfin XRN2 est aussi responsable de la dégradation de l'ARN non codant TERRA (Telomeric Repeat containing RNA), produit de la transcription des télomères (séquences ajoutés aux extrémités des chromosomes pour le maintien et la stabilité du génome), et permettrait ainsi la régulation de l'allongement des télomères (Luke et al., 2008).

XRN2 a un rôle inattendu dans la réponse aux dommages à l'ADN via son implication dans la dégradation de structures particulières hybrides ARN/ADN appelées « R-loop » et dans la réparation des cassures double brin (DSB : Double-Strand Break) toutes deux responsables d'une instabilité génomique (Helmrich et al., 2011). La perte de XRN2 entraîne à la fois une augmentation des « R-loop » et un retard dans la réparation de la cassure double brin. De plus l'induction de dommage à l'ADN est responsable d'une relocalisation de la protéine XRN2 co-localisant avec 53PB1 (une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN double brin) et les « R-loop » (Morales et al., 2016).

L'enzyme XRN2 est aussi impliquée dans le mécanisme de régulation des ARNs interférents (Chatterjee and Grosshans, 2009; Zhang et al., 2017). Chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), la diminution de XRN2 augmente les niveaux des micro-ARNs (miARNs) *let-7* matures sans affecter les niveaux de ses précurseurs. Elle réduit l'accumulation des ARNm cibles de *let-7*, suggérant que XRN2 ne se contente pas de dégrader les miARNs non fonctionnels, mais contrôle aussi les niveaux et l'activité des miARNs par dégradation. De plus, *in vitro*, les lysats de *C. elegans* sauvages libèrent les miARNs du complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) plus efficacement que des lysats mutés pour *xrn2*, indiquant que XRN2 favoriserait la libération de miARNs du complexe RISC (Chatterjee and Grosshans, 2009).

L'enzyme XRN2 joue aussi un rôle dans le contrôle qualité des ARNs, puisqu'elle est en partie

responsable de la dégradation des pré-ARNm aberrants. Des cellules HeLa, sous exprimant la protéine XRN2, sont incapables de dégrader des transcrits défectueux pour la terminaison de la transcription et la polyadénylation (Davidson et al., 2012). De plus, des ARNs de transfert (ARNt) dépourvus de méthylations (hypomodifiés) suite à la délétion de deux ARNt méthyltransférases, sont rapidement dégradés par les enzymes XRN2 et XRN1 (Alexandrov et al., 2006; Chernyakov et al., 2008). Enfin, bien que l'exosome soit principalement impliqué dans la dégradation de pré-ARN ribosomiaux (pré-ARNr), la perte de XRN2 par ARN interférent, conduit à l'accumulation de pré-ARNr aberrants (Wang and Pestov, 2011).

I.2-Dégradation des ARNm cytoplasmiques :

Tous les ARNm contiennent à leurs extrémités 5' un 7-méthyl guanosine (m7G) aussi appelé coiffe, qui avec le complexe protéique de la liaison à la coiffe (composé des protéines eIF4E, eIF4G et eIF4A) rend l'ARNm résistant aux exoribonucléases 5' – 3' (Fukao et al., 2021; Muhrad et al., 1994). Aux extrémités 3' de tous les ARNm (à l'exception de l'ARNm des histones) (Dominski and Marzluff, 1999; Marzluff, 2005) la queue poly(A) avec la protéine de liaison poly(A) (PABP : Poly(A)-Binding Protein) protègent l'ARNm de l'attaque par les exoribonucléase 3' – 5' (Mangus et al., 2003).

I.2.1-Elimination de la queue poly(A) ou déadénylation :

Chez les eucaryotes, les ARNm sont, en général, dégradés par une voie initiée par le raccourcissement de la queue poly(A) située en 3' de l'ARNm. Deux complexes enzymatiques sont majoritairement responsables des déadénylations : PAN2/PAN3 et CCR4-NOT (**Fig. 2**).

Le complexe des nucléases de la queue poly(A) PAN2/PAN3 est considéré comme responsable de la coupure préliminaire de la queue poly(A) (Wolf and Passmore, 2014). PAN2 est la sous-unité catalytique, tandis que PAN3 est essentielle pour le recrutement de PAN2 sur la queue poly(A) (Jonas et al., 2014; Wolf and Passmore, 2014). Les déadénylases sont recrutées sur l'ARN par une variété de protéines liant l'ARN (RBPs : RNA-binding proteins) et d'autres complexes (Du et al., 2016 ; Stowell et al., 2016) comme le facteur d'inhibition d'initiation de la traduction 4E-T (*EIF4ENIF1*), mais le mécanisme de recrutement majeur de PAN2/PAN3 se fait via l'interaction PAN3-PABP (Nishimura et al., 2015; Yi et al., 2018). Ensuite, la plus grande partie du raccourcissement de la queue poly(A) est assurée par le complexe CCR4-NOT. Ce complexe comprend un grand nombre de protéines, mais les trois protéines clés sont : CNOT1

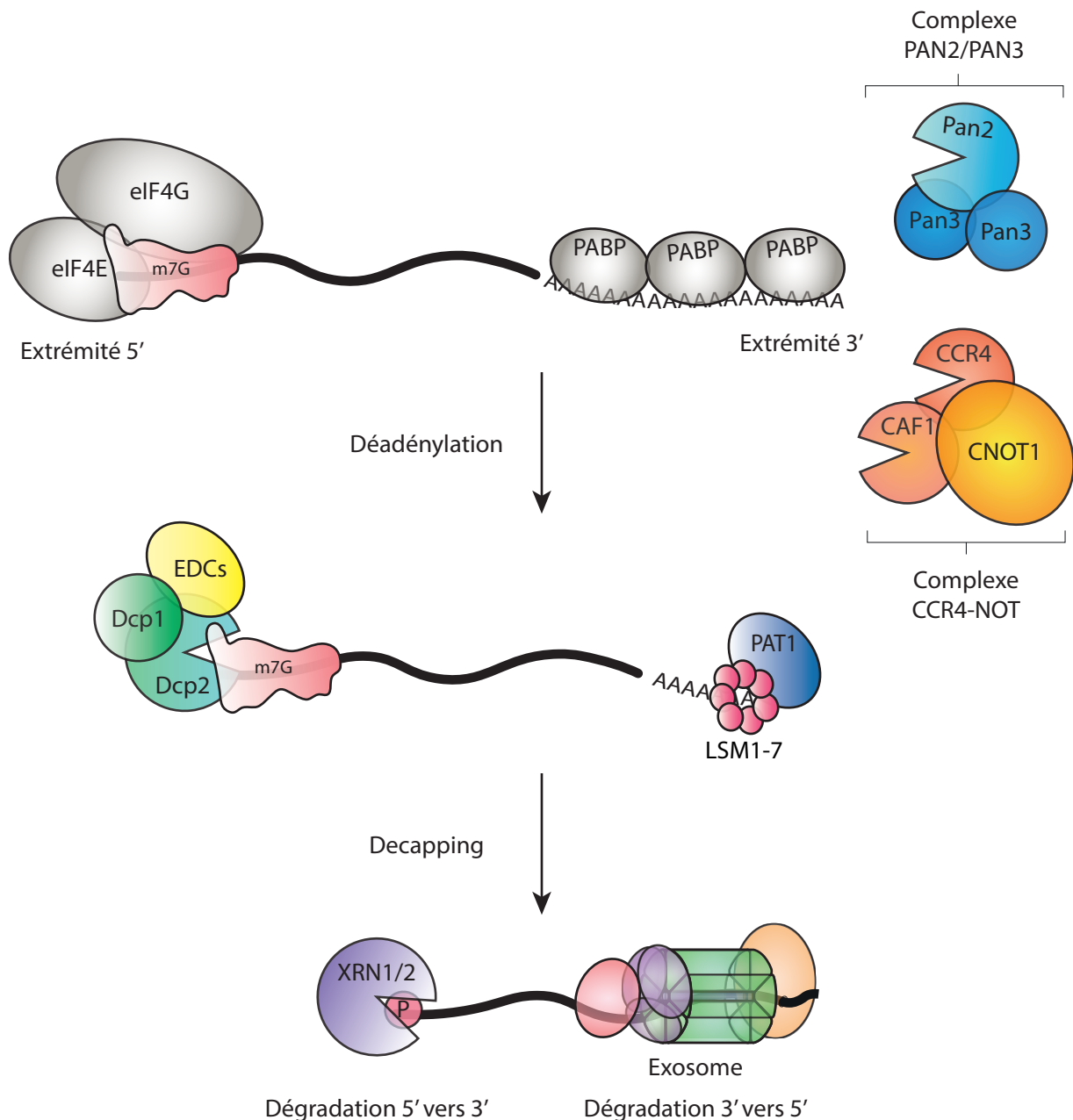


Figure 2 : Principales voies de dégradation de l'ARNm.

Tous les ARNm contiennent à leurs extrémités 5' un 7-méthyl guanosine (m7G) aussi appelé coiffe, qui avec le complexe protéique de la liaison à la coiffe (composé des protéines eIF4E, eIF4G et eIF4A (non représentées sur le schéma)) rend l'ARNm résistant aux exoribonucléases 5' – 3'. Aux extrémités 3' de tous les ARNm (à l'exception de l'ARNm des histones) la queue poly(A) avec la protéine de liaison poly(A) (PABP) protègent l'ARNm de l'attaque par les exoribonucléases 3' – 5'.

Chez les eucaryotes, les ARNm sont, en général, dégradés par une voie initiée par le raccourcissement de la queue poly(A) située en 3' de l'ARNm. Deux complexes enzymatiques sont majoritairement responsables des déadénylations : PAN2/PAN3 et CCR4-NOT. **1) PAN2/PAN3** : PAN2 est la sous-unité catalytique, tandis que PAN3 est essentielle pour le recrutement de PAN2 sur la queue polyA. **2) CCR4-NOT** : NOT1 est la sous-unité d'ancrage permettant le maintien du complexe, tandis que CCR4 et CAF1/POP2 possèdent l'activité catalytique de déadénylase. Le complexe Pat1-Lsm1-7 est lui aussi impliqué dans la déadénylation.

Après la déadénylation à l'extrémité 3', l'ARNm est dégradé par l'exosome.

Ensuite, la coiffe en 5' est éliminée de façon irréversible par le complexe DCP1/DCP2. DCP2 est la sous-unité catalytique, et nécessite la présence de DCP1 pour sa stabilité, ainsi que de nombreux co-facteurs tels que l'ensemble des protéines EDCs.

Après le décaping par DCP2, c'est la protéine XRN1 qui est responsable de la dégradation des ARNm possédant une extrémité 5' monophosphorylé. (Adapté de (Mugridge et al., 2018)).

(*CNOT1*), CCR4 (*CNOT6*) et CAF1/POP2 (*CNOT7*). *CNOT1* est la sous-unité d'ancrage permettant le maintien du complexe (Basquin et al., 2012), tandis que CCR4 et CAF1/POP2 possèdent l'activité catalytique de déadénylase (Maryati et al., 2015). Enfin, chez le *Xenopus laevis* ou chez *C. elegans*, les déadénylases PARN et PNLDC1 peuvent elles aussi raccourcir la taille de la queue poly(A) (Skeparnias et al., 2017) et jouer un rôle dans la biogénèse des ARNs non codants tels que les miARNs et le piARNs.

Mécanisme de dégradation indépendant de la déadénylation :

Chez la levure, certains transcrits, comme les ARNm *rps28b* et *edc1*, sont capables d'être dégradés sans étape de déadénylation, en étant directement ciblés au niveau de la coiffe. La protéine Rps28b se lie directement à une structure en « épingle à cheveux » dans le 3'UTR (3' Untranslated Transcribed Region) de son propre ARNm et recrute la protéine Edc3 (activateur du decapping). Cela conduit alors à l'association d'autres facteurs de decapage et permet une dégradation indépendante de la déadénylation du transcrit (Badis et al., 2004). L'ARNm de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), *edc1*, est aussi dégradé de façon indépendante de la déadénylation. Dans ce cas, la déadénylation semble être bloquée par un appariement entre la queue poly(A) et une partie poly(U) dans le 3'UTR. Cet appariement intramoléculaire inhibe alors l'accès aux déadénylases (Muhlrad and Parker, 2005).

Recrutement du complexe de decapping via la déadénylation :

Après la déadénylation à l'extrémité 3', l'ARNm lié aux ribonucléoprotéines (mRNP : messenger RiboNucleoProtein) en cours de dégradation recrute le complexe de decapping (**Fig. 2**). Des études structurelles et fonctionnelles suggèrent que les réseaux d'interactions protéines-protéines (Jonas and Izaurralde, 2013) permettraient la liaison entre la déadénylation et l'élimination de la coiffe (**Fig. 3**). Chez la levure, la déadénylation peut être directement liée à la perte de la coiffe par le complexe co-activateur Pat1-Lsm1-7. Le complexe Lsm1-7 peut se lier à de courtes séquences poly(A) (Chowdhury et al., 2007), tandis que Pat1 interagit avec des motifs linéaires courts riches en leucine retrouvés dans la queue C-terminale désordonnée de l'enzyme Dcp2. Ces interactions peuvent alors recruter le complexe de decapping directement sur les queues 3' déadénylées (Charenton et al., 2017; Mugridge et al., 2018).

Les interactions protéines-protéines relient également le complexe d'élimination de la coiffe en 5' et CCR4-NOT (**Fig. 3**). L'hélicase DDX6 (Dhh1 chez la levure) se lie à la surface de *CNOT1* (composants du complexe CCR4-NOT) (Chen et al., 2014) et à de courts motifs linéaires FDF

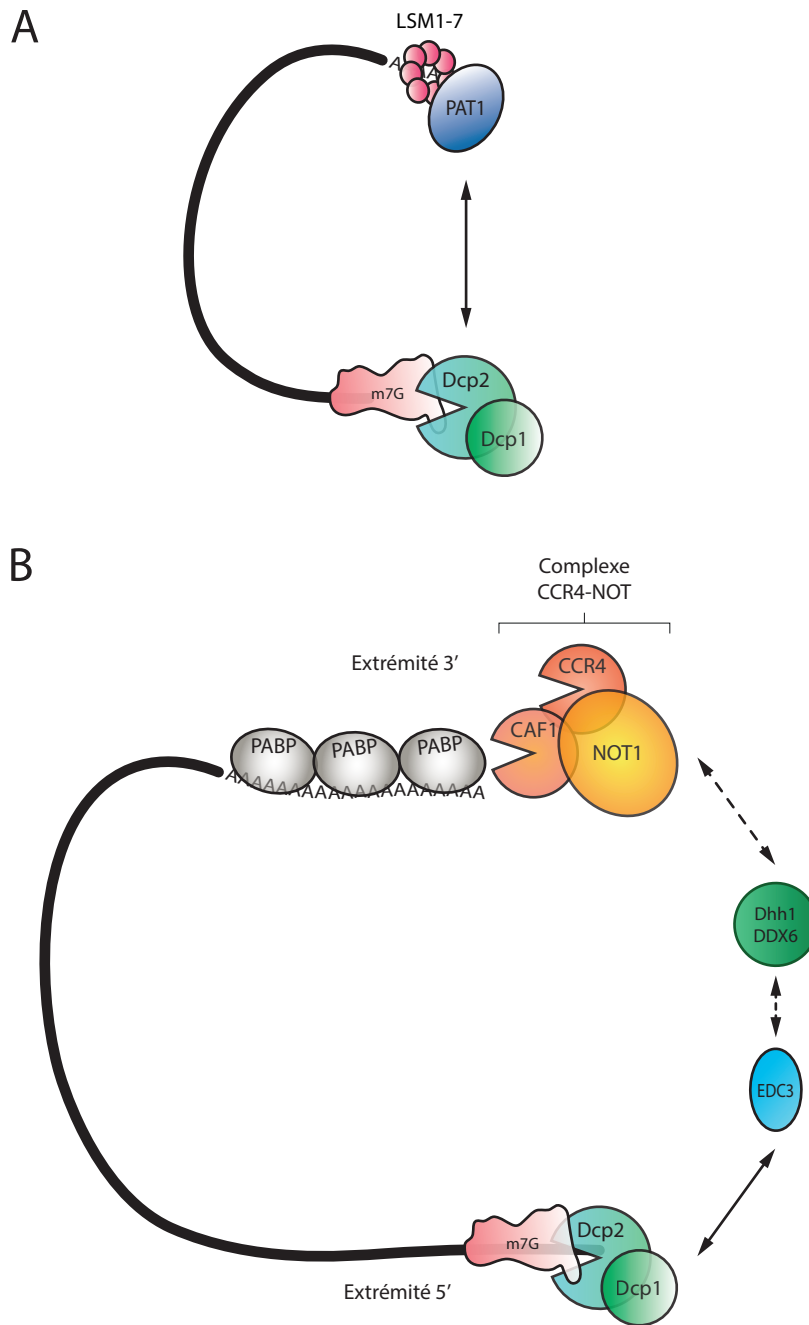


Figure 3 : Recrutement du complexe de decapping via la déadénylation.

(A) Chez la levure, la déadénylation peut-être directement liée à la perte de la coiffe par le complexe co-activateur de l'élimination de la coiffe Pat1-Lsm1-7. Le complexe Lsm1-7 peut se lier à de courtes séquences poly(A), tandis que Pat1 interagit avec l'enzyme DCP2. Ces interactions peuvent alors recruter le complexe de decapping directement sur les queues 3' déadénylées.

(B) Les interactions protéines-protéines relie également le complexe d'élimination de la coiffe en 5' et CCR4-NOT. L'hélicase Dhh1 (DDX6 chez l'humain) se lie à la surface de CNOT1 (composants du complexe CCR4-NOT) et à de courts motifs linéaires FDF (Phe-Asp-Phe) retrouvés dans plusieurs co-activateurs de decapping comme notamment Edc3. (Adapté de (Mugridge et al., 2018)).

(Phe-Asp-Phe) retrouvés dans plusieurs co-activateurs de decapping comme notamment Edc3, Pat1 et Scd6 (Fromm et al., 2012; Sharif et al., 2013). Cela suggère un mécanisme de transfert dans lequel la déadénylation initie la formation du complexe d'élimination de la coiffe en 5'.

I.2.2-Elimination de la coiffe ou decapping :

L'étape suivante, réside dans l'élimination irréversible de la coiffe en 5' qui permet à l'ARNm d'être dégradé dans le sens 5' vers 3' par l'exoribonucléase XRN1 (**Fig. 2**). Cette étape est indispensable pour la dégradation de nombreux ARNm et peut être dépendante, ou dans certains cas, indépendante, de la déadénylation lorsqu'elle est initiée par des mécanismes alternatifs qui n'impliquent pas la queue poly(A). L'hydrolyse de la coiffe est catalysée par l'enzyme DCP2 (Valkov et al., 2017), mais deux autres protéines NUDIX (NUDT3 et NUDT16) possèdent elles aussi une activité permettant l'élimination de la coiffe (Grudzien-Nogalska and Kiledjian, 2017). L'enzyme DCP2 nécessite la présence de la protéine DCP1 pour sa stabilité (Valkov et al., 2017 ; Wurm et al., 2017), ainsi que de nombreux autres co-facteurs comme le complexe LSM1-7/ PAT1B (Vindry et al., 2017), les protéines EDC3 (Fromm et al., 2012), DDX6 (Coller and Parker, 2004), LSM14A et l'ensemble des protéines EDC (Valkov et al., 2017).

Des données de cristallographie, chez la levure, ont permis de comprendre le mécanisme d'activation de l'enzyme Dcp2 par ses co-facteurs. Tout d'abord, l'interaction directe entre les protéines Dcp1 et Dcp2, entraîne un changement de conformation de Dcp2, la faisant passer d'une conformation ouverte inactive à une conformation fermée active (She et al., 2008). De plus, Dcp1 stabilise le domaine catalytique NRD de Dcp2 et recrute les co-facteurs de decapping Edc1 et Edc2, la liaison directe de Edc3 à Dcp2 entraîne une augmentation de l'affinité de Dcp2 pour l'ARNm et stimule son activité catalytique (Charenton et al., 2016). L'interaction entre Dcp1 et Edc1 permet le positionnement de Dcp2 dans une conformation catalytiquement active par rapport à la coiffe de l'ARNm (Mugridge et al., 2018). L'hélicase à ARN Dhh1/DDX6, interagit avec les autres activateurs d'élimination de la coiffe et remodèle le transcrit pour permettre un assemblage efficace du complexe sur l'ARN (Sharif et al., 2013). Chez les métazoaires, l'activation de DCP2, nécessite l'intervention supplémentaire de la protéine EDC4, servant de plateforme d'assemblage pour le complexe de decapping en liant simultanément DCP1, DCP2 et XRN1 et permet au trimère DCP1 d'activer DCP2 (Chang et al., 2014).

I.2.3-Différentes options de dégradation :

Dégradation 5' vers 3' :

Après le decapping par Dcp2, c'est l'exoribonucléase 5' – 3' cytoplasmique XRN1 qui est responsable de la dégradation des ARNm possédant une extrémité 5' monophosphorylée (Jones et al., 2013). Le site catalytique de XRN1 reconnaît l'extrémité 5' de l'ARNm et transloque les nucléotides au fur et à mesure que l'ARNm est hydrolysé. L'ensemble de la structure et des fonctions de la protéine XRN1 feront l'objet d'un chapitre dédié (*l'exoribonucléase 1 5' – 3' (XRN1)*).

Dégradation 3' vers 5' :

Alternativement à la dégradation 5' – 3', les ARNs peuvent être dégradés à partir de leur extrémité 3' par un complexe à plusieurs sous-unités appelé l'exosome (Zinder and Lima, 2017). Le cœur de l'exosome, appelé Exo9, est composé de neuf sous-unités protéiques qui sont hautement conservées chez les eucaryotes (**Fig. 1**). La structure de l'Exo9 est la même dans le cytoplasme et dans le noyau, sa composition et sa formation (*Exosome : dégradation 3' – 5'*). Dans le cytoplasme, l'Exo9 se lie à la sous-unité catalytique RRP44 (*DIS3*) ou à son homologue DIS2L (*DIS3L1*) pour former la forme active de l'exosome, Exo10 (Kowalinski et al., 2016; Tomecki et al., 2010; Zinder and Lima, 2017). À la suite de la déadénylation l'ARNm possède une extrémité 3' non protégée (**Fig. 2**), l'exosome interagit avec cette extrémité pour initier la dégradation 3' – 5'. Enfin, la dégradation de l'ARN s'achève avec la libération de la coiffe seule, ou liée à quelques nucléotides. La protéine DcpS (Dcp Scavenger) peut alors hydrolyser la liaison triphosphate de la coiffe (Liu et al., 2008; Zhou et al., 2015).

I.2.4-Dégradation des ARNm via les miARNs

La voie des ARNs interférents est un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle permettant de cibler l'expression de gènes spécifiques. L'ARN interférence est un mécanisme biologique essentiel et conservé dans l'immense majorité des eucaryotes à l'exception de certaines espèces telles que *Saccharomyces cerevisiae*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosom cruzi* et *Leishmania major* (Cerutti and Casas-Mollano, 2006). Ces régulations font toutes intervenir trois types de petits ARNs non codants : les siARN (small interfering ARN) qui ne sont pas présents chez les mammifères mais sont importants pour la réponse cellulaire contre les virus dans d'autres organismes (Yang et al., 2016), les miARNs impliqués dans la répression

des ARNm (He and Hannon, 2004) et les piARNs (piwi interaction ARN) impliqués dans la répression des éléments transposables dans le génome (Iwasaki et al., 2015). Ce chapitre décrira uniquement les mécanismes moléculaires de la dégradation dépendante des miARNs.

Les miARNs sont de petits ARNs non codants de 22 nucléotides formés à partir de précurseurs appelés miARNs primaires (pri-miARNs) (Winter et al., 2009), issus de la transcription de gènes spécifiques par l'ARN Polymérase II et III (Lee et al., 2002; Zhou et al., 2008). Une fois clivés par l'enzyme DROSHA dans le noyau, les précurseurs de miARN sont exportés dans le cytoplasme par l'Exportine 5 (Wu et al., 2018) où ils pourront acquérir leur forme mature après clivage par DICER.

Reconnaissance des cibles :

La reconnaissance de la cible du miARN se fait principalement par des appariements de type Watson et Crick entre un site du miARN nommé « seed » (2^{ème} au 6^{ème} nucléotides au minimum) (Lewis et al., 2003) et les sites des ARNm cibles souvent retrouvés dans le 3'UTR (**Fig. 4**). La plupart des miARNs augmentent leur site « seed » à 7 ou 8 nucléotides en ajoutant la 8^{ème} ou la 1^{ère} position (située en face d'un A) ou les deux (Lewis et al., 2005). Un autre appariement des sites 13 à 16 du miARN à la région 3' peut venir en complément de la région « seed » (Agarwal et al., 2015), mais ces sites supplémentaires semblent avoir peu d'effet sur l'affinité et l'efficacité de la liaison (Grimson et al., 2007; Salomon et al., 2015). La préférence pour une adénine en face de la 1^{ère} position de l'ARNm est observée quelle que soit la séquence de l'ARNm, ce 1^{er} nucléotide ne permet pas l'appariement avec le miARN, mais une liaison spécifique avec la protéine Argonaute (AGO) (Schirle et al., 2015). Afin de s'apparier à leurs cibles, les miARNs « scan » l'ARNm à l'aide des 2^{ème} au 4^{ème} nucléotides de la région « seed » (Chandradoss et al., 2015). Si l'appariement s'étend sur toute la région « seed » de 7 nucléotides, alors il y aura formation d'une interaction de longue durée, induisant un changement de conformation de la protéine AGO. Ce changement de conformation permettra alors l'appariement du miARN via les nucléotides 2 à 8 et/ou 13 à 16 sur la séquence appelé MRE (miRNA Response Element) de son ARNm cible (Schirle et al., 2014).

Mécanisme de dégradation :

A l'inverse d'autres modèles cellulaires, chez les humains, le mode de répression des miARNs ne nécessite pas un appariement parfait entre un miARN et sa cible (Meister et al., 2004). A la

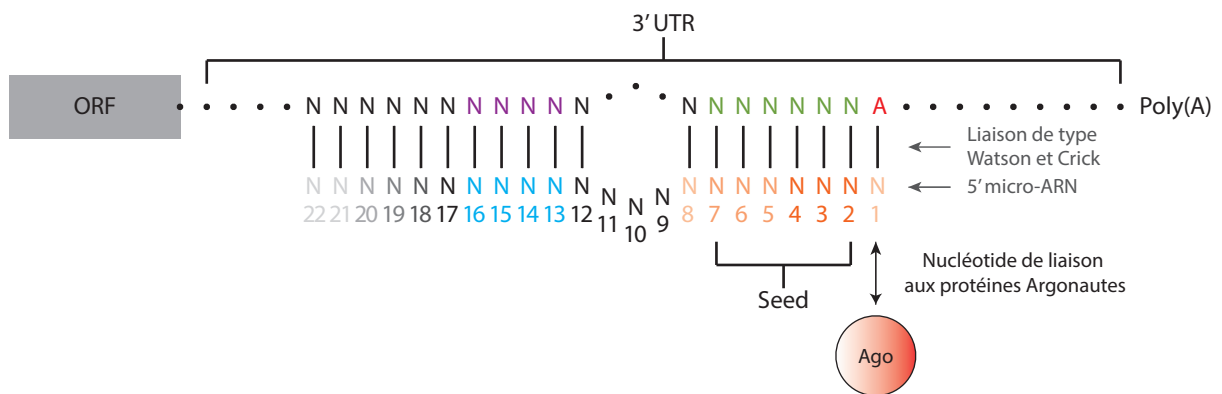


Figure 4 : Reconnaissance micro-ARN – ARN cible.

La reconnaissance de la cible du miARN se fait principalement par des appariements de type Watson et Crick entre le site « seed » du miARN (nucléotides 2 à 6) et les sites majoritairement dans le 3'UTR des ARNm cibles. La 1ère position de l'ARNm est toujours une adénine quelle que soit sa séquence et permet une liaison spécifique avec la protéine Argonaute. La protéine Ago2 a la capacité de reconnaître efficacement des petits sites cibles de trois nucléotides consécutifs (nucléotides 2 à 4) et forme une interaction de longue durée si l'appariement s'étend sur toute la région « seed » de 7 nucléotides. La plupart des miARN augmente leur site « seed » à 7 ou 8 nucléotides en ajoutant le 8ème ou la 1ère position ou les deux. Un autre appariement des sites 13 à 16 du miARN à la région 3' peut venir compléter la région « seed ». Afin de s'apparier à leurs cibles, les miARNs « scan » l'ARNm à l'aide des 2ème au 4ème nucléotides de la région « seed ». Si l'appariement s'étend sur toute la région « seed » de 7 nucléotides, alors il y aura formation d'une interaction de longue durée, induisant un changement de conformation de la protéine AGO. Ce changement de conformation permettra alors l'appariement du miARN via les nucléotides 2 à 8 et/ou 13 à 16 sur la séquence appelé MRE (miRNA Response Element) de son ARNm cible. (Adapté de (Grinson et al., 2007)).

place, il nécessite une protéine adaptatrice TNRC6 (GW182). Après son recrutement par AGO, la protéine TNRC6 interagit avec la protéine PABPC associée à la queue poly(A) et recrute les complexes de déadénylation PAN2/3 et CCR4-NOT (Jonas and Izaurralde, 2015). Les déadénylases vont alors raccourcir la queue poly(A) provoquant une instabilité de l'ARNm par deccapping suivie de sa dégradation 5' – 3' (Chen and Shyu, 2011).

I.3-Dégradation des ARNm aberrants :

La vérification de la qualité des ARNm est un facteur clé pour la production de protéines fonctionnelles. Pour cela, les cellules eucaryotes disposent d'un système de surveillance qui contrôle la qualité des ARNm. Les cellules ont donc différents mécanismes de reconnaissance et d'élimination des transcrits aberrants. La « Nonsense Mediated Decay » (NMD) permet la dégradation des ARNm avec des codons de terminaison prématurés, la « Non-Stop Decay » (NSD) reconnaît et élimine les messagers ne possédant pas de codons de terminaison et la No Go Decay (NGD) prend en charge les ARNm bloqués au cours de l'élongation par les ribosomes (Harigaya and Parker, 2010).

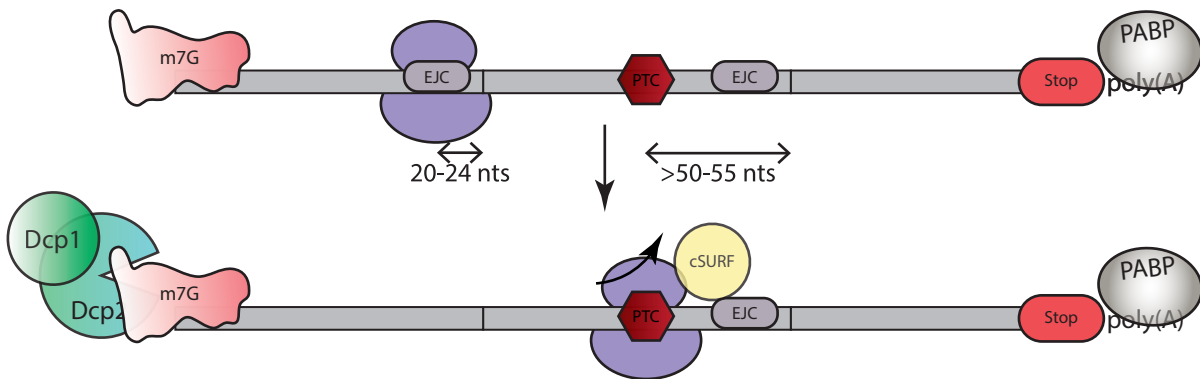
I.3.1-Dégradation des ARNm non-sens (NMD) :

Le modèle d'activation dépendant des EJs (Exon-Junction Complex) :

Chez les mammifères, la voie de dégradation des ARNm non-sens (NMD), est liée à l'épissage des pré-ARNm et des ARNm possédant un codon stop prématuré (PTC : Premature Termination Codon) situé 50 – 55 nucléotides en amont d'une jonction exon – exon (Hug et al., 2016) (**Fig. 5**).

La présence d'un PTC est indiquée par un complexe de jonction d'exon (EJC : exon-junction complex), un complexe protéique à plusieurs sous-unités fixé 20 – 24 nucléotides en amont d'une jonction exon – exon lors de l'épissage du pré-ARNm (Le Hir et al., 2001). L'EJC reste sur l'ARNm jusqu'à ce que la machinerie de traduction, à l'aide de la protéine PYM associée au ribosome, le supprime (Bono and Gehring, 2011; Gehring et al., 2009). Le ribosome supprimera alors tous les EJC jusqu'à ce qu'il rencontre un codon stop. Si l'ARNm ne contient aucun codon stop prématuré, alors aucun EJC ne restera sur l'ARNm. En revanche, si l'ARNm est porteur d'un codon stop prématuré, le ribosome s'arrêtera à ce codon stop et l'EJC en aval ne sera pas éliminé.

Le modèle d'activation dépendant des complexes de jonctions d'exons (EJC):



Le modèle d'activation indépendant des complexes de jonctions d'exons (EJC):

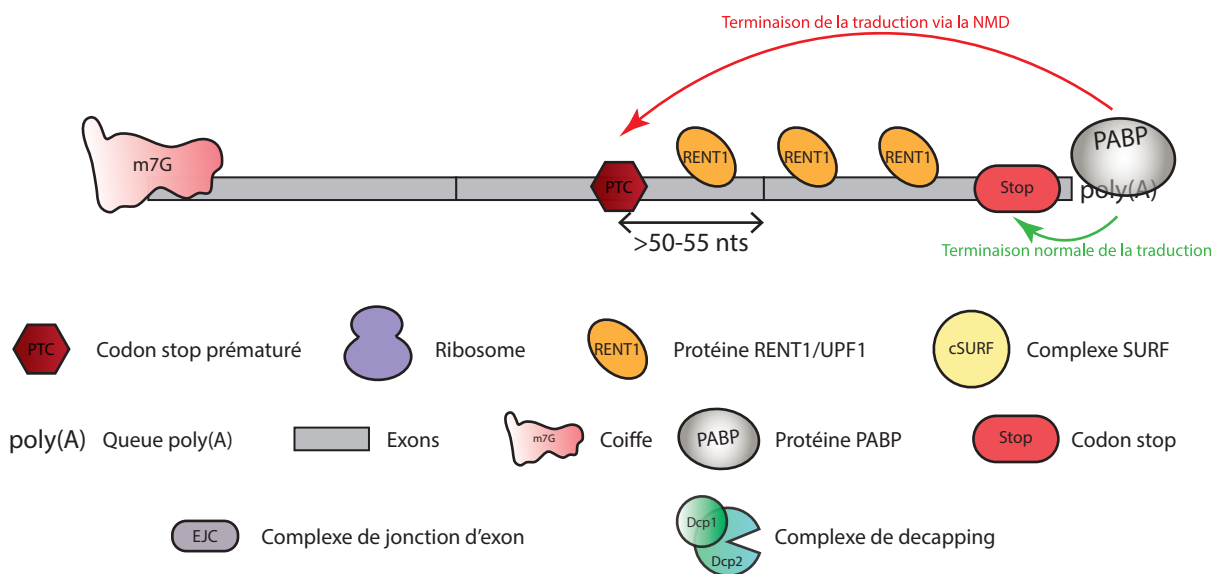


Figure 5 : Dégradation des ARN non-sens (NMD).

Le modèle d'activation dépendant des complexes de jonctions d'exons (EJC) :

La voie NMD est liée à l'épissage des pré-ARNm et des ARNm possédant un PTC (codon stop prématuré) situé 50 – 55 nucléotides en amont d'une jonction exon – exon. La présence d'un PTC est indiquée par un EJC, déposé 20 – 24 nucléotides en amont d'une jonction exon – exon lors de l'épissage du pré-ARNm. Le ribosome lors de son passage sur l'ARNm supprime tous les EJC jusqu'à ce qu'il rencontre un codon stop. En revanche, si l'ARNm est porteur d'un codon stop prématuré, le ribosome s'arrêtera à ce codon stop et l'EJC en aval ne sera pas éliminé. La présence de ce complexe EJC permet le recrutement du complexe SURF formé par SMG1, SMG8, SMG9, RENT1 et les facteurs de libération 1 (eRF1) et 3 (eRF3). La protéine SMG1 phosphoryle RENT1, entraînant le décrochage du ribosome et des facteurs de libérations. Lorsqu'elle est phosphorylée RENT1 interagit avec la protéine PNRC2 (Proline-rich Nuclear Receptor Coregulatory protein 2) et permet le recrutement du complexe de decapping impliqué dans l'initiation du processus de dégradation 5' vers 3'.

Le modèle d'activation indépendant des complexes de jonctions d'exons (EJC) :

Ce modèle est basé sur la distance entre le complexe PTC et PABP. RENT1 et PABP sont en compétition pour la terminaison de la traduction : lorsque le ribosome atteint un codon stop, si RENT1 est liée, alors la NMD sera déclenchée, si PABPC1 est liée, alors il y aura une terminaison normale de la traduction. (Adapté de (Lejeune, 2017)).

La présence de ce complexe EJC permet le recrutement du complexe SURF formé par SMG1 (*SMG1*), SMG8 (*SMG8*), SMG9 (*SMG9*), RENT1 (*UPF1*) et les facteurs de libération 1 (eRF1 : *ETF1*) et 3 (eRF3 : *ERF3B*) (Kashima et al., 2006). La protéine SMG1 va phosphoryler RENT1, entraînant le décrochage du ribosome et des facteurs de libération (Deniaud et al., 2015). Ensuite, SMG5 (*SMG5*), SMG6 (*SMG6*), SMG7 (*SMG7*) (Boehm et al., 2021) et la phosphatase 2A (PP2A ; *PPP2CA* et *PPP2CB*) sont recrutés causant la sortie de SMG1, SMG8 et SMG9 du complexe. Une fois phosphorylée, l'hélicase RENT1 (pRENT1) se lie à l'ARN et élimine les protéines en aval du PTC préparant l'ARNm pour sa dégradation (Fiorini et al., 2015). Lorsqu'elle est phosphorylée RENT1 interagit aussi avec la protéine PNRC2 (Proline-rich Nuclear Receptor Coregulatory protein 2, *PNRC2*) pour recruter l'enzyme de décoiffage DCP1a, impliquée dans l'initiation du processus de dégradation 5' – 3' (Cho et al., 2009).

Le modèle d'activation indépendant des EJC :

Bien qu'il soit clairement défini que la présence d'EJC en aval d'un codon stop prématuré favorise la NMD dans les cellules de mammifères, il existe des preuves d'une réponse NMD en son absence. En effet, un modèle d'activation de la NMD indépendamment de l'EJC a été décrit dans d'autres organismes comme les levures et les nématodes, et semble aussi pouvoir se produire dans les cellules humaines (Bühler et al., 2006; He and Jacobson, 2015). La protéine RENT1 (un des acteurs principaux de la NMD) est capable de se lier aux ARNs cibles avant leur traduction. Lors de la traduction, les ribosomes déplacent RENT1 des séquences codantes vers le 3'UTR, résultant de son accumulation en 3'UTR (Gregersen et al., 2014; Zünd et al., 2013) (**Fig. 5**). De plus, les ARNm possédant de long 3'UTR (3' Untranslated Transcribed Region) se sont révélés sensibles à la NMD, indépendamment de la présence d'un EJC (Kebaara and Atkin, 2009).

Ce modèle serait alors basé sur la distance entre le PTC et PABPC1. D'ailleurs, la distance entre le PTC et la queue poly(A) est un facteur déterminant pour savoir si RENT1 se lie à proximité du PTC (Eberle et al., 2008; Hug et al., 2016; Ivanov et al., 2008). L'hypothèse serait que des éléments spécifiques pourraient être impliqués dans la régulation de la NMD sur les ARNm avec de long 3'UTR, permettant de prévenir des dégradations inutiles par la NMD. Parmi ces éléments régulateurs, les structures secondaires dans le 3'UTR pourrait rapprocher PABPC1 du codon stop positionné correctement et empêcher l'activation inappropriée de la NMD dans ces conditions (Eberle et al., 2008). RENT1 et PABPC1 serait alors en compétition pour la terminaison de la traduction (Fatscher et al., 2015) : lorsque le ribosome atteindra un codon

stop, si RENT1 est liée, alors la NMD sera déclenchée et si PABPC1 est liée, alors il y aura une terminaison de traduction normale. Donc, plus le PTC est proche du début du cadre de lecture ouvert (ORF : Open Reading Frame), plus les chances que RENT1 soit impliquée dans la fin de la traduction et dans le déclenchement de la NMD sont grandes. Ce modèle suggère que l'efficacité de la NMD décroît avec l'augmentation de la proximité du PTC avec le codon stop normal (Lejeune, 2017; Wang et al., 2002).

Le modèle combinatoire :

Il est difficile d'ignorer ces deux modèles au vu des données obtenues sur chacun d'eux. Un modèle combinatoire a été proposé pour concilier ces deux visions, en prenant en compte les deux voies proposées pour l'activation de la NMD (Metze et al., 2013). Dans ce modèle, un PTC peut être reconnu lors de deux étapes successives. Au cours de la première phase de traduction, la voie d'activation de la NMD dépendante de l'EJC serait responsable de la reconnaissance des ARNm contenant des PTC comme décrit précédemment. Plus tard, comme une partie des ARNm contenant des PTC peuvent échapper à la NMD, le modèle d'activation indépendant des EJC dépendant de la distance PTC-PABPC1 pourrait prendre en charge ces ARNm contenant toujours des PTC durant la phase tardive de traduction (Lejeune, 2017).

I.3.2-Dégradation des ARNm bloqués par les ribosomes (NGD) et sans codon stop (NSD) :

La NGD se produit lorsque l'élongation de la traduction est bloquée par la présence de structures stables d'ARN intra- ou intermoléculaires, un clivage enzymatique, des séquences endommagées chimiquement ou la présence de codons rares (Chen et al., 2010; Doma and Parker, 2006; Simms et al., 2017). Ce mécanisme de surveillance a été mis en évidence chez *S. cerevisiae* et chez *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), pour reconnaître les ribosomes bloqués sur des ARNm lors de la traduction (Doma and Parker, 2006; Szádeczky-Kardoss et al., 2018). Ce processus de dégradation de l'ARNm est dépendant de la traduction et implique une endoribonucléase qui clive l'ARNm en amont de la séquence de décrochage du ribosome (Doma and Parker, 2006; Tsuboi et al., 2012; Guydosh and Green, 2017).

La NSD, cible les ARNm dont la transcription est avortée par une polyadénylation prématurée ou une mutation ponctuelle entraînant la perte du codon stop (Frischmeyer et al., 2002; Hoof et al., 2002; Klauer and van Hoof, 2012). Les ARNm ciblés par la NSD sont clivés par un

mécanisme jusqu'à présent non caractérisé, et deviennent des cibles de la NGD, puisque tout ribosome en amont d'une extrémité 3' clivée s'arrête et se décroche (Tsuboi et al., 2012). Les ribosomes bloqués aux extrémités tronquées sont connus pour être « sauvés » par les facteurs Dom34/Hbs/Rli1 permettant leur recyclage pour de nouveaux cycles de traduction (Shoemaker et al., 2010; Guydosh and Green, 2014) et protègent l'extrémité 3' de l'ARNm contre la dégradation 3' – 5' par l'exosome (Kowalinski et al., 2016).

I.4-L'exoribonucléase 1 5' – 3' (XRN1) :

I.4.1-Généralités :

Les exoribonucléases sont des enzymes à la fois de type exonucléase et ribonucléase, c'est-à-dire qu'elles sont capables de dégrader les ARN à partir de leurs extrémités. Il existe donc deux types d'exoribonucléases : les exoribonucléases 5' – 3' (XRN) et les exoribonucléases 3' – 5' (DIS). Ce chapitre sera uniquement consacré aux exoribonucléases 5' – 3' et plus particulièrement à l'exoribonucléase 1 (XRN1).

La famille des enzymes XRN est conservée dans le règne animal (essentiellement XRN1 et XRN2) et végétal avec la présence de trois homologues (XRN2, XRN3 et XRN4) retrouvés par exemple chez *A. thaliana* (Kastenmayer and Green, 2000).

XRN1 (175kDa) (anciennement appelée SEP1 pour Strand-Exchange Protein 1 Homolog) est cytoplasmique et présente uniquement chez les eucaryotes, et est impliquée dans la dégradation des ARN 5' monophosphorylés (Jinek et al., 2011; Stevens, 1980) comme les ARNm ayant perdu leur coiffe ou clivés, la dégradation des ARN non-sens (He and Jacobson, 2001) et la dégradation des miARNs (Jones et al., 2013; Ding et al., 2015; Zangari et al., 2017).

XRN2 (115kDa) est localisée dans le noyau, et son orthologue chez *S. cerevisiae*, plus communément appelé Rat1, a été initialement suggéré pour avoir un rôle dans le trafic des ARNs du noyau vers le cytoplasme (Amberg et al., 1992 ; Kenna et al., 1993) et dans la transcription de certains gènes par l'ARN polymérase III (Di Segni et al., 1993). XRN2 a ensuite été identifiée comme une exoribonucléase cruciale pour le modèle « torpedo » de terminaison de transcription par la polymérase II (Kaneko et al., 2007 ; Kim et al., 2004 ; Luo et al., 2006), et la polymérase I (El Hage et al., 2008 ; Kawauchi et al., 2008). Rat1 favorise également l'élongation des télomères (Luke et al., 2008) et tout comme XRN1 la dégradation des ARNt matures hypomodifiés (Chernyakov et al., 2008). Enfin, chez la levure

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*), l'orthologue de Rat1 est nécessaire pour la ségrégation chromosomique (Shobuike et al., 2001).

Comme mentionné précédemment, aucun homologue de XRN1 n'est codé par *A. thaliana* ou d'autres espèces végétales supérieures. Cependant, nous retrouvons des homologues de XRN2 dont deux nucléaires : AtXRN2, AtXRN3 et un troisième AtXRN4 localisé dans le cytoplasme (Kastenmayer and Green, 2000). AtXRN2/3 dégradent les boucles excisées des précurseurs des miARNs (Gy et al., 2007) tandis que AtXRN2 tout comme son homologue eucaryote est impliqué dans le traitement des ARNs ribosomiaux (ARNr) (Zakrzewska-Placzek et al., 2010). Bien qu'elle soit plus proche de XRN2 que de XRN1, l'AtXRN4 (protéine non essentielle) semble être un substitut de XRN1, puisqu'elle est capable de dégrader le fragment 3' des ARNm créés après clivage par le complexe RISC (Rymarquis et al., 2011). De plus, sa mutation conduit à une accumulation de transcrits sans coiffe suggérant son rôle dans la dégradation des ARNm comme XRN1 (Gregory et al., 2008).

I.4.2-Structure et conservation :

Les protéines XRN partagent deux régions hautement conservées (CR1 et CR2), correspondant aux résidus 1-354 et 426-595 de la protéine XRN1 humaine, avec 48% d'identité entre XRN1 et XRN2 (**Fig. 6**). Comme de nombreuses nucléases, les enzymes XRN nécessitent des ions Mg^{2+} pour leur activité, et un groupe de sept acides aminés conservés dans CR1 est important pour coordonner cette réaction (Page et al., 1998; Solinger et al., 1999; Yang et al., 2006a). En comparaison, la conservation des autres résidus est beaucoup plus faible, cependant un segment faiblement conservé d'environ 120 résidus juste après la région CR2 est nécessaire pour la fonction de Dhp1p, un homologue de Rat1 chez *S. pombe* (Shobuike et al., 2001).

Les protéines XRN1 et XRN2 sont fonctionnellement interchangeables (Cesena et al., 2017; Johnson, 1997). XRN1 est plus grande que XRN2 en conséquence de son segment C-terminal beaucoup plus long, qui est pour la majeure partie unique à la protéine humaine XRN1 (**Fig. 6**). Une séquence faiblement conservée des protéines XRN1 est observée après les résidus 1180 chez l'Homme et 1240 chez *S. cerevisiae* et *Kluyveromyces lactis* (*K. lactis*). Cette séquence faiblement conservée d'environ 570 acides aminés semble néanmoins importante pour l'activité nucléase de la protéine, puisque la troncation des résidus 1206-1528 chez la levure *S. cerevisiae*, conduit à un défaut de croissance, et à une absence d'activité exonucléase *in vitro* (Page et al., 1998). La partie N-terminale de Xrn1 chez *S. cerevisiae*, possède un

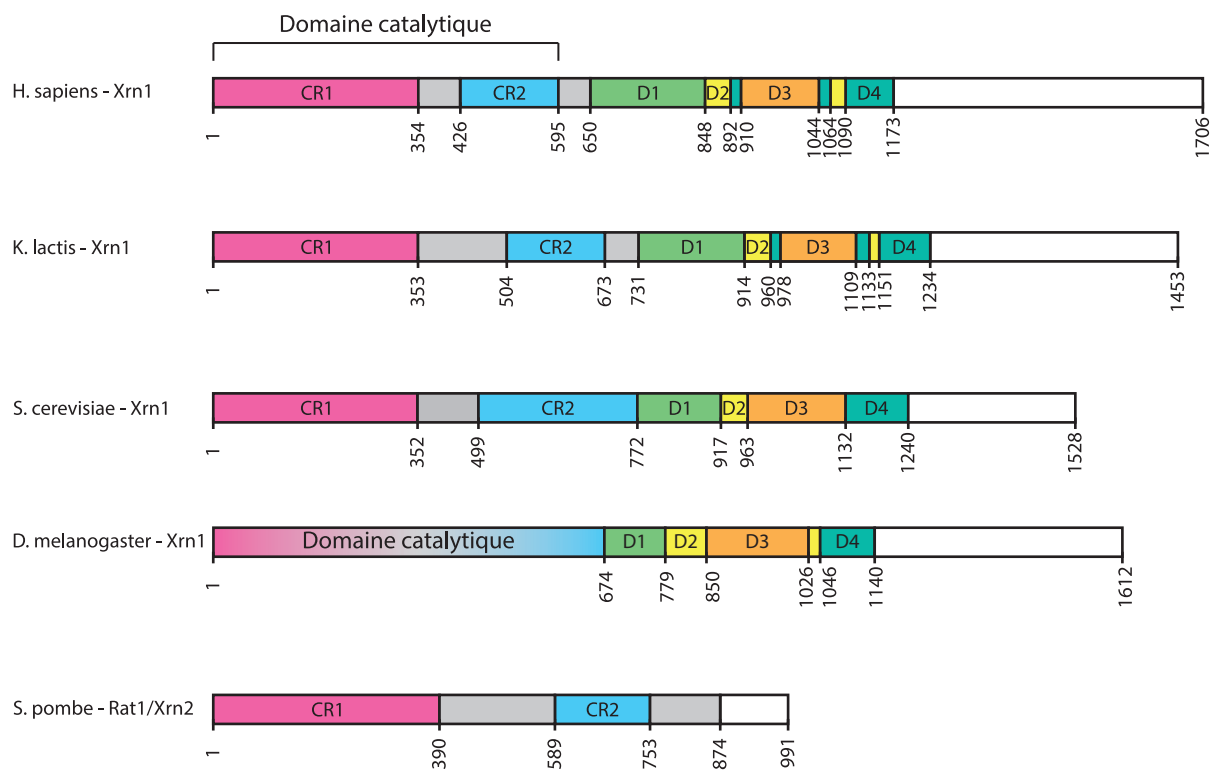


Figure 6 : Organisation des domaines de XRN1.

Dessin schématique de l'organisation des domaines de la protéine XRN1 Humaine (*Homo sapiens*), de *Kluyveromyces lactis*, de *Saccharomyces cerevisiae*, de *Drosophila melanogaster* et de la protéine Xrn2 de *Schizosaccharomyces pombe*. Les protéines XRN partagent deux régions hautement conservés (CR1 et CR2). Directement adjacente à CR1/CR2 se trouve une région composée de 4 domaines (D1-D4) distincts : le domaine D1 présentant une homologie avec les domaines PAZ et Turdor suivie du motif D2 similaire aux domaines KOW/SH3 et de D3 un motif possédant des structures en hélice α et enfin le motif D4, un motif de type SH3.

segment uniquement présent dans la levure (acides aminés 352 à 499) interagissant avec la sous-unité 60S du ribosome lors de la dégradation par NGD (Tesina et al., 2019).

Des analyses par cristallographie des protéines Rat1 chez *S. pombe* (Stevens and Poole, 1995 ; Xiang et al., 2009 ; Xue et al., 2000) et de XRN1 chez *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) et *K. lactis* (Chang et al., 2011; Jinek et al., 2011) révèlent que le site actif de la protéine XRN1 est similaire à celui de Rat1 (XRN2), et que les régions CR1 et CR2 forment un unique large domaine (Chang et al., 2011; Xiang et al., 2009a). Néanmoins, les domaines CR1 et CR2, ne semblent pas suffisants pour l'activité enzymatique des protéines XRN, puisque la présence de segments moins conservés situés après le domaine CR2 sont nécessaires à la stabilisation de leurs domaines catalytiques : pour la protéine XRN1, c'est le domaine Paz/Tudor ou D1, et un site d'interaction avec son partenaire Rai1 pour Rat1 (Chang et al., 2011; Xiang et al., 2009b).

Directement adjacente à CR1/CR2 se trouve une région composée de 4 domaines (D1-D4) distincts (**Fig. 6**) : en premier, le domaine D1 présente une homologie avec les domaines PAZ et Tudor (se liant spécifiquement à la sous-unité 40S du ribosome eucaryote) (Jinek et al., 2011; Tesina et al., 2019), suivi du motif D2 similaire aux domaines KOW/SH3 et de D3 un motif possédant des structures en hélice α et enfin le motif D4, un motif de type SH3. Bien que les fonctions de ces motifs soient encore mal caractérisées, la région C-terminale de XRN1 pourrait servir d'échafaudage protéique pour l'association de facteurs de dégradation de l'ARN (Braun et al., 2012; Chang et al., 2011).

I.4.3-Mécanismes d'actions :

Le mécanisme d'action des protéines XRN est majoritairement dû à la présence de leur domaine catalytique se situant entre les résidus 1 à 1173 pour XRN1. L'étude *in vitro* de ce domaine N-terminal révèle qu'il est suffisant pour la dégradation des ARNs sans coiffe (Chang et al., 2011; Langeberg et al., 2020). En effet, le domaine C-terminal de Xrn1 n'est pas structuré mais joue quand même un rôle dans la dégradation des ARNs *in vivo* puisqu'il est impliqué dans la liaison à d'autres facteurs de dégradation des ARNs, comme le complexe de décoiffage chez la levure (Braun et al., 2012; Chang et al., 2011, 2019). Cela amène à un modèle général dans lequel la partie conservée N-terminale de XRN1 est importante pour la fonction catalytique tandis que la partie C-terminale moins conservée participe à diverses régulations selon les espèces.

La partie catalytique de la protéine Xrn1, est constituée de sept résidus hautement conservés : Asp35, Asp86, Glu176, Glu178, Asp206, Asp208 et Glu291, impliqués dans la liaison de deux ions magnésium (Chang et al., 2011; Jinek et al., 2011; Tesina et al., 2019) (**Fig. 7**). Les trois premiers nucléotides de l'ARN sont maintenus en position par deux résidus hautement conservés, His41 et Trp540. Quatre autres résidus Lys93, Glu97, Arg100 et Arg101 forment une poche basique et constitue le site actif. Ces résidus interagissent avec le 5' phosphate de l'ARN et positionne le premier nucléotide afin que sa liaison phosphate soit exposée aux deux ions Mg^{2+} . Après le clivage, l'His41 et la poche basique déplace le nucléotide suivant vers le site actif via un mécanisme à cliquet brownien (mécanisme permettant un mouvement perpétuel). De plus, la longueur du substrat est importante pour une dégradation efficace, car une séquence trop courte (inférieure à 4 nucléotides) n'est pas suffisante pour atteindre le site actif (Chang et al., 2011; Jinek et al., 2011; Nagarajan et al., 2013).

Cependant, la structure du site actif limite le type d'ARN pouvant y être dégradé, puisque les ARNs possédant une coiffe ou un triphosphate en sont exclus. *In vivo*, la présence de structures secondaire stables, comme des « épingles à cheveux » largement appariées en base ou des tétraplexes G4, peuvent bloquer la processivité de XRN1. Les tétraplexes G4 ou G-quadruplexes (G4) sont des structures non canoniques à quatre brins formés dans des séquences d'ADN ou d'ARN riches en acide nucléique guanine. Ces régions riches en guanine se retrouve au niveau des télomères humains, des régions promotrices d'oncogènes, des sites d'initiation de la réplication et dans les régions 3' et 5' UTR de certains ARNm. Ces séquences G4 sont particulièrement présentes dans les agents pathogènes humains comme certains virus (le virus de la fièvre de la vallée du Rift) (Charley et al., 2018). XRN1 semble tout de même pouvoir dégrader certains ARNs structurés, puisqu'elle a la capacité de dégrader des duplex ARN-ADN. Le déroulement du duplex ARN/ADN serait provoqué par la translocation du substrat à travers un canal étroit entre l'hélice $\alpha 1$ de la partie N-terminale et la boucle contenant le Trp540 excluant les régions doubles brins (**Fig. 8**) (Jinek et al., 2011).

I.4.4-Co-facteurs interagissant avec XRN1 :

Bien que la partie catalytique seule de XRN1 soit suffisante à son activité *in vitro* (Chang et al., 2011; Langeberg et al., 2020), sa région C-terminale semble tout aussi importante puisqu'elle est impliquée dans la liaison à de nombreux facteurs (Braun et al., 2012; Chang et al., 2011, 2019). Tout d'abord, la partie C-terminale (domaine CIR : C-terminal Interacting Region) de la

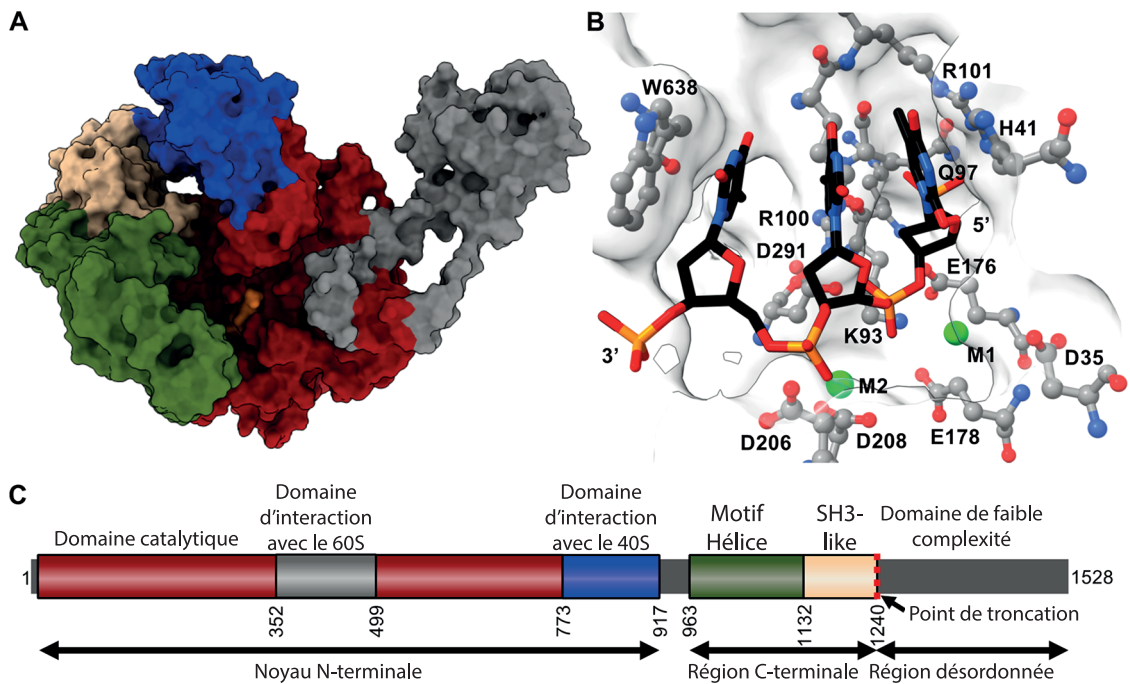


Figure 7 : Modèle structurel du site catalytique de la protéine Xrn1 de *S. cerevisiae*.

(A) Modèle structurel de ScXrn1ΔC (sans la partie Cterminale (1240 à 1528)) généré à l'aide du logiciel I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) : une méthode bio-informatique permettant de prédire un modèle de structure tridimensionnel de protéines à partir de séquences d'acides aminés. Les régions sont colorées pour correspondre à l'architecture du domaine dans le panneau C ; un substrat trinuécléotidique d'ADN, dTdTdT est coloré en orange.

(B) Site actif de la structure générée par I-TASSER de ScXrn1ΔC avec le substrat trinuécléotidique TTT et des ions métalliques.

(C) Architecture des domaines de ScXrn1. Le noyau N-terminal (résidus 1-773) de l'enzyme comprend le site actif. La région de résidus suivante, 774-917 forme un domaine interagissant avec la sous-unité 40S du ribosome. Les résidus 963-1132 et 1133-1240 forment des motifs ressemblant le plus à des motifs en hélices et SH3 respectivement. Le point de troncature de ScXrn1ΔC est indiqué par une ligne pointillée rouge au niveau du résidu 1240. (Tiré et traduit de (Langeberg et al., 2020)).

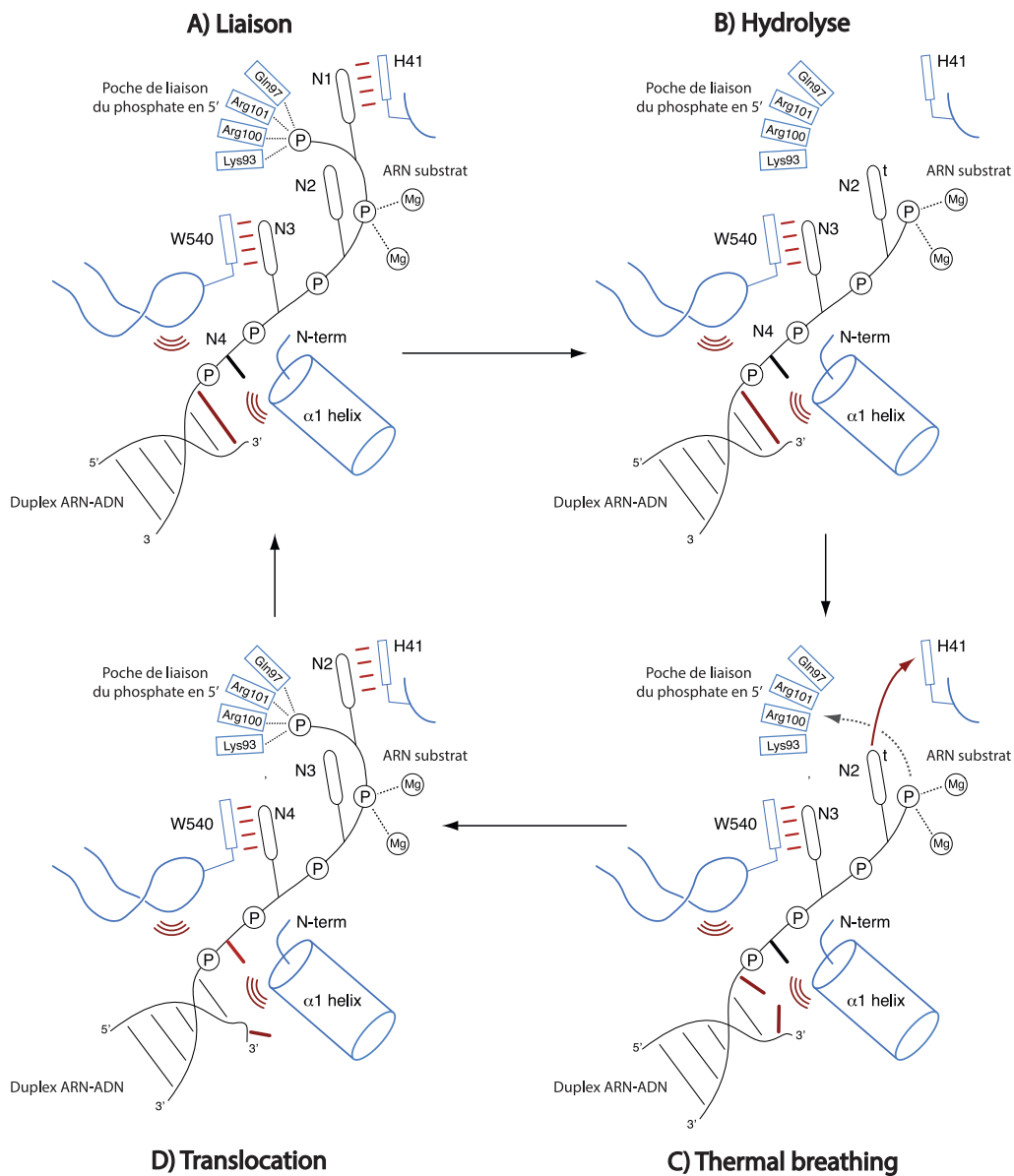


Figure 8 : Modèle de déroulement de duplex ARN/ADN et son hydrolyse par Xrn1.

A) Après le clivage et la libération du produit nucléotidique monophosphate, **B)** Xrn1 reste lié au substrat. **C)** L'ouverture transitoire de la paire de base terminale (la plus proche du canal) du duplex par « thermal breathing », permet au substrat d'avancer au travers du canal étroit entre l'hélice $\alpha 1$ de la partie N-terminale et la boucle contenant le Trp540. **D)** La translocation du substrat se produit par un mécanisme de cliquet brownien dans lequel les interactions du dernier nucléotide 5'-terminal avec His41 et la poche de liaison au phosphate en 5' et l'hydrolyse oriente la dégradation du duplex. (Adapté de (Jinek et al., 2011)).

protéine XRN1 chez *D. melanogaster* interagit directement avec les protéines DCP1 et EDC4. La protéine DCP1 reconnaît une région riche en proline localisée dans le domaine DBM (DCP1-binding motif) de XRN1 via son domaine EVH1 (Braun et al., 2012; Towler and Newbury, 2018). De plus, chez la levure Xrn1 se lie également avec Dcs1 *in vitro*, une enzyme impliquée dans l'élimination de la coiffe (Liu and Kiledjian, 2005; Sinturel et al., 2012). Malgré la faible conservation de la partie C-terminale, chez les vertébrés, la protéine XRN1 est aussi capable de se lier à EDC4 via le motif EDC4-BM (EDC4 Binding Motif) dans la région CIR au niveau des résidus 1650 à 1706 chez l'Homme, permettant le maintien des interactions avec le complexe d'élimination de la coiffe (Chang et al., 2014). Chez la levure et chez l'Homme, le domaine CIR de XRN1 interagit aussi avec la protéine PATL1 (Charenton et al., 2017; Chang et al., 2019; Nissan et al., 2010), et le complexe CCR4-NOT par l'intermédiaire de CAF1/CNOT7 (Chang et al., 2019).

Ces différents facteurs sont importants pour l'activité de la protéine XRN1, puisque mise à part leurs interactions, elles permettent le recrutement d'autres protéines formant un complexe important pour l'activité catalytique de la protéine. Par exemple, la liaison de Xrn1 avec Pat1 permet le recrutement du complexe Lsm1-7 et stabilise les régions 3' de l'ARNm afin d'empêcher sa dégradation par son extrémité 3' (Chowdhury et al., 2007; Tharun, 2009). Cette liaison joue aussi un rôle dans l'activité de Dcp2 entraînant une répression de la traduction (Nissan et al., 2010). Ensuite, les protéines XRN1 s'associent aux protéines UPF, des composants essentiels de la voie NMD aidant à éliminer les transcrits aberrants (Lejeune, 2017). Enfin, le complexe composé de XRN1, DCP2, de la protéine tristétraproline (TTP) et des composants de l'exosomes (Lykke-Andersen and Wagner, 2005) permet la dégradation des transcrits contenant des éléments riches en adénine et en guanine (Mukherjee et al., 2002). La protéine TTP est une protéine à doigt de zinc qui se lie à l'ARNm possédant des éléments riches en arginine et en uracile (ARE : AU Rich Element), et permet leur stabilisation et leur dégradation. A l'appui de ces résultats, la délétion de XRN1 stabilise les ARNm contenant des ARE (Courel et al., 2019; Pashler et al., 2021), et pourrait être responsable de leur accumulation dans des granules de stockage des ARN : les « processing bodies » (p-bodies) (Sheth and Parker, 2003).

I.4.5-Conséquences d'un défaut de XRN1 :

Dans les cellules eucaryotes, il semble que la protéine Xrn1 soit particulièrement impliquée dans la croissance, puisqu'une mutation de *Xrn1* entraîne dans de nombreux organismes un défaut de croissance (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, le parasite protozoaire *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) et *Cryptococcus neoformans* (*C. neoformans*)), cependant cela n'affecte pas la viabilité chez la levure *S. cerevisiae* (An et al., 2004; Kim and Kim, 2002; Larimer and Stevens, 1990; Li et al., 2006; Zhao et al., 2020). De nombreux autres phénotypes sont visibles après mutation de XRN1 chez ces organismes.

Xrn1 est aussi impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, puisque sa délétion chromosomique chez *C. neoformans* conduit à une augmentation dans l'expression de gènes de facteurs de transcription liés au cycle cellulaire et de la chitine synthase (Zhao et al., 2020).

Ensuite, chez *C. albicans* et *T. brucei*, Xrn1 cible des ARNm particuliers impliqués dans la méiose puisque l'exosome est incapable de compenser leur dégradation en absence de Xrn1. Cependant, nous ne savons pas si ces phénotypes sont dus à des effets directs de Xrn1 sur ces cibles particulières ou à un effet indirect (An et al., 2004; Li et al., 2006).

Enfin, XRN1 est un acteur essentiel de la voie de dégradation des ARNs non-sens, et chez la levure, les protéines impliquées dans cette voie de dégradation sont capables de se lier aux télomères et d'en contrôler la taille (Azzalin et al., 2007; Chawla et al., 2011). En effet, la perte de ces protéines cause des raccourcissements télomériques (Holstein et al., 2014) et des levures mutantes d'*Xrn1*, présentent des télomères de tailles modifiées (Ungar et al., 2009). Une étude plus poussée a mis en évidence l'importance de Xrn1 dans le mécanisme de contrôle des dommages à l'ADN.

Chez *C. elegans*, un RNAi contre *xrn1* entraîne un défaut dans le développement de l'embryon provoquant sa létalité (Newbury and Woollard, 2004). Chez *D. melanogaster*, les mutants *Xrn1* présentent également des défauts de développement tels que la présence de disque imaginaux plus petits et une fécondité réduite (Jones et al., 2012; Waldron et al., 2015). De plus, l'analyse du rôle de XRN1 dans la formation des disques imaginaux révèle son rôle clé dans le contrôle de l'apoptose puisque sa perte augmente l'expression de deux ARNm pro-apoptotiques *hid* et *reaper* lors du développement (Waldron et al., 2015; Jones et al., 2016). De la même manière, chez la souris, le knockdown de *Xrn1* est léthal (stade embryonnaire E10,5) et un knockdown conditionnel spécifique du cerveau antérieur (*Xrn1-cKO*) conduit à

l'obésité des souris (résistance à la leptine, hyperglycémie, hyperphagie, et diminution de la dépense énergétique) (Takaoka et al., 2021).

Ces données suggèrent que XRN1 est nécessaire à certains moments du développement pour cibler un ensemble spécifique d'ARNs impliqués dans le changement morphologique des cellules, le mouvement cellulaire, l'apoptose ou la prolifération.

I.4.6-Pathologies associées à un défaut de XRN1 chez l'Homme

Mutations de XRN1 dans le cancer :

Chez l'humain, les mutations dans le gène XRN1, peuvent entraîner un ostéosarcome, la troisième forme la plus courante de cancer chez l'adolescent avec un second pic survenant entre 60 et 80 ans en particulier chez les personnes atteintes de la maladie de Paget. L'ostéosarcome se développe souvent aux extrémités des os longs des bras ou des jambes, bien qu'il puisse aussi survenir au niveau du crâne ou du bassin. La principale cause de décès chez ces patients est la propagation des cellules cancéreuses aux poumons. Ces tumeurs proviennent de cellules mésenchymateuses qui ne se différencient pas de manière appropriée, ne pouvant ainsi pas produire correctement des ostéoïdes (Laurence et al., 2012; Zhang et al., 2002). En effet, l'étude de lignées cellulaires de sarcome ostéogénique primaire et des échantillons de biopsies de patients, révèle une réduction de l'expression de l'ARNm de XRN1 suggérant que cette réduction soit un avantage aux cellules tumorales. XRN1 étant impliquée dans la dégradation d'ARNm et de miARNs spécifiques (Courel et al., 2019; Pashler et al., 2021), sa régulation négative peut conduire à leur expression accrue, pouvant favoriser un phénotype cancéreux. Enfin, une analyse de la séquence de XRN1 dans la lignée TE85 (lignée primaire dérivée d'un ostéosarcome) possède une mutation homozygote faux-sens conduisant à une modification d'un acide aminé conservé (Asp1137 en Asn1137) (Zhang et al., 2002). Par conséquent, XRN1 pourrait être essentielle pour une formation osseuse correcte chez l'Homme.

Rôle de XRN1 dans la réponse virale :

Dans les cellules eucaryotes, le mécanisme de dégradation des ARNs joue un rôle majeur dans la détermination de la quantité et de la qualité des ARNm. À la suite d'une infection, lorsque les transcrits viraux à ARN simple brin sont libérés dans le cytoplasme des cellules, ces ARNs sont reconnus comme étrangers par le mécanisme de dégradation des ARNs. En effet, plusieurs caractéristiques permettent à la voie de dégradation de les reconnaître : la présence

de modifications non conventionnelles en 5' (Chang et al., 2016; Hyde and Diamond, 2015), l'absence d'une queue poly(A) (Ibrahim et al., 2008; Molleston and Cherry, 2017), une signature ribonucléoprotéique inhabituelle (Hogg, 2016), ou un positionnement d'ORF provoquant la NMD (Balistreri et al., 2017). L'augmentation de la quantité de transcrits viraux ainsi que la présence d'une répllication des gènes viraux est cohérente avec l'idée que ces pathogènes ont développé des stratégies efficaces pour détourner la machinerie de dégradation cellulaire (Moon and Wilusz, 2013). A l'inverse, l'incapacité d'échapper aux mécanismes de dégradation de l'ARN cellulaire se traduit par une diminution de l'ARN viral (Garneau et al., 2008; Ng et al., 2020). Ainsi, la machinerie de dégradation des ARNs fait partie de la réponse antivirale cellulaire de première ligne.

Une grande variété de virus, comme le virus de la maladie de Newcastle (NDV) et le virus de l'encéphalomyocardites (EMCV), induit la formation de granules de stress antiviraux (SGav), importants pour les réponses à l'interféron de type I (IFN-I) induites par les récepteurs « RIG-I-like » (Liu et al., 2021; Ng et al., 2019). Ces SGav sont composés des enzymes XRN1 et DCP, ainsi que de composants viraux. Cependant, ce ne sont ni des granules de stress, ni des p-bodies, mais bien un type de granules spécifiques à ces infections virales indispensable à la réponse antivirale (Ng et al., 2020). Même si ces études soulignent l'importance de la protéine XRN1 dans la réponse antivirale, les virus à ARN ont développé de nombreuses stratégies leurs permettant de protéger leurs transcrits de la dégradation. En particulier, certains virus sont capables par le biais d'une structure particulière dans leur région 3' UTR de se protéger d'une dégradation 5' – 3' par l'enzyme XRN1 (Akiyama et al., 2016; Chapman et al., 2014a; Charley et al., 2018; Moon et al., 2015).

Blocage de XRN1 par la région 3' UTR des ARN viraux :

Certains virus de la famille des Flavivirus (le virus du Nil occidental (WNV)), le virus de la Dengue de type 2 (DENV-2) et le virus Zika) contiennent dans leur région 3'UTR un repliement à trois hélices qui bloque l'enzyme XRN1 lorsqu'elle dégrade les transcrits (**Fig. 9**) (Chapman et al., 2014, 2014; Akiyama et al., 2016). En effet, la partie 3'UTR des Flavivirus est composée de plusieurs structures secondaires conservées, l'une d'elle est la structure dite « tige-boucle » (SL: Steem-Loop) et est responsable de ce blocage (Chapman et al., 2014b). Ces séquences particulières sont communément appelées xrRNA (Xrn1 resistant RNA), et empêchent la dégradation de l'ARN viral par la protection de son 5' phosphate du site actif de l'enzyme XRN1 (Chapman et al., 2014a). Le blocage de XRN1 par cette structure après

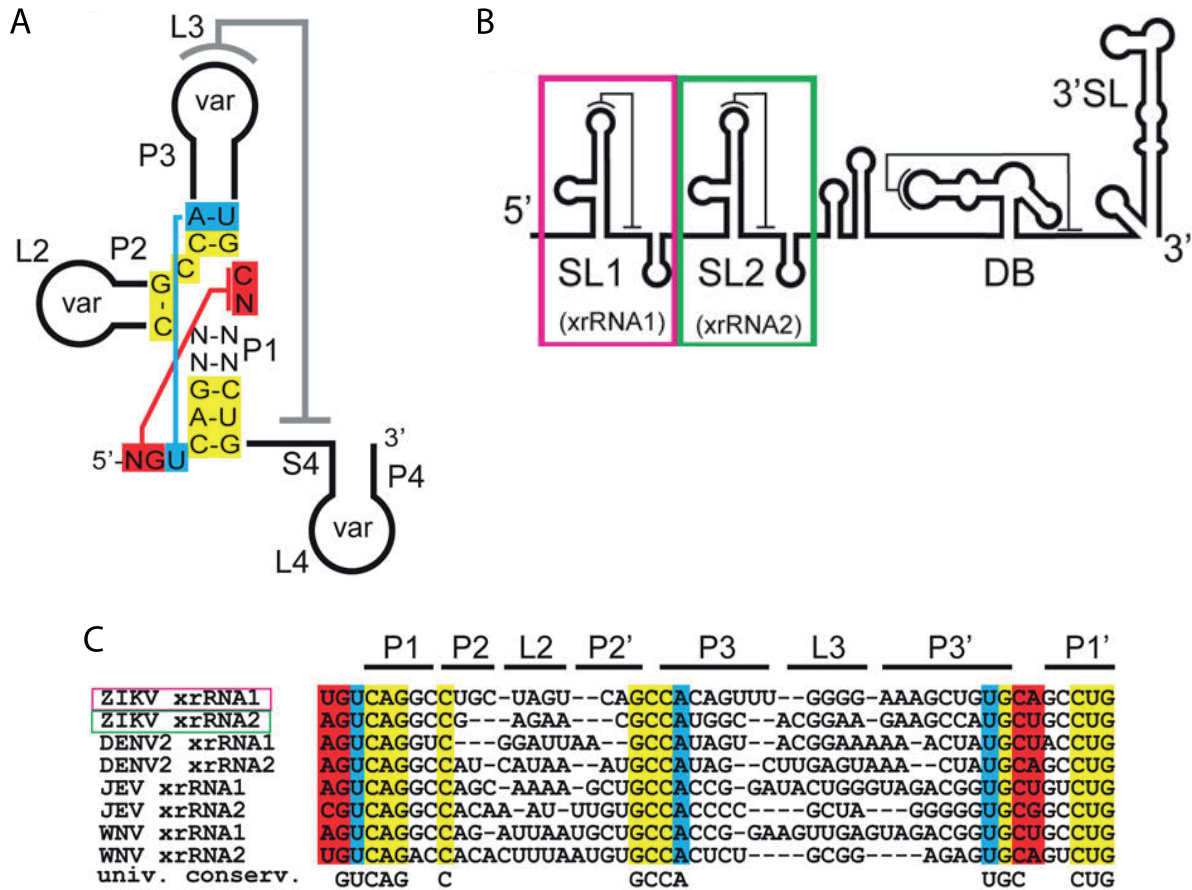


Figure 9 : Structure des séquences d'ARN résistantes à la dégradation par XRN1 du virus Zika (xrARN).

(A) Schéma de la structure secondaire avec la conservation de séquence d'ARN résistants à XRN1 de type « tige-boucle » (SL : Stem-Loop) du virus Zika (ZIKV), du virus de la dengue (DENV2), du virus de l'encéphalite japonaise (JEV) et du virus de Nil occidental (WNV). Les nucléotides universellement conservés et la position des interactions tertiaires sont indiqués. Les tiges P2, P3 et P4 et les boucles associées contiennent des séquences variables (var). **(B)** Modèle de la prédiction de la structure secondaire de la séquence de la région 3' UTR du virus Zika (ZIKV) des structures en « tige-boucle » (SL) et en « altère » (DB : dumbbell). **(C)** Alignement des séquences de plusieurs ARN résistants à XRN1 (xrARN) connues avec les régions conservées (colorées) comme dans le panel A. (Adapté de (Akiyama et al., 2016)).

dégradation partielle par XRN1 de ces transcrits conduit à l'accumulation de grandes quantités d'ARNs possédant un 3'UTR plus court, communément appelé ARNsg (ARN sous-génomique) (**Fig.10**) (Funk et al., 2010; Pijlman et al., 2008; Silva et al., 2010; Zhang et al., 2020). La génération de cet ARN semble importante pour le succès de l'infection par les Flavivirus puisqu'il est capable de moduler les réponses antivirales à l'interféron (Funk et al., 2010; Pijlman, 2014; Schnettler et al., 2012; Schuessler et al., 2012). De plus, la présence d'ARNsg et la répression de XRN1 dans des cellules infectées sont associées à une augmentation de la stabilité des ARNm cellulaires et participent à l'inhibition de la réponse des cellules à l'infection virale (Moon et al., 2012; Michalski et al., 2019).

Ces structures xrRNA ne sont pas exclusives aux Flavivirus. Les Benyavirus, les Cucumovirus et les Dianthovirus infectant les plantes produisent eux aussi un ARN sous-génomique suite à l'action de XRN1 (Iwakawa et al., 2008; Steckelberg et al., 2018). Cependant, la séquence 3' UTR des Dianthovirus n'a montré aucune similitude par rapport à celle des Flavivirus, une analyse par cristallographie aux rayons X a révélé la présence de repliements complexes très différents de ceux présents dans les xrRNA des Flavivirus capables de bloquer XRN1 (Steckelberg et al., 2018). Enfin, de nombreux Benyavirus et Cucumovirus possèdent dans leur 3'UTR des motifs « coremin », ces motifs sont des structures hautement conservés de 20 nucléotides formant une structure en forme « d'épingle à cheveux » capables elles aussi de bloquer la progression de XRN1 sur l'ARN viral (Peltier et al., 2012; Dilweg et al., 2019).

Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (Genre Phlebovirus, Famille des *Bunyaviridae*) possède lui aussi la capacité de bloquer la protéine XRN1 sur son ARN. La région responsable de l'entrave de XRN1 est une zone riche en guanine (G) probablement capable de former des G-quadruplexes (Charley et al., 2018). Bien que ce motif riche en G soit conservé dans la région 3' N-terminale d'un autre Phlébovirus : le virus de la fièvre à phlébotomes de Naples, cela ne peut pas être généralisé à tous les Phlébovirus, puisqu'il n'est pas présent dans le génome du virus Heartland par exemple (Charley et al., 2018).

Blocage de XRN1 par la région 5' UTR des ARNs viraux :

D'autres études sur le virus de l'hépatite C (VHC) et le virus de la diarrhée bovine (BVDV), ont permis de mettre en évidence que la répression de XRN1 par une région non codante est une stratégie conservée au cours de l'évolution permettant le succès de l'infection (Moon et al., 2015). Ces structures peuvent aussi être situées dans la partie 5' non codante de l'ARN viral,

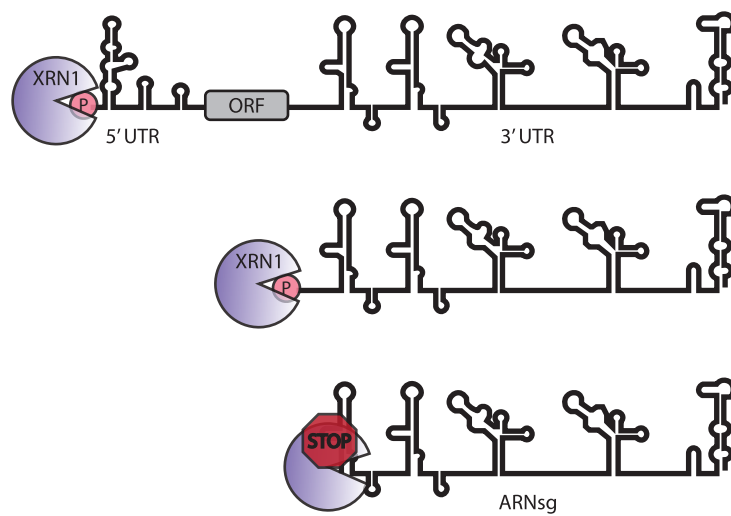


Figure 10 : Formation des ARN sous-génomique des flavivirus.

La protéine XRN1 se charge sur l'ARN décapé et monophosphorylé et dégrade environ 10kb d'ARN avant d'être bloquée dans la région 3' UTR virale. L'ARN restant est appelé l'ARN sous-génomique (ARNsg). (Adapté de (Chapman et al., 2014)).

résultant en des intermédiaires de dégradation de XRN1 plus grands (xrRNA) et pratiquement intacts en comparaison aux ARNsg évoqués précédemment (Houe, 2003; Moon et al., 2015).

La région 5'UTR du virus de l'hépatite C n'est pas uniquement importante par la présence de sa structure particulière. Elle possède deux sites de liaison du miR-122 (S1 et S2) en amont de son IRES (Li et al., 2013; Thibault et al., 2015). La liaison sur ces sites de ce miARN est importante pour l'accomplissement du cycle du virus et pour la production de virus infectieux (Jangra et al., 2010). Tout comme un miARN classique, le miR-122 va recruter la protéine Argonaute 2 (AGO2) sur l'ARN viral (Shimakami et al., 2012). Cependant, contrairement à l'action typique des miARNs, cette interaction permet de stabiliser l'ARNm du VHC. En effet, la stabilité conférée par le complexe miR-122/AGO2 est fonctionnellement comparable à l'addition d'une coiffe en 5', entraînant la protection de l'ARN du VHC contre sa dégradation par l'exoribonucléase XRN1 (Shimakami et al., 2012).

I.4.7-Outils moléculaires utilisant la protéine XRN1 :

L'ARN est une plateforme émergente pour l'administration de médicament, mais la forte activité de l'enzyme XRN1 est un obstacle majeur non seulement pour la mise en œuvre de ces traitements *in vivo*, mais aussi pour l'étude de la dynamique de dégradation des ARNs.

Les méthodes existantes jusqu'à présent pour le suivi de la dégradation des ARNm cibles s'appuyaient sur la stabilité des intermédiaires de dégradation via la suppression des composants de la machinerie de dégradation, ce qui interfère grandement avec les processus cellulaires impliqués dans le renouvellement des ARNm. Pour résoudre ce problème, une équipe a développé un ARNm rapporteur capable de visualiser la dégradation d'ARNm instables et d'évaluer la dynamique spatiale et temporelle du renouvellement des ARNm. Cet ARNm rapporteur utilise des structures d'ARNs de Flavivirus (xrRNA) permettant de rendre les transcrits résistants à la dégradation par XRN1 (Voigt et al., 2019). Ainsi, la stabilité des intermédiaires de dégradation 5' – 3' sont considérablement augmentés, permettant leurs distinctions avec les transcrits intacts.

L'utilisation de dérivés de molécules d'ARNs biologiques ou synthétiques peuvent être combinés en structures d'ARN unique et multifonctionnelle (Jasinski et al., 2017). Plusieurs de ces structures se sont révélées prometteuses en tant que véhicules pour la livraison de petit duplex d'ARN interférent (siARN) (Afonin et al., 2014; Shu et al., 2011; Zakrevsky et al., 2020). Cependant, la susceptibilité de l'ARN à la dégradation par XRN1 est un obstacle au

développement de ces applications. Ont alors été développés, des molécules xrARN-siARN s'autoassemblant *in vitro* résistant à la dégradation par l'enzyme XRN1 et permettant l'extinction du gène cible (Harvey et al., 2021).

De plus, une équipe a soulevé la possibilité d'une nouvelle technique de séquençage des ARNs basée sur l'exoséquençage de l'ARN (séquençage par dégradation plutôt que par synthèse) (Athapattu et al., 2021) à l'aide de la protéine XRN1 immobilisée sur un support solide. La présence de 45 résidus lysine sur la protéine XRN1 fournit une abondance de sites de fixations potentiels permettant une fixation covalente sur un support solide. Dans ce contexte, ils ont déterminé la processivité de la protéine XRN1 lorsqu'elle est immobilisée. La vitesse de dégradation de XRN1 *in vivo* est de 38 à 55 nt/s (Hoek et al., 2019) et de $17,3 \pm 0,6$ nt *in vitro* à 37°C (Langeberg et al., 2020), lorsqu'elle est immobilisée et à 25°C (qui n'est pas sa température optimale) sa vitesse de dégradation est de 26 ± 5 nt/s (vitesse qui serait probablement augmentée à 37°C). De ce fait, des travaux sont toujours en cours afin de développer une technique de séquençage des ARNs, via l'exoséquençage par la protéine XRN1.

II-Stockage des ARNs :

Les cellules eucaryotes coordonnent leurs réactions biochimiques à l'aide d'organites. En plus des organites traditionnels possédant une membrane, les cellules présentent une vaste gamme de compartiments sans membrane (MLO : MembraneLess Organelles). Ces condensats sans membrane diffèrent des organites par leurs capacités à se former et à se dissiper rapidement (Brangwynne et al., 2009; Riback et al., 2017), ainsi que par leurs perméabilités (Schuster et al., 2018; Wei et al., 2017). Ils se localisent dans toute la cellule, des compartiments nucléaires, tels que les nucléoles, les « Cajal bodies », ou les « nuclear speckles » aux compartiments cytosoliques comme les Stress Granules (SG) et les « processing bodies ». Ils ne diffèrent pas uniquement par leur localisation, mais aussi par leur composition et leur taille, certains peuvent atteindre le micromètre comme les nucléoles et les SG (Anderson and Kedersha, 2006; Berchtold et al., 2018; Hernandez-Verdun, 2006) tandis que d'autres comme les p-bodies sont plutôt de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomètres (Cougot et al., 2012). Ces granules ne sont pas seulement composées d'ARN, un grand nombre de protéines s'associant aux ARNs y sont aussi retrouvé, ces protéines possèdent des domaines de faibles complexités ainsi que des régions désordonnées (Darling et al., 2018).».

II.1-Composition des p-bodies :

II.1.1-Composition protéique :

XRN1 est la première protéine des p-bodies pour laquelle la localisation a été mise en évidence sous forme de foci (Bashkirov et al., 1997), ensuite ce sont les protéines DCP1/DCP2, LSM1-7, TNRC6 (GW182) qui ont été observées comme agrégées (van Dijk et al., 2002; Eystathioy et al., 2003; Ingelfinger et al., 2002) dans ce qui est appelé des DCP-bodies ou des GW bodies. Le terme « processing bodies » provient de l'étude de ces granules chez *S. cerevisiae* (Sheth and Parker, 2003), qui a mis en évidence que plusieurs protéines impliquées dans la voie de dégradation des ARNm 5' – 3' y étaient accumulées telles que : Dcp1, Dcp2, Lsm1, Pat1, Dhh1/ (DDX6 chez l'homme) et XRN1. Des protéines liées au métabolisme des ARNs ont ensuite été identifiées comme accumulées dans les p-bodies dans différents organismes (Eulalio et al., 2007a; Parker and Sheth, 2007; Wilczynska et al., 2005), nous retrouvons des facteurs impliqués dans la dégradation 5' – 3' des ARNm (XRN1 et DCP2), des co-facteurs de l'élimination de la coiffe (DCP1, EDC3, EDC4, PAT1B, LSM1-7) (Cougot et al., 2004; Ingelfinger

et al., 2002; Scheller et al., 2007; Tritschler et al., 2007; Yu et al., 2005), des déadénylases (PAN2, PAN3, le complexe CCR4-NOT) (Teixeira and Parker, 2007; Zheng et al., 2008), des répresseurs de la traduction (DDX6, LSM14A, CPEB1, 4E-T) (Andrei et al., 2005; Cougot et al., 2004; Wilczynska et al., 2005; Yang et al., 2006b), des facteurs de la dégradation des ARNm non-sens (UPF1, SMG7, SMG5) (Unterholzner and Izaurralde, 2004) et des acteurs de la voie des ARNs interférents (Ago1-4, GW182) (Liu et al., 2005; Sen and Blau, 2005; Yang et al., 2004). Plus récemment, de nouveaux composants des p-bodies ont été identifiés, comme la protéine HAX-1, ainsi que la micro-protéine Nobody (Non annotated P-body dissociating polypeptide) (**Tabl.1**) (D’Lima et al., 2017; Zayat et al., 2015).

Dans le but de déterminer de façon plus large les protéines localisées dans les p-bodies, deux études protéomiques ont été menées de façon indépendante sur des cellules HEK. La première étude consiste en la purification par tri de particules fluorescentes (FAPS : fluorescence-activated particle sorting) suivie d’une identification par spectrométrie de masse des protéines présentes dans les fractions pré-triées et triées. Elle a été réalisée sur des lysats cytoplasmiques de cellules, exprimant de manière stable la protéine de fusion GFP-LSM14A utilisée comme marqueur des p-bodies. Cette approche a révélé 125 protéines significativement enrichies dans les p-bodies, dont 15 déjà connues. Les protéines identifiées sont, comme attendu, associées au métabolisme des ARNm (répression de la traduction, voie des ARN interférents, dégradation des ARNm) (Hubstenberger et al., 2017). La seconde étude, parue quelques mois plus tard (Youn et al., 2018), a utilisé une approche de BioID (Proximity-Dependent Biotinylation), cette technique repose sur la fusion d’une biotine ligase avec une protéine dite « appât » (ici DCP1a ou PATL1) permettant la biotinylation des polypeptides à moins de 10 nm de celle-ci (Roux et al., 2012) combinée à une purification d’affinité. Après purification d’affinité et spectrométrie de masse, sont retrouvés comme partenaire direct de DCP1a, 54 protéines contre 68 pour PATL1 dont 27 communes. La comparaison de cette étude, au tri des p-bodies révèle peu de protéines communes : AGO1, AGO2, DCP1a, EDC3, EDC4, MARF1 et SMG7. Cependant, la finalité de ces deux études est différente, puisque la bioID permet de mettre en évidence des interactions protéines-protéines faibles et/ou transitoires *in vivo* mais pas forcément spécifiques des p-bodies, tandis que le FAPS consiste en un tri de particules fluorescentes. Il semble donc que l’analyse par FAPS soit plus adéquate pour déterminer la composition des protéines en p-bodies. Bien que les p-bodies se forment en partie via des interactions protéines-protéines, il ne faut pas négliger le fait que la liaison

Gene	Protéines	Référence	Espèces
<i>Ago1</i>	Protein argonaute-1	Sen and Blau, 2005	Mammifères-Humain
<i>Ago2</i>	Protein argonaute-2	Sen and Blau, 2005	Mammifères-Humain
<i>Ago3</i>	Protein argonaute-3	Liu et al., 2005	Mammifères-Humain
<i>Ago4</i>	Protein argonaute-4	Liu et al., 2005	Mammifères-Humain
<i>APOBEC3F</i>	DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3F	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
<i>CAF1</i>	CCR4-NOT transcription complex subunit 7	Zheng et al., 2008	Mammifères-Souris
<i>CCHCR1</i>	Coiled-coil alpha-helical rod protein 1	Ling et al., 2014	Mammifères-Humain
<i>CCR4</i>	CCR4-NOT transcription complex subunit 6	Cougot et al., 2004	Mammifères-Humain
<i>CPEB1</i>	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 1	Wilczynska et al., 2005	Mammifères-Humain
<i>DCP1a</i>	mRNA-decapping enzyme 1A	van Dijk et al., 2002	Mammifères-Humain
<i>DCP1b</i>	mRNA-decapping enzyme 1B	van Dijk et al., 2002	Mammifères-Humain
<i>DCP2</i>	m7GpppN-mRNA hydrolase	van Dijk et al., 2002	Mammifères-Humain
<i>DDX3</i>	ATP-dependent RNA helicase DDX3X	Yasuda-Inoue et al., 2013	Mammifères-Humain
<i>DDX6</i>	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6	Cougot et al., 2004	Mammifères-Humain
<i>DHX9</i>	ATP-dependent RNA helicase A	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
<i>EDC3</i>	Enhancer of mRNA-decapping protein 3	Bloch et al., 2011	Mammifères-Humain
<i>EDC4</i>	Enhancer of mRNA-decapping protein 4	Yu et al., 2005	Mammifères-Humain
<i>EIF4E</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4E	Andrei et al., 2005	Mammifères-Humain
<i>EIF4G</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	Andrei et al., 2005	Mammifères-Humain
<i>EIF4ENIF1</i>	Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter	Andrei et al., 2005	Mammifères-Humain
<i>HAX-1</i>	HCLS1-associated protein X-1	Zayat et al., 2015	Mammifères-Humain
<i>HNRNPU</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
<i>IGF2BP1</i>	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
<i>IGF2BP3</i>	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
<i>ILF3</i>	Interleukin enhancer-binding factor 3	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
<i>LSM1</i>	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM1	Cougot et al., 2004	Mammifères-Humain
<i>LSM14A</i>	Protein LSM14 homolog A	Yang et al., 2006	Mammifères-Humain
<i>LSM2</i>	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM2	Ingelfinger et al., 2002	Mammifères-Humain
<i>LSM3</i>	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM3	Cougot et al., 2004	Mammifères-Humain
<i>LSM4</i>	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM4	Ingelfinger et al., 2002	Mammifères-Humain
<i>LSM5</i>	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM5	Ingelfinger et al., 2002	Mammifères-Humain

Tableau 1 : Composition protéique des p-bodies.

Partie 1.

LSM6	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM6	Ingelfinger et al., 2002	Mammifères-Humain
LSM7	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM7	Ingelfinger et al., 2002	Mammifères-Humain
MEX3A	RNA-binding protein MEX3A	Buchet-poyau et al., 2007	Mammifères-Humain
MEX3B	RNA-binding protein MEX3B	Buchet-poyau et al., 2007	Mammifères-Humain
MEX3C	RNA-binding E3 ubiquitin-protein ligase MEX3C	Buchet-poyau et al., 2007	Mammifères-Humain
Mov10	Helicase MOV-10	Meister et al., 2005	Mammifères-Humain
MYH10	Myosin-10	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
MYO1C	Unconventional myosin-Ic	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
MYO1D	Unconventional myosin-I d	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
MYO6	Unconventional myosin-VI	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
NoBody	Negative regulator of P-body association	D'Lima et al., 2017	Mammifères-Humain
PAN2	PAN2-PAN3 deadenylation complex catalytic subunit PAN2	Zheng et al., 2008	Mammifères-Souris
PAN3	PAN2-PAN3 deadenylation complex subunit PAN3	Zheng et al., 2008	Mammifères-Souris
PatL1	Protein PAT1 homolog 1	Scheller et al., 2007	Mammifères-Humain
PCBP2	Purkinje cell protein 2 homolog	Fujimura et al., 2009	Mammifères-Humain
PNRC2	Proline-rich nuclear receptor coactivator 2	Cho et al., 2009	Mammifères-Humain
PUM1	Pumilio homolog 1	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
PUM2	Pumilio homolog 2	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
SMG5	Protein SMG5	Unterholzner and Izaurralde, 2004	Mammifères-Humain
SMG7	Protein SMG7	Unterholzner and Izaurralde, 2004	Mammifères-Humain
STAU2	Double-stranded RNA-binding protein Staufen homolog 2	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
SYNCRIP	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (HNRNPQ)	Hubstenberger et al., 2017	Mammifères-Humain
TNRC6A	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein / GW182	Eystathiou et al., 2003	Mammifères-Humain
TOB1	Protein Tob1	Shapouri et al., 2016	Mammifères-Souris
TOB2	Protein Tob2	Ezzeddine et al., 2007	Mammifères-Souris
TRAF6	TNF receptor-associated factor 6	Tenekeci et al., 2016	Mammifères-Humain
TUT4	Terminal uridylyltransferase 4	Hubstenberger et al. 2017	Mammifères-Humain
UPF1	Regulator of nonsense transcripts 1	Unterholzner and Izaurralde, 2004	Mammifères-Humain
UPF2	Regulator of nonsense transcripts 2	Stalder and Mühlemann, 2009	Mammifères-Humain
UPF3	Regulator of nonsense transcripts 3A	Stalder and Mühlemann, 2009	Mammifères-Humain
XRN1	5'-3' exoribonuclease 1	Cougot et al., 2004	Mammifères-Humain
YTHDF2	YTH domain-containing family protein 2	Wang et al., 2014	Mammifères-Humain

Tableau 1 : Composition protéique des p-bodies.

Partie 2.

des partenaires directs de DCP1a et PATL1 obtenue par l'approche bioID puisse avoir lieu hors des p-bodies.

II.1.2-Composition en ARNs :

Les p-bodies étant en grande partie composés de protéines liant les ARNs et impliqués dans leur « turnover », il n'est pas surprenant d'y retrouver des ARNs. Il a d'abord été mis en évidence la présence d'ARN via l'utilisation de rapporteurs à l'aide du système MS2 (un système d'étiquetage des ARNs) (Liu et al., 2005; Pillai et al., 2005; Sheth and Parker, 2003). L'importance des ARNs pour la formation des p-bodies a ensuite été suggérée chez la levure, via la perte de formation d'agrégats *in vitro* après traitement à la RNase (Teixeira et al., 2005). Ensuite, des approches d'hybridation fluorescente *in situ* sur molécule unique (smFISH : single molecule Fluorescent *In Situ* Hybridization) ont permis de détecter la présence d'ARNm et de miARNs endogènes dans les p-bodies (Bhattacharyya et al., 2006). A la suite de la purification des p-bodies par FAPS présentée précédemment (*Composition protéines*), les ARNs totaux contenus dans les fractions pré-triées et triées ont été extraits et séquencés. Les résultats de séquençage révèlent la présence de milliers d'ARNs significativement enrichis dans les p-bodies, avec une proportion d'ARN codant plus élevée dans les p-bodies par rapport au cytoplasme (89% dans les p-bodies contre 67% dans le cytoplasme). Des hybridations *in situ* fluorescentes sur molécule unique (smiFISH : single molecule inexpensive Fluorescent *In Situ* Hybridization) ont permis de valider 5 sur 6 des ARNm retrouvés enrichis dans les p-bodies (*RAD21, STAG2, SMC3, PDS5B, RNASHE2C*) (Hubstenberger et al., 2017). Enfin, il avait déjà été mis en évidence le rôle de motif ARE pour la localisation des ARNs dans les p-bodies (Franks and Lykke-Andersen, 2007; Halstead et al., 2015). Une analyse de la composition des ARNm enrichis versus exclus des p-bodies confirme l'importance du pourcentage en guanine et en cytosine (GC) et de la taille, puisque les ARNm retrouvés enrichis dans les p-bodies sont plus riches en adénine et en uracile et sont plus longs (supérieur à 5kb) (Courel et al., 2019). Une étude similaire a été réalisée chez la levure, les ARNm associés à deux protéines constitutives des p-bodies : Dcp2 et Scd6 (orthologue de LSM14A) ont été purifiées par la méthode de cCLAP (chemical Cross-Linking coupled to Affinity Purification) puis séquencés après différentes conditions de stress afin d'induire la formation de p-bodies : absence de glucose, ajout d'ions sodium ou calcium... Tout comme la méthode de purification des p-bodies par bioID, la technique utilisée pour purifier les ARNs des p-bodies, ne permet pas d'affirmer que

les ARNs associés aux protéines Dcp2 et Scd6 proviennent uniquement d'interactions réalisées dans les p-bodies (Wang et al., 2018).

II.2-Formation des p-bodies :

Dans les cellules eucaryotes, les p-bodies sont présents de façon constitutionnelle et ne nécessitent pas la présence d'un stress pour induire leur formation contrairement à d'autres granules à ARN comme les Granules de Stress (SG). Cependant, certains stress peuvent moduler leurs nombres ou leurs tailles comme l'arsenite de sodium (augmente le nombre de p-bodies) ou le cycloheximide (diminue le nombre de p-bodies). Dans ce contexte, il est important de comprendre comment se forme les p-bodies *de novo*, mais aussi comment ils sont maintenus dans les cellules.

II.2.1-Séparation de phase liquide-liquide (LLPS) :

Les p-bodies résultent de la formation d'agrégats de protéines et d'acides nucléiques par un processus appelé séparation de phase liquide-liquide (LLPS : Liquide-Liquide Phase Separation). La séparation des phases dans un mélange est appelée la démixtion. La démixtion est un phénomène se produisant lorsque plusieurs liquides constituant un mélange atteignent leur limite de solubilité formant ainsi plusieurs phases non miscibles. En biologie, la séparation de phase est un phénomène dans lequel les substances macromoléculaires telles que des protéines ou des acides nucléiques se condensent pour former deux phases : une phase dense en macromolécules qui ressemble à des gouttelettes liquides et une autre phase diluée (Banani et al., 2017). Ce processus permet la séparation et la compartimentation des biomolécules en organites en absence de membrane (Banani et al., 2017). La première LLPS a été mis en évidence en 1830, elle a été observée dans le noyau des cellules neuronales, avant d'être plus tardivement appelée « nucleolus » (Pederson, 2011). La formation de ces condensats ne requiert pas d'ATP, puisqu'ils sont issus de processus ayant des conditions thermodynamiques favorables (Flock et al., 2014). En effet, cette séparation biologique est entraînée par de faibles interactions entre des substrats multivalents et des protéines possédant des régions intrinsèquement désordonnées (Intrinsically Disordered Regions : IDR) (Softys et al., 2021). Les IDR sont des séquences de protéines ou d'acides aminés qui ne parviennent pas à former des structures définies et qui peuvent donc prendre de multiples conformations (Banani et al., 2017; Protter et al., 2018; Ruff et al., 2018). Beaucoup de ces

protéines possèdent des domaines de faible complexité où un petit nombre de résidus d'acides aminés sont surreprésentés, en particulier les acides aminés polaires et chargés. Il semblerait que de nombreuses interactions faibles aident à surmonter les contraintes énergétiques entropiques du mélange qui incluent les interactions électrostatiques cation- π et π - π (cation- π : interactions non covalentes entre un cycle aromatique (π) et un cation adjacent - π - π : interactions non covalentes entre les cycles aromatiques) (Brangwynne et al., 2015). Bien que les protéines avec des domaines désordonnés soient importantes pour la séparation des phases, les acides nucléiques, en particulier les molécules d'ARNs peuvent également servir de substrats multivalents et conduire à la démixtion (Guo et al., 2021; Van Treeck and Parker, 2018).

La formation de ces gouttelettes liquides dépend de nombreux facteurs tels que la concentration, l'identité des macromolécules, et les conditions environnementales, comme par exemple, la température, la concentration ionique, et le pH (Nott et al., 2015; Ruff et al., 2018; Sołtys et al., 2021). Un paramètre crucial permettant de déterminer si une protéine sera impliquée ou non dans une séparation de phase est sa multivalence. La multivalence d'une molécule dépend du nombre de sites de liaisons qu'elle possède. Plus le nombre de sites est élevé, plus la formation de gros complexes sera favorisée. Ainsi, bien que la composition des LLPS soit complexe, leur formation peut-être régie par des règles simples, comme la valence des protéines et la disponibilité de leurs ligands (Banani et al., 2016; Peran and Mittag, 2020). Il faut savoir, que les protéines multivalentes, ont un seuil critique (une concentration) pour la formation de LLPS qui dépend du nombre de domaines d'interactions (**Fig. 11**) (Banani et al., 2016; Li et al., 2012; Schütz et al., 2017; Xing et al., 2020). Lors de la formation de granules, les protéines possédant le seuil de concentration le plus faible (donc une valence élevée), « les scaffolds » se condensent pour former le noyau lors de l'étape de nucléation permettant par la suite le recrutement d'autres composants, dont le seuil de concentration est plus élevé (valence faible) (Alberti, 2017; Banani et al., 2016). Les mécanismes du processus de nucléation *in vivo* ne sont pas encore tout à fait établis. Cependant, un mécanisme d'assemblage courant reposerait sur des protéines granulaires possédant des domaines d'auto-assemblages qui pourraient servir de noyau de nucléation. Des exemples de suppression de domaine permettant la formation de polymères de EDC3 ou de G3BP conduisent à une altération de l'assemblage des granules (Ling et al., 2008; Sanders et al., 2020; Tourrière et al., 2003).

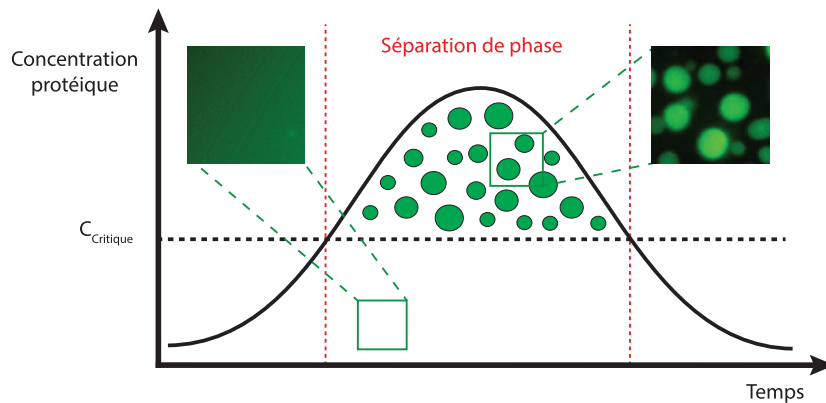


Figure 11 : Séparation de phase.

Les encarts ci-dessus représentent les données originales d'une expérience de séparation de phase avec la protéine FUS purifiée marquée par la GFP (une protéine de liaison à l'ARN de type prion).

Haut : Une protéine forme des gouttelettes liquides denses au-dessus de la concentration critique (C_{critique}) pour la séparation des phases. Les gouttelettes liquides sont stables tant que la concentration totale est supérieure au seuil critique. Les gouttelettes forment un compartiment qui permet la diffusion de molécules à l'intérieur du compartiment et favorise l'échange dynamique des molécules avec la phase environnante diluée. Une fois que la protéine totale retombe en dessous de la C_{critique} , les compartiments se dissolvent et le système retombe dans un état monophasique où les molécules sont uniformément réparties.

Bas : les modifications post-traductionnelles (PTM) ou les changements de température ou de force ionique peuvent augmenter l'affinité ou des interactions protéines-protéines, abaissant ainsi le seuil critique de séparation de phases et permettant la formation de compartiments à une concentration en protéines beaucoup plus faible. (Tiré de (Alberti 2017)).

II.2.2-Domains et régions importants pour la séparation de phase :

La formation des p-bodies serait favorisée à la fois par l'auto-association de protéines entre elles et avec d'autres polypeptides possédant des domaines similaires (Dignon et al., 2020; Protter et al., 2018), par la présence d'interactions ARNs-protéines (Buchan, 2014) et ARN-ARN (Van Treeck and Parker, 2018).

Comme souligné précédemment, plusieurs types d'interactions entre ARNs et protéines interviennent dans la formation des MLO. Les protéines impliquées dans ce type d'interactions sont des protéines liant les ARNs possédant des régions intrinsèques désordonnées et/ou des domaines globulaires. La contribution des IDR des protéines de liaison à l'ARN a largement été démontrée dans la formation de LLPS. Premièrement, des études génétiques ont montré qu'elles étaient importantes pour l'assemblage des granules mais aussi pour le recrutement de leurs composants (Decker et al., 2007; Gilks et al., 2004; Hennig et al., 2015b; Sanders et al., 2020). Deuxièmement, les granules ribonucléoprotéique (RNP) sont enrichis en protéines contenant des IDR (Decker et al., 2007; Jain et al., 2016; Mittag and Parker, 2018; Yu et al., 2021), enfin les IDR sont souvent nécessaires et/ou suffisants pour la formation d'agrégats *in vitro* (Lin et al., 2015; Nott et al., 2015; Patel et al., 2015). Contrairement aux domaines globulaires, les IDR n'adoptent pas de conformation tridimensionnelle fixe, ceci est dû à leur composition et à leur faible diversité en acides aminés, les empêchant de se replier en domaines structurés, contribuant notamment au maintien des bio-condensats sous forme liquide (Darling et al., 2018). Ces domaines de faible complexité sont souvent enrichis en acides aminés polaires et/ou chargés (A : Ala, R : Arg, G : Gly, Q : Gln, S : Ser, P : Pro, E : Glu et K : Lys) (Uversky et al., 2015) répétés en petits motifs FG, RG, GY, KSPEA, SY (Y : Tyr) ou formant des régions riches en Q/N (N : Asn) (Reijns et al., 2008), les rendant aptes à former des séparations de phase liquide-liquide (Brangwynne et al., 2015; Nott et al., 2015).

Parallèlement aux protéines, les ARNs jouent aussi un rôle dans la formation de granules. *In vitro* dans des conditions mimant les conditions de stress intracellulaires, des ARNs peuvent s'auto-assembler pour former des gouttelettes (Treeck et al., 2018). Ils peuvent notamment agir comme « plateforme » de recrutement de protéines liant les ARNs. En effet, un traitement à la puromycine (entraînant la libération des ARNm des ribosomes), favorise la formation d'agrégats d'ARN avec des protéines de liaison à l'ARN et des protéines contenant des IDR (Boundedjah et al., 2014). De plus, les ARNs peuvent être recrutés *in vitro* dans des

granules déjà pré-nucléés, notamment via des interactions ARN-ARN se produisant à la surface de condensats ARNs ou RNP (Tauber et al., 2020). Enfin, un système de reconstitution de granules mRNP artificiel (ArtiG) dans des cellules humaines met en évidence que la taille des granules est directement influencée par la densité des domaines intrinsèques d'interactions (Garcia-Jove Navarro et al., 2019).

II.2.3-Régulation de la formation des p-bodies :

Au sein des p-bodies, certaines protéines sont indispensables à la formation des condensats tandis que d'autres sont recrutées mais ne sont pas nécessaires à l'assemblage (modèle « Scaffold vs Client »). Il est considéré qu'une protéine est indispensable à la formation des p-bodies, quand son absence entraîne leur dissolution, comme notamment, les protéines DDX6, 4E-T, LSM1, CCR4 (Andrei et al., 2005), LSM14A (Yang et al., 2006b) , GW182 (Yang et al., 2004) et CPEB1 (Serman et al., 2007). Cependant, lorsque les cellules sont soumises à un stress permettant l'induction des p-bodies (Arsenite de Sodium), elles seront capables dans la plupart des cas de reformer des p-bodies *de novo*, indiquant que ces protéines sont nécessaires au maintien des p-bodies, mais pas à leur formation. A ce jour, seulement 3 protéines ont été mise en évidence comme réel acteur de la formation des p-bodies : DDX6, LSM14A et 4E-T, puisqu'en l'absence d'une de ces trois protéines, même soumises à un stress, les cellules ne sont pas capables de reformer des p-bodies (Ayache et al., 2015).

L'analyse des effets de la déplétion de 1354 gènes humains par ARN interférent sur la quantité et la morphologie de six MLO dont les p-bodies, a permis d'établir un réseau de gènes régulateurs des p-bodies (**Fig. 12**). Tout d'abord, cette étude confirme que les protéines LSM14A, EDC4, et PATL1 jouent un rôle dans la formation des p-bodies. De plus, ce crible a permis d'identifier 4 gènes codant pour des sous-unités du protéasome (*PSMA2*, *PSMA4*, *PSMA6*, et *PSMC2*), comme régulateurs positifs des p-bodies, en accord avec des résultats précédents, démontrant qu'une inhibition du protéasome via le MG132, conduit à la dissolution des p-bodies (Mazroui et al., 2007). Enfin, cette étude révèle que la diminution d'expression des phosphodiesterases à AMPc, *PDE4C* et *PDE3B*, entraînent une augmentation du nombre des p-bodies, tandis que d'autres gènes codants pour d'autres phosphodiesterases (*PDE2A*, *PDE3A*, *PDE6A* et *PDE6D*) ainsi que le gène *PRKAA1*, semblent nécessaires pour le maintien ou pour la formation des p-bodies (Berchtold et al., 2018).

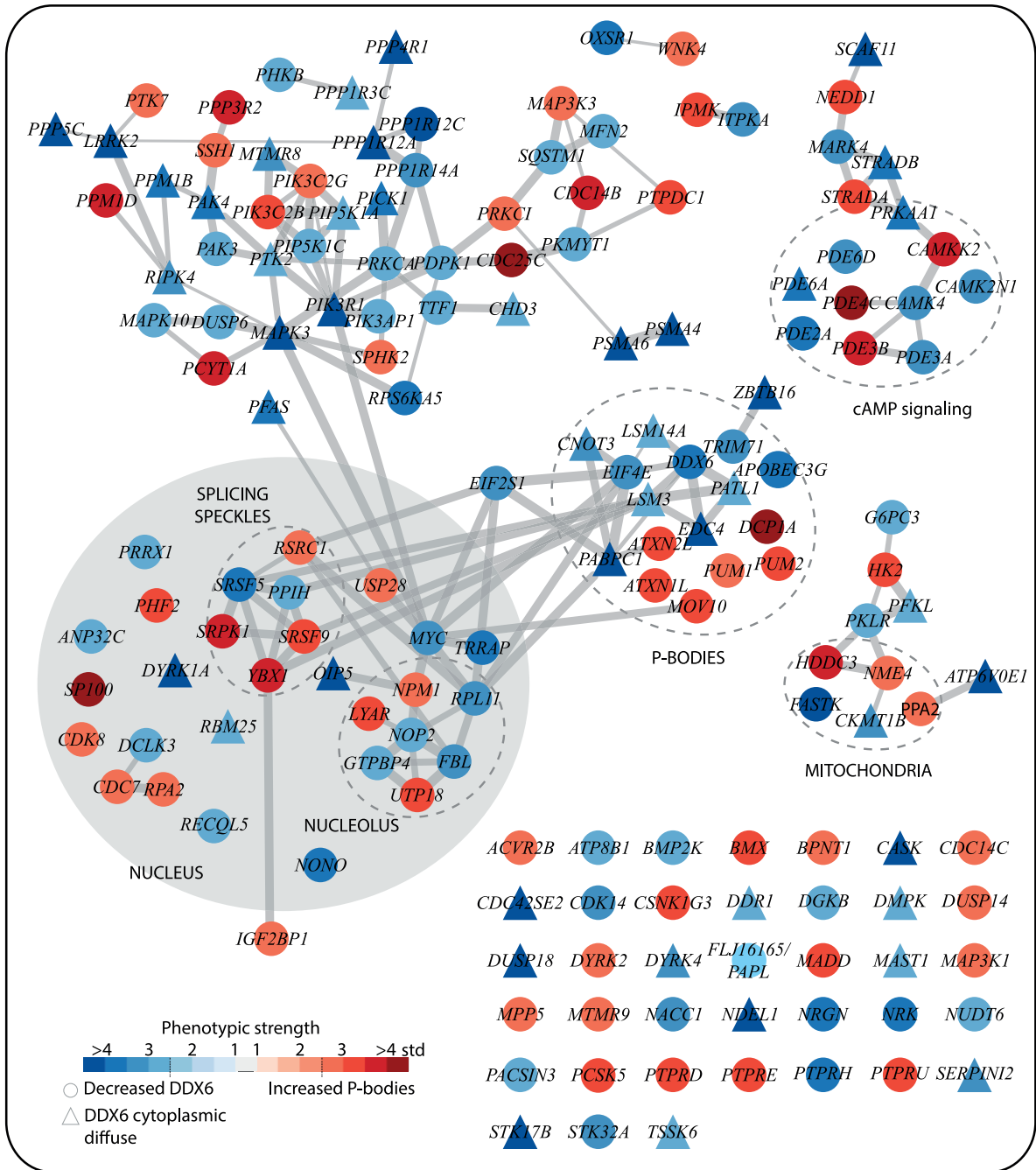


Figure 12 : Régulateurs des p-bodies.

Réseaux de gènes des régulateurs des p-bodies. (Tiré de (Berchtold et al., 2018)).

II.3-Rôles des processing bodies :

Le rôle des p-bodies dans le métabolisme de l'ARNm a longtemps été controversé entre deux fonctions : la dégradation des ARNm et le stockage des transcrits non traduits.

Les p-bodies, des usines de dégradation des ARNm ?

À la suite de leur découverte, les p-bodies ont d'abord été proposés, en raison de leur composition, comme site de dégradation des ARNm, puisque de nombreux facteurs de la voie de dégradation 5' – 3' ainsi que des acteurs de la voie NMD y sont retrouvés (**Tabl.1**). De plus, une déplétion de la protéine XRN1, entraîne une accumulation des ARNs polyadénylés dans les p-bodies (Cougot et al., 2004), il a aussi été observé que des souches de levure *xrn1Δ* et *dcp1Δ*, possédaient des p-bodies plus grands et plus nombreux (Sheth and Parker, 2003). Enfin, une accumulation d'ARNm contenant un codon de terminaison prématuré, donc cible du NMD, a été observée à la périphérie des p-bodies (Durand et al., 2007). D'après ces résultats, il avait été conclu que les p-bodies seraient des « usines » permettant la dégradation de l'ARNm et/ou des sites d'accumulation de transcrits en attente de dégradation (Decker and Parker, 2012).

Les p-bodies, un centre de stockage des ARNs ?

Cependant, des études ont présenté des preuves contradictoires sur le rôle des p-bodies en tant que plateforme de dégradation, suggérant, qu'ils seraient plutôt un endroit de stockage des ARNm. Il a été mis en évidence que la formation de p-bodies n'était pas directement liée à la dégradation des ARNs, puisque leurs perturbations n'inhibent pas les voies de dégradation de l'ARN global (Ayache et al., 2015; Eulalio et al., 2007b). Dans ce sens, l'analyse des ARNs enrichis dans les p-bodies ne révèle pas la présence d'ARNm qui serait des intermédiaires de dégradation. De plus, l'analyse des « reads » de séquençage des ARNs enrichis et déplétés dans les p-bodies montre une distribution différente. Pour les ARNm déplétés des p-bodies (principalement cytoplasmiques) la densité de reads est beaucoup plus faible du côté 5' que 3' suggérant la dégradation active de ces ARNm via leur extrémité 5'. Concernant les ARNm enrichis dans les p-bodies, nous observons une très légère diminution de la densité de reads du côté 3', suggérant que ces transcrits sont protégés de la voie de dégradation 5' – 3' (Hubstenberger et al., 2017). Une autre étude confirme ces résultats, la visualisation d'ARNm marqués à l'extrémités 5' et 3' dans le but de visualiser des intermédiaires de dégradation, montre une absence de leur dégradation au sein des p-bodies (Horvathova et al., 2017). Des

expériences similaires chez la levure *S. cerevisiae* à l'aide du système rapporteur MS2-MCP, aboutissent au même résultat (Tutucci et al., 2018). De plus, une déplétion de la protéine XRN1 conduit à une augmentation du nombre d'ARNm riches en GC exclus des p-bodies indiquant que XRN1 n'est pas responsable de la dégradation des ARNm riches en AU, localisés dans les p-bodies. (Courel et al., 2019; Pashler et al., 2021). Cette absence de dégradation des ARNm dans les p-bodies, malgré la présence d'enzymes de dégradation pourrait s'expliquer soit par l'accumulation de ces enzymes sous forme inactive (Schütz et al., 2017), soit par leurs protections grâce à leur association au complexe 4E-T/eIF4E empêchant le recrutement des enzymes de decapping. (Räsch et al., 2020). Tous ces résultats combinés semblent indiquer un rôle de stockage pour les p-bodies abritant un sous-ensemble d'ARNm traditionnellement réprimés.

Les p-bodies, répresseur de la traduction des ARNm :

A ce jour, l'hypothèse du rôle des p-bodies s'oriente vers un stockage des ARNm réprimés, puisque tous les facteurs d'initiation de la traduction sont absents des p-bodies (à l'exception d'eIF4E sans doute en raison de son association avec son répresseur 4E-T) (Andrei et al., 2005; Ferraiuolo et al., 2005) tandis que plusieurs répresseurs y sont accumulés (**Tabl.1**), dont les trois protéines indispensables à leur formation DDX6, LSM14A et 4E-T (Ayache et al., 2015). En effet, une grande partie des protéines ribosomales, ainsi que les ARNr associés, ne sont pas retrouvés localisés dans les p-bodies (Hubstenberger et al., 2017; Kedersha et al., 2005). De plus, la fixation des polysomes sur l'ARNm via l'utilisation de cycloheximide, entraîne une décroissance du nombre de p-bodies (Andrei et al., 2005; Wilczynska et al., 2005), à l'inverse, leur dissociation à l'aide de puromycine, augmente le nombre de p-bodies (Wilczynska et al., 2005). Des données de ribosomes profiling montrent que les ARNm enrichis dans les p-bodies sont plus traduits en absence de DDX6 (en absence de p-bodies) et suggèrent que ce sont des transcrits préférentiellement régulés avant la traduction qui s'accumulent dans les p-bodies (Hubstenberger et al., 2017). Ainsi, cela suggère que les ARNm stockés dans les p-bodies sont exclus du dispositif de traduction, et que le fait de ne pas être associés à la machinerie de traduction, s'avère nécessaire au recrutement des ARNm dans les p-bodies.

L'étude du comportement des miARNs et de leurs ARNm cibles, localisés dans les p-bodies, nous indique que lorsque qu'un miARN est actif la traduction de ses cibles est réprimée, mais dès lors que le miARN est inactif, l'ARNm est relocalisé des p-bodies vers le cytosol, entraînant une reprise de sa traduction (Bhattacharyya et al., 2006). Cependant, il semble que le système

de répression des ARNm par les miARNs ne soit pas si simple dans les p-bodies, puisque des études plus récentes proposent deux types de comportement pour les ARNm et les miARNs dans les p-bodies. Une partie des ARNm s'associerait de façon transitoire aux p-bodies (quelques secondes), tandis que d'autres seraient maintenus à l'intérieur des p-bodies pour des durées plus longues (entre 1min30s et 45min) et seraient réprimés (Moon et al., 2019; Pitchiaya et al., 2019).

Les p-bodies, un mécanisme d'adaptation rapide au stress :

La capacité de stockage dans les p-bodies des ARNm réprimés pour la traduction, ainsi que leur dynamique de formation/dissolution semblent constituer un mécanisme de régulations post-transcriptionnelles permettant une adaptation rapide des cellules aux changements environnementaux. La formation de p-bodies chez les levures est induite lors d'un stress, contrairement aux cellules humaines où ils sont constitutivement présents, faisant de la levure un modèle d'étude intéressant pour déterminer l'importance des p-bodies dans la survie cellulaire lors d'un stress (Teixeira et al., 2005). La surexpression des ARNm *UFO1* et *MFA2* accumulés et réprimés dans les p-bodies lors d'un stress, dans des souches le levures doublement mutées *edc3Δ*, *pat1Δ* (associées à un défaut de formation des p-bodies) entraîne une létalité accrue (Lavut and Raveh, 2012) suggérant l'importance du stockage des ARNm pour l'adaptabilité des cellules aux stress environnementaux.

Dans les cellules épithéliales humaines, la purification des p-bodies soulève l'idée qu'ils sont impliqués dans la coordination de l'expression d'ARNm codant des protéines régulatrices étant elles-mêmes associées aux p-bodies (Standart and Weil, 2018). Supportant cela, une analyse Gene Ontology a révélé une subdivision étonnante entre les ARNm enrichis en p-bodies et ceux qui en sont exclus (Hubstenberger et al., 2017). Les ARNm enrichis dans les p-bodies codent pour des protéines régulatrices comme ceux de la traduction (y compris les protéines des p-bodies elles-mêmes), tandis que les ARNm codant pour des protéines d'entretiens comme les ARNm des protéines ribosomales sont exclus des p-bodies. Ils semblent que les p-bodies ne soit pas seulement un lieu de stockage d'ARNm codant pour des régulateurs impliqués dans le contrôle d'un processus cellulaire commun, mais qu'ils stockent également les ARNm codants pour des protéines dans les mêmes complexes protéiques. En effet, les ARNm codants pour les sous-unités du centrosome et des complexes condensine/cohésine impliqués dans le cycle cellulaire sont stockés dans les p-bodies tandis

qu'en sont exclus les ARNm codants pour les sous-unités du protéasome et des nucléosomes (Hubstenberger et al., 2017).

Etant donné le modèle de formation des p-bodies par séparation de phase, il est probable que leur rôle dans l'adaptation des cellules aux stress soit basé sur leur capacité à établir un équilibre dynamique avec le cytoplasme. Les p-bodies agiraient alors comme tampon, permettant le contrôle des variations de concentration cytoplasmique en ARNm et en protéines. La reconstitution de granules artificiels dans des cellules humaines, coïncide avec cette hypothèse, puisque la concentration cytosolique d'une protéine de nucléation (ici la protéine FFm) reste stable tandis que sa concentration dans le granule continue de croître (Garcia-Jove Navarro et al., 2019). Ceci est en adéquation avec l'hypothèse qu'*in vivo*, les condensats puissent aider au maintien d'une concentration de protéines cytoplasmiques constante.

II.4-Interconnexions entre les p-bodies et les granules de stress :

Les granules de stress (SG) sont un type de MLO hautement conservé. Tout comme les p-bodies, les SG sont des LLPS, cependant, ils ne sont détectables que dans des conditions de stress (infections virales, choc de température, déprivation en glucose...) (Panas et al., 2016; Sun et al., 2021). Bien que les SG et les p-bodies soient considérés comme des MLO distincts, une partie des SG et des p-bodies se retrouve arrimée l'une à l'autre lors de l'induction de SG, ce qui pourrait être due aux ribonucléoprotéines et ARNm partagés par les deux structures (Kedersha et al., 2005).

Composition :

L'analyse de leur composition révèle qu'ils sont principalement composés d'ARNm non traduits, de sous-unités de ribosome (40S) (Anderson and Kedersha, 2009) et de protéines de liaison à l'ARN (TIA1, G3BP1) (Kedersha et al., 2016; Tourrière et al., 2003) ainsi que de divers facteurs d'initiation de la traduction (complexe de pré-initiation 48S) (Kedersha et al., 1999). De plus, les SG sont aussi composés d'un grand nombre d'ARNm non traduits (Martin and Ephrussi, 2009), et leur formation est impossible lorsque les ARNm sont piégés dans les polysomes (Damgaard and Lykke-Andersen, 2011) indiquant que les ARNm liés aux polysomes ne peuvent-être recrutés dans les SG. Il a été observé que des protéines liées aux SG et des

ARNm spécifiques (ex : l'ARNm TOP) participent à l'initiation de la traduction, révélant que les SG sont une collection de complexes mRNP arrêtés en traduction (Damgaard and Lykke-Andersen, 2011). Enfin, la composition des SG peut varier selon le type cellulaire, le stress et les pathologies, par exemple, chez *S. cerevisiae*, le facteur eIF3 est présent dans les SG induits par un choc thermique mais est absent dans les SG induits lors d'une déplétion en glucose (Groušl et al., 2009; Hoyle et al., 2007).

Rôles :

Plusieurs évidences, suggèrent que les SG permettent d'améliorer la survie des cellules lors d'un stress défavorable induit par arrêt de transport intracellulaire, de la traduction, et par les voies pro-apoptotiques (Catara et al., 2017; Grimaldi et al., 2019; Kedersha et al., 2013).

Tout d'abord, la formation de SG augmente la concentration locale de protéines et d'ARN, perturbant l'état d'équilibre des interactions moléculaires, renforçant leur agrégation et protégeant la survie cellulaire. Par exemple, lors d'une infection virale, les SG s'agrègent et activent des protéines antivirales apparentées comme notamment le gène inductible par l'acide rétinoïque I (rig-1), la PRK, l'oligoadénylate synthase (OAS) et la ribonucléase L (RNase L), afin d'améliorer la réponse immunitaire (Onomoto et al., 2012). De plus, les SG jouent un rôle protecteur dans la réponse aux stress par le biais d'effets anti-inflammatoires et antioxydants (Takahashi et al., 2013). Ensuite, les SG sont aussi impliqués dans la réponse apoptotique, puisque la formation de SG altérés est souvent accompagnée d'une viabilité cellulaire réduite lors de l'induction de stress (Eisinger-Mathason et al., 2008; Metzen et al., 2003).

Les granules de stress séquestrent des composants intracellulaires ce qui permet de bloquer leurs interactions dans le cytoplasme. D'ailleurs les SG sont impliqués dans la régulation des voies de signalisation cellulaire en isolant des protéines telles que mTOR, RACK1 ou le récepteur TRAF2 (tumour necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 2) (Takahara and Maeda, 2012; Thedieck et al., 2013). De plus, une augmentation de température entraîne une inhibition des protéines p38 et JNK (c-jun kinase N-terminal) (Tsai and Wei, 2010). Les SG inhibent l'apoptose en recrutant la protéine régulatrice mTOR bloquant l'hyperactivation de la voie de signalisation du complexe mTOR1 (mTORC1) (Takahara and Maeda, 2012; Wippich et al., 2013). En conséquence, les SG peuvent séparer les protéines liées à la physiologie et au métabolisme des ARNm, provoquant une inhibition temporaire de la traduction.

Comparaison et interconnexion entre les p-bodies et les SG :

Malgré des différences importantes, les p-bodies et les SG partagent tout de même des caractéristiques communes : ce sont des granules d'ARNs non membranaires séquestrant dynamiquement des ARNm traductionnellement inactifs. Un lien physique entre les p-bodies et les SG est connu depuis longtemps, puisque les p-bodies se trouvent « amarrés » au SG (Kedersha et al., 2005; Sanders et al., 2020). De plus, les p-bodies et les SG partagent un certain nombre de protéines. Parmi les protéines communes, nous retrouvons celles qui favorisent la fusion ou l'attachement des p-bodies au SG, telles que TTP et BRF1 (facteur de réponse au butyrate-1 aussi connu sous le nom de ZFP36L1), ainsi que eIF4E (Ivanov et al., 2019). La comparaison des protéomes des SG et des p-bodies a montré que 101 protéines étaient partagées entre les deux structures, ce qui représenterait 52% et 12% des p-bodies et des SG respectivement (Hubstenberger et al., 2017; Jain et al., 2016; Markmiller et al., 2018; Youn et al., 2018). Bien que les SG et les p-bodies co-existent dans le cytoplasme lors d'un stress, une redistribution des composants protéiques spécifiques en fonction du stress a lieu entre les deux LLPS. Par exemple, un choc thermique induit la relocalisation des protéines EIF4E, XRN1, TTP, APOBEC3G, MOV10, AGO2 et YBX1 des p-bodies vers les SG (Gallois-Montbrun et al., 2007; Kedersha et al., 2005). Un stress induit à l'arsenite entraîne la relocalisation du facteur d'exportation nucléaire d'ARN NXF7 des p-bodies vers les SG (Katahira et al., 2008). L'analyse comparative du transcriptome des p-bodies versus celui des SG en condition de stress révèle, comme attendu, que les ARNs stockés dans les p-bodies sont riches en AU, à l'inverse, il semble que les ARNs enrichis dans les SG sont plutôt riches en GC (Matheny et al., 2019). Ainsi, le pourcentage en GC pourrait jouer un rôle dans la spécification des transcrits qui se répartissent préférentiellement dans les p-bodies par rapport au SG lors d'un stress.

II.5-Processing bodies et pathologies :

Aucune étude n'a à ce jour permis de lier directement les p-bodies à une pathologie, mais certaines des protéines qui les composent sont impliquées dans des maladies neurodégénératives comme, par exemple l'épilepsie, l'autisme, des déficiences intellectuelles (DI), ou encore une ataxie spinocérébelleuse (Schieweck et al., 2021). De plus, des infections virales ou des traitements anticancéreux provoquent des modifications dans leur nombre ou dans leur composition.

Rôle des protéines des p-bodies dans les maladies neurodégénératives :

La formation de LLPS anormales est un facteur important dans les maladies neurodégénératives (Mackenzie et al., 2017; Mann et al., 2019). Les RBP sont des facteurs essentiels de la régulation post-transcriptionnelle des gènes, en particulier le transport axonal des ARNm, et sont impliqués dans de multiples aspects du développement neuronal, et de la cognition (ensemble des processus mentaux se rapportant à la connaissance : mémoire, langage, apprentissage...). De ce fait, il n'est pas étonnant de les retrouver dérégulés dans des maladies neurodégénératives.

En effet, il a été montré que des défauts dans les protéines Stau2, Pum1, Pum2 et CPEB1 sont liés à des maladies neurologiques ou neurodégénératives. Par exemple, chez *D. melanogaster*, la mutation de *staufen* (*Stau*) entraîne des défauts de mémoire (Dubnau et al., 2003). Ensuite, la perte d'expression de *Pum1* chez la souris cause un dysfonctionnement moteur progressif ainsi qu'une neurodégénérescence avec des déficiences motrices (Gennarino et al., 2015). De plus, des souris *KO* pour la protéine Pum2 sont prédisposées à la survenue de crises d'épilepsie spontanées (Follwaczny et al., 2017), et l'expression de Pum2 est significativement réduite chez des patients et des rats atteints d'épilepsie (Wu et al., 2015). Cependant, dans aucune de ces études relatant l'importance de ces protéines dans des maladies neurodégénératives, il n'a été question de l'impact de ces mutations/pertes d'expression sur les p-bodies.

Cependant, l'étude de mutations ponctuelles dans la protéine DDX6, révèle l'effet de cette mutation sur les p-bodies et son lien avec des (DI) (Ayache et al., 2015; Balak et al., 2019). En effet, une étude sur des patients atteints de défiance intellectuelle a permis d'identifier cinq nouveaux variants rares faux-sens dans la protéine DDX6. Ces patients présentent un retard développemental, et des caractéristiques dysmorphiques similaires comme un télécanthus (écartement excessif entre les angles internes des yeux), un épicanthus (repli de la peau allant de la paupière supérieure au bord du nez, yeux bridés), les sourcils arqués et les oreilles basses (Balak et al., 2019). Les variants faux-sens découverts dans cette étude, se situent dans le domaine C-terminal de RecA-2, plus particulièrement au sein des motifs QxxR et V importants pour la liaison à l'ARN, et l'activité hélicase de la protéine. Quatre des cinq variants entraînent un défaut dans la formation des p-bodies. En complément, il a été montré dans une autre étude, le même type de mutations non-sens dans une autre hélicase à ARN DDX3X (Snijders Blok et al., 2015), engendrant elles aussi des défiances intellectuelles. Cependant il

n'est pas encore connu, si c'est l'incapacité à former des p-bodies et/ou la perte d'activité de l'hélicase qui sont responsables de cette pathologie.

Recrutement des p-bodies, pour la réplication virale :

Tout d'abord, des infections par des virus à ARN comme le virus de l'hépatite C (HCV), le virus du Nil occidental, le virus de la dengue ou encore les Alphavirus, entraîne une diminution du nombre de p-bodies (Biegel and Payer, 2016; Chahar et al., 2013; Emara and Brinton, 2007; Liu et al., 2019; Pérez-Vilaró et al., 2015). Cette diminution est due à une relocalisation d'un certain nombre de protéines des p-bodies comme Mov10, DDX6, Ago1, PATL1, DDX3, GW182, Lsm1 et XRN1 vers des centres de réplifications viraux (Ariumi et al., 2011; Berezhna et al., 2011; Chahar et al., 2013; Liu et al., 2020; Payer et al., 2013; Pérez-Vilaró et al., 2015). De plus, le recrutement de certaines de ces protéines semble jouer un rôle essentiel dans la réplication virale, puisqu'une perte de leur expression entraîne une diminution des protéines virales NS5A et Core (Dong et al., 2015; Payer et al., 2013). Cependant, il semble que la dissolution des p-bodies suite à l'infection ne soit qu'une conséquence du recrutement de ces composants à un site annexe (centre de réplication), puisqu'une absence de formation des p-bodies n'affecte pas le taux de réplication virale (Pérez-Vilaró et al., 2012).

Les p-bodies dans le cancer :

Plusieurs études ont souligné l'implication des Stress Granules dans la réponse à diverses molécules anticancéreuses (Anderson et al., 2015; Kaehler et al., 2014). Concernant les p-bodies, le 5-Fluorouracil, qui est une molécule anticancéreuse s'incorporant dans l'ARN utilisée dans le traitement de différents cancers (colorectal, estomac, œsophage, ovaire ...), induit une augmentation du nombre de p-bodies dans les cellules (Kaehler et al., 2014). Mais, cette observation corrélative, ne permet pas de savoir, s'il y a un réel rôle des p-bodies dans les cancers.

Différentes études ont montré que les p-bodies jouent un rôle lors de l'hypoxie (disponibilité en oxygène réduite : caractéristique majeure du microenvironnement tumorale), mais les réponses varient en fonction du modèle étudié. En effet, dans des cellules du cancer du côlon, le nombre ainsi que la taille des p-bodies sont augmentés sous hypoxie, entraînant une séquestration des ARNm LIN28A néosynthétisés (Weng et al., 2021). De plus, il a été mis en évidence qu'un stress hypoxique provoqué via le Chlorure de Cobalt (CoCl₂) entraînait une plus forte colocalisation de la protéine Ribonuclease T2 precursor (RNASET2) avec la protéine

DCP-1A (Lualdi et al., 2015). Dans cet article, les auteurs concluent à une relocalisation de la protéine dans les p-bodies, mais les agrégats de DCP-1A sous hypoxie sont inhabituels pour des p-bodies, puisqu'ils ont une morphologie bien différente de celle observée habituellement pour des p-bodies (excessivement gros et non sphérique). A l'inverse dans les cellules neuronales, l'hypoxie conduit à une diminution du nombre de p-bodies, conséquence d'une surexpression du miARN-130, dont DDX6 est une cible, la chute de DDX6 induit dans ce cas une diminution du nombre de p-bodies (Saito et al., 2011). Ces différentes études mettent toutes en évidence, qu'un stress hypoxique conduit à un remaniement des p-bodies dans la cellule, via une relocalisation d'ARNm et de protéines au sein des p-bodies.

De façon plus directe, les p-bodies semblent être impliqués dans la progression tumorale, puisqu'un traitement au TGF β (Transforming growth factor β) (inducteur de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)), conduit à une augmentation du nombre de p-bodies (Hardy et al., 2017). De plus, l'absence de p-bodies induite par l'inactivation de la protéine DDX6 dans un modèle murin de cancer du sein de stade IV, conduit à l'inhibition de la TEM et diminue la taille et le nombre de métastases. De plus, cette étude a mis en évidence le rôle de l'autophagie dans la régulation des p-bodies. Lors de l'induction de la TEM par le TGF β , nous observons une corrélation inverse entre la quantité de p-bodies et l'autophagie : le nombre de p-bodies augmente tandis que l'autophagie est atténuée et lorsque le TGF β est éliminé, l'autophagie reprend, et le nombre de p-bodies diminue. En effet, ce recyclage des p-bodies est inhibé lors de l'inhibition de l'autophagie par le DBE-Q et est stimulée lors de son induction par la rapamycine (Hardy et al., 2017). Les p-bodies semblent aussi jouer un rôle dans la résistance des cellules à différents stress. L'absence des protéines RRP4 (*EXOSC2*), RRP41 (*EXOSC4*) et RRP45 (*EXOSC9*) (sous-unité de l'exosome) entraîne une altération de la formation des p-bodies (Yoshino et al., 2020), et une augmentation de la sensibilité des cellules à divers stress tels que le cisplatine (molécule chimiothérapeutique), la tunicamycine (antibiotique), l'H₂O₂, ou encore la déprivation en sérum.

Chapitre II-Le cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) :

Le cancer est l'une des maladies les plus mortelles du 21^{ème} siècle. Dans le monde, une personne sur six meurt du cancer, ce qui en fait la deuxième cause de décès. En 2020, on estime à 10 millions le nombre de décès par cancer*. Les cancers les plus courants sont le cancer du poumon (2,26 millions de cas), du sein (2,21 millions de cas) et colorectal (1,93 millions de cas)* (Sung et al., 2021).

Le cancer pulmonaire est la première cause de mort par cancer dans le monde avec 1,8 millions de morts annuels*. Il est fortement associé à l'exposition au tabagisme ainsi qu'aux toxines environnementales, comme la pollution de l'air, l'utilisation de foyers intérieurs pour la préparation d'aliments dans les pays sous-développés ainsi que l'exposition au Radon (Didkowska et al., 2016; Islami et al., 2015; Lam et al., 2004; Malhotra et al., 2016). La survie des patients atteints d'un cancer pulmonaire étant très dépendante du stade de la maladie, la détection à un stade précoce est nécessaire pour réduire le taux de mortalité (Chansky et al., 2017).

I-Diagnostic et classification :

Le cancer pulmonaire est le plus souvent diagnostiqué à un stade avancé de la maladie (Kocher et al., 2015; Siegel et al., 2018). En effet, les stades précoces sont le plus souvent asymptomatiques, et les premiers symptômes apparaissent souvent à des stades avancés. La toux observée chez 50 à 75% des patients, est le symptôme le plus courant, suivi de l'hémoptysie (rejet lors de la toux de sang provenant des voies aériennes), de douleurs thoraciques et de dyspnée (essoufflement et gêne respiratoire) (Kocher et al., 2015). Un examen clinique suivi d'une radiographie sont les premières étapes pour diagnostiquer un cancer du poumon. Le médecin peut également prescrire une fibroscopie bronchique et un scanner thoracique. Une fois que les premiers examens ont mis en évidence une masse suspecte, une biopsie permettra de confirmer ou d'infirmer le diagnostic et de préciser le type

* <https://www-who-int.proxy.insermbiblio.inist.fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>

de cancer (Carcinome Pulmonaire à Petites Cellules (CPPC) ou Carcinome Pulmonaire Non à Petites Cellules (CPNPC)). Ensuite, pour définir le stade de la maladie et choisir le traitement le plus adapté, le médecin établit un bilan d'extension reposant sur plusieurs examens tels que la tomographie à émission de positon ou « PET-Scan », la médiastinoscopie, une échographie hépatique ainsi que différentes explorations fonctionnelles respiratoires afin d'évaluer la capacité respiratoire du patient et de déterminer si une intervention chirurgicale est possible. Ces examens supplémentaires sont importants, dans ce sens une étude randomisée danoise a rapporté que la combinaison « PET-Scan » et scanner permettait une meilleure classification de stade N que la stadification invasive traditionnelle (médiastinoscopie et biopsie des ganglions lymphatiques) (Fischer et al., 2011; Saettele and Ost, 2014).

Après diagnostic et à l'aide des différents examens réalisés, le pathologiste peut définir le stade de la maladie qui guidera les options de traitements du cancer. Cette classification permet non seulement de définir le stade de progression de la tumeur, mais aussi de classer les CPPC en 2 groupes : localisé ou avancé et les CPNPC en trois groupes principaux : les stades précoces (I et II), le stade localement avancé (III) et le stade métastatique (IV). Ce stade est défini via une classification nommée TNM (Tumor-Node-Metastasis) qui est fondée sur la taille des nodules tumoraux (T), le nombre de ganglions lymphatiques sentinelles envahis localement (N) et la présence ou l'absence de métastases à distance (M) (**Tabl.2**) (Travis et al., 2016). Plus le stade est avancé, plus les chances de survie des patients sont diminuées.

Enfin, au sein du laboratoire, le Pr. Hofman a mis en place un système de diagnostic précoce du cancer du poumon (Ilie et al., 2014). Cette étude, démontre la possibilité de détecter dans le sang des cellules tumorales circulantes (CTC) permettant de diagnostiquer un cancer du poumon à un stade précoce avant qu'il ne soit visible par imagerie. Le potentiel informationnel porté par les CTC peut-être étudié à plusieurs niveaux tels que la simple présence de CTC, le nombre de CTC dans le sang, la morphologie, l'immuno-cytochimie, ainsi que l'analyse génomique, transcriptomique voire même protéomique (Hofman et al., 2019; Maly et al., 2019). Il a été mis en évidence que les CTC pouvaient être isolées du sang veineux périphérique (de patients atteints de cancer du poumon à un stade précoce subissant une résection chirurgicale) grâce à l'utilisation de la technique ISET (isolement par taille de cellules tumorales épithéliales) (Hofman et al., 2011). Une autre étude a été réalisée afin d'utiliser la détection de CTC par la méthode ISET comme biomarqueurs pour le screening du cancer du

Stade	Tumeur (T)	Nodule (N)	Métastase (M)
0	<i>T in situ</i>	N0	M0
Ia	T1a, T1b	N0	M0
Ib	T2a	N0	M0
IIa	T1a, T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
IIb	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIa	T1, T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
IIIb	T4	N2	M0
	Tout T	N3	M0
IV	Tout T	Tout N	M1a
	Tout T	Tout N	M1b

Tableau 2 : Groupement des stades du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC).

Selon la septième édition du système de classification Tumeur-Nodule-Métastase (TNM). (Tiré et traduit de (Gridelli et al., 2015)).

poumon. Cependant, cette étude a montré une très faible sensibilité pour la détection des CTC dans l'identification du cancer du poumon (Marquette et al., 2020). En général, le nombre de CTC dans le sang au stade précoce du CPNPC est faible, néanmoins, il existe d'autres méthodes de détection des CTC (Alix-Panabières and Pantel, 2014; Fusi et al., 2013), de ce fait, ces résultats n'excluent pas la possibilité d'utiliser la détection des CTC avec une autre méthode plus sensible dans le criblage du cancer du poumon.

Le cancer du poumon est une maladie hétérogène, qui comprend plusieurs sous-types ayant une pertinence pathologique et clinique (Fujimoto and Wistuba, 2014; Travis et al., 2012, 2013). Sur la base du type histologique principal, des implications pronostiques et thérapeutiques, les cancers du poumon sont divisés en deux grands groupes : le carcinome pulmonaire à petites cellules (CPPC, 15% des cas) et le carcinome pulmonaire non à petites cellules (CPNPC, 85% des cas) (Fujimoto and Wistuba, 2014). Cette introduction se concentrera sur le groupe des CPNPC.

II-Traitements des CPNPC :

Le traitement du CPNPC a progressé ces dernières années et de nombreuses options thérapeutiques sont désormais disponibles en fonction des caractéristiques histologiques, du stade et du contexte génomique de chaque patient. Lorsqu'un CPNPC est détecté à un stade précoce (stades I/II), les patients subissent une résection chirurgicale complète du lobe ou du poumon lorsqu'il n'y a pas de contre-indication. Les patients non opérables doivent alors subir une radiothérapie conventionnelle ou stéréotaxique.

II.1-Chirurgie :

La résection chirurgicale d'un lobe de poumon, appelé lobectomie, est la procédure la plus adaptée pour un stade précoce de CPNPC. Des analyses rétrospectives plus récentes montrent que la survie semble plus faible avec une résection limitée qu'avec une lobectomie (Billmeier et al., 2011; Khullar et al., 2015). Cependant, plusieurs études prospectives non randomisées à petite échelle rapportent une survie à long terme favorable après résection cunéiforme (résection de nodules pulmonaires d'origine indéterminée) ou segmentectomie (ablation chirurgicale d'un segment du poumon) chez des patients atteints de cancers pulmonaires périphériques de type non identifié (Kodama et al., 1997, 2016).

II.2-Chimiothérapies :

La chimiothérapie est généralement préconisée pour les patients non-candidats à la chirurgie en raison d'un stade trop avancé de la maladie. Cependant, la chimiothérapie peut être aussi administrée aux patients en stade précoce avant (néoadjuvant) ou après (adjuvant) chirurgie. Les molécules de chimiothérapie sont administrées par voie veineuse (en perfusion) et/ou par voie orale (sous forme de comprimés). Ces molécules agissent sur les mécanismes de division cellulaire dans le but de détruire les cellules cancéreuses.

II.2.1-Chimiothérapie néoadjuvante et adjuvante pour les stades précoces :

La norme de soins actuelle pour les patients atteints de CPNPC de stade IB-IIB (et certains IIIA) implique une chimiothérapie néoadjuvante ou adjuvante en plus de la résection chirurgicale. En effet, l'ajout de la chimiothérapie à la chirurgie augmente le taux de guérison de 5 à 15% (Douillard et al., 2006; NSCLC Meta-analysis Collaborative Group, 2014; Pignon et al., 2008; Winton et al., 2005).

Le traitement systémique préopératoire pour les patients atteints de CPNPC résécable offre l'avantage de réduire la taille de la tumeur, augmentant ainsi le taux de résection mais permettrait aussi une meilleure tolérance du patient dans le cas de l'administration d'un adjuvant post-chirurgie. L'utilisation de chimiothérapie néoadjuvante entraîne une réduction de 10% des métastases à distance ainsi qu'une amélioration de 5% de la survie à 5 ans (NSCLC Meta-analysis Collaborative Group, 2014). Cependant, la chimiothérapie préopératoire peut entraîner un retard de la chirurgie chez certains patients ayant besoin de plus de temps pour se remettre des effets indésirables liés au traitement.

Alors que le traitement systémique néoadjuvant a le potentiel de réduire la taille de la tumeur, et de traiter les micrométastases précoces, l'objectif principal du traitement adjuvant est de traiter la maladie micrométastatique et de prévenir les récives, tout en permettant d'éliminer le plus tôt possible la tumeur primaire, source de micrométastases. Une analyse regroupant 5 essais cliniques, qui ont étudié l'effet du traitement adjuvant, a pu observer un bénéfice de survie de 5,4% à 5 ans (Pignon et al., 2008). D'autres études ont également rapporté des bénéfices de survie pour le traitement adjuvant en particulier pour des patients atteints de grosses tumeurs (> 4 cm) et pour ceux atteints d'une maladie de stade II, et après

résection complète chez les patients atteints d'une maladie de stade IIIA (Nagasaka and Gadgeel, 2018; Pignon et al., 2008; Salazar et al., 2017).

II.2.2-Chimiothérapie pour les stades avancés :

La chimiothérapie a été pendant de nombreuses années le seul traitement disponible pour les patients atteints d'un CPNPC de stade avancé et continue de jouer un rôle pivot malgré la découverte de l'immunothérapie (**Fig. 13**) (Baxevasos and Mountzios, 2018; Takeda et al., 2019). Les chimiothérapies pour le traitement des CPNPC peuvent être classifiées en deux groupes : les chimiothérapies avec et sans sels de platine. Moléculairement, les sels de platine sont des agents alkylants qui se lient à l'ADN par leurs atomes de chlore sur l'azote 7 des guanines, permettant l'inhibition de la réplication et conduisant à l'induction de l'apoptose des cellules (Dasari and Tchounwou, 2014; Florea and Büsselberg, 2011). Une méta-analyse de 13 études révèle une réduction significative du risque de mort après 1 an pour les patients traités avec une combinaison de chimiothérapies incluant les sels de platine en comparaison aux traitements sans (Pujol et al., 2006). Par conséquent, les traitements à base de platine sont recommandés dans le traitement initial des CPNPC métastatiques (Planchard et al., 2018). Les sels de platine sont communément utilisés en doublet : platine en combinaison avec un agent qui n'est pas un sel de platine. Les agents associés en combinaison sont principalement le gemcitabine (un antimétabolique), le vinorelbine (antinéoplasique, qui agit sur l'équilibre de la tubuline, inhibant la polymérisation du microtubule), des taxanes (paclitaxel ou docétaxel des inhibiteurs des microtubules) ou encore le pemetrexed (antinéoplasique antifolate multible) (Planchard et al., 2018; Ramalingam and Belani, 2008). Néanmoins, l'importance de la chimiothérapie pour le traitement des CPNPC a été réduite due à l'introduction des thérapies ciblées et de l'immunothérapie. Toutefois, les chimiothérapies présentent encore un intérêt en combinaison des thérapies ciblées (Noronha et al., 2020) et des immunothérapies (Gandhi et al., 2018).

II.3-Thérapies ciblées :

L'adénocarcinome (ADC) et le carcinome épidermoïde sont respectivement en deuxième et troisième position, derrière le mélanome, dans la liste des cancers possédant le plus d'altérations génomiques (Alexandrov et al., 2013). La caractérisation de ces altérations moléculaires a permis l'émergence de thérapies ciblées. La découverte des altérations du gène

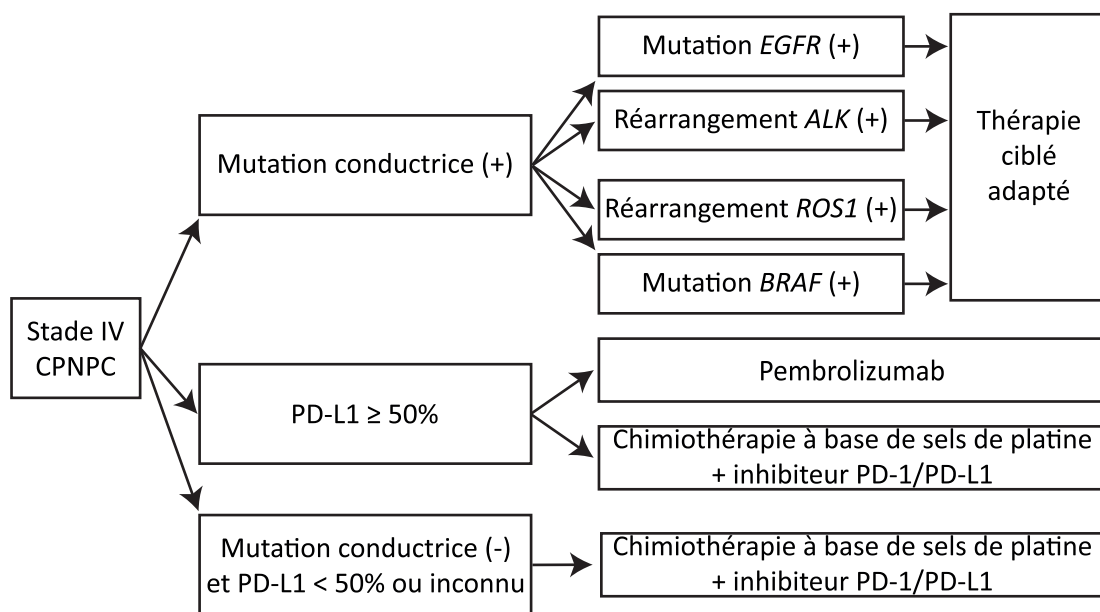


Figure 13 : Stratégie de traitements du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) de stade IV.
 (Tiré et traduit de (Takeda et al., 2019)).

EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor) et du réarrangement d'*ALK* dans les ADC pulmonaire a conduit au développement de thérapies ciblées utilisant les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) et le crizotinib (inhibiteur d'*ALK*) (**Fig. 13-14**) (Mitsudomi and Yatabe, 2007; Paez et al., 2004; Soda et al., 2007; Tsao et al., 2009). Ces thérapies visent à proposer des traitements spécifiques pour chaque patient ciblant les voies de signalisation impliquées dans les processus d'oncogénèse pulmonaire, les voies de l'angiogénèse et des facteurs de croissance. Seront détaillées ci-dessous les principales thérapies ciblées utilisées dans le traitement du CPNPC.

II.3.1-Mutations de l'*EGFR* :

Les mutations du gène codant pour l'*EGFR* (Epithelial Growth Factor Receptor), le récepteur du facteur de croissance épidermique, sont communément retrouvées parmi les anomalies moléculaires les plus fréquentes dans le CPNPC, en particulier dans les ADC pulmonaires. L'*EGFR* (ou HER-1/ErbB1) est un récepteur à activité tyrosine kinase de la famille des récepteurs ErbB (Rude Voldborg et al., 1997). L'*EGFR* est surexprimé dans 30% CPNPC et ainsi que dans de nombreux autres cancers épithéliaux (Addeo et al., 2021). Les mutations du récepteur à l'*EGF* (Epithelial Growth Factor) se produisent dans les exons 18 à 21, codants pour une partie du domaine kinase, et sont généralement hétérozygotes, l'allèle mutant présente également une amplification génique (Soh et al., 2009). Ces mutations augmentent l'activité kinase de l'*EGFR* conduisant à l'hyperactivation des voies de signalisation en aval (Sordella et al., 2004). Les mutations de l'*EGFR* sont plus souvent retrouvées dans les ADC de femmes non-fumeuses (le statut non-fumeur correspond à des patients ayant fumés moins de 100 cigarettes au cours de leur vie) (Lynch et al., 2009; Paez et al., 2004; Pao et al., 2004). Cependant, des mutations de l'*EGFR* peuvent également être retrouvées chez les patients présentant d'autres caractéristiques clinico-pathologiques, y compris les fumeurs (ethnie asiatique par exemple). Les tumeurs présentant des mutations de l'*EGFR* sont susceptibles d'être traitées par les inhibiteurs de l'*EGFR* (osimertinib, géfitinib, erlotinib et afatinib), cependant la plupart des patients rechutent et développent une résistance, le plus souvent associée à une deuxième mutation dans l'exon 20, une amplification de MET ou de ERK2 et des mutations PI3KCA (Ercan et al., 2012; Fujimoto and Wistuba, 2014; Schmid et al., 2020).

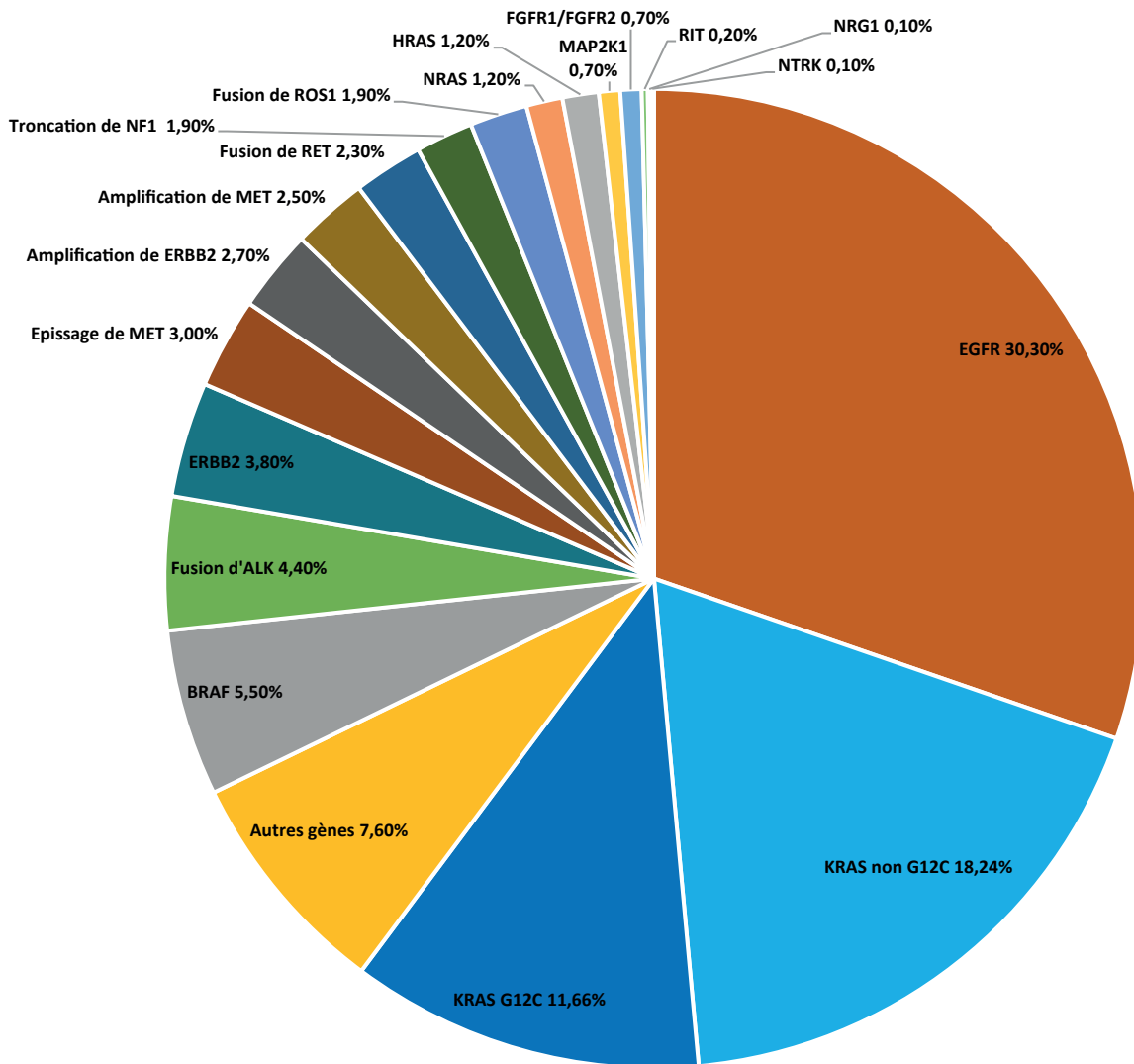


Figure 14 : Mutations promotrices dans le CPNPC.
 (Adapté de (Addedo et al., 2021)).

II.3.2-Mutations KRAS :

Des mutations ponctuelles activatrices de l'oncogène *KRAS* sont détectées dans 30% des patients atteints des CPNPC, la plus fréquente étant la mutation *KRAS G12C* (Addeo et al., 2021). La protéine *KRAS* code pour une GTPase en aval de la voie de signalisation de l'EGFR et fait partie de la voie de signalisation connue sous le nom de RAS/MAPK (Mitogen-activated protein kinases). Les mutations de la protéine *KRAS* ainsi que les stratégies permettant son inhibition seront détaillées dans une autre sous-partie (*Acteurs de la voie de signalisation RAS-MAPK, Les inhibiteurs de RAS*).

II.3.3-Mutations BRAF :

Les mutations du gène *BRAF* ont été initialement retrouvées dans le mélanome, mais elles sont aussi présentes dans les CPNPC (Anguera and Majem, 2018). Ces mutations sont moins fréquentes, nous les retrouvons dans 5% des CPNPC, la plus commune étant la mutation *BRAF V600E*. *BRAF* code pour une sérine-thréonine kinase située immédiatement en aval de *KRAS* dans la voie de signalisation. Nous observons un taux de réponse de 40% avec l'utilisation des *BRAF* inhibiteurs (dabrafenib ou vemurafenib) chez des patients atteints de CPNPC et mutés *BRAF V600E* (Planchard et al., 2016). De plus, la combinaison avec un inhibiteur de MEK (situé en aval de *KRAS* et de *BRAF* dans la voie des RAS/MAPK) comme le tramétinib, augmente le taux de réponse global à 63% avec une médiane de survie sans progression de 9,7 mois (Peters et al., 2013; Planchard et al., 2017; Robinson et al., 2014).

II.3.4-Réarrangement ALK & RET :

La translocation du gène *ALK-EML4* (Anaplastic Lymphoma receptor tyrosine Kinase-Echinoderm Microtubule-associated protein Like 4) situé sur le chromosome 2p est présente dans 4% des CPNPC (Addeo et al., 2021). Les fusions *EML4-ALK*, sont plus fréquentes chez les patients jeunes n'ayant jamais fumé ou avec des antécédents de tabagisme léger (Wong et al., 2009). L'utilisation d'un inhibiteur sélectif d'ALK, le crizotinib, réduit la prolifération des cellules portant des altérations géniques d'ALK, soutenant son rôle dans la prolifération maligne et l'utilisation d'inhibiteur d'ALK en thérapie ciblée (Bang, 2011; Solomon et al., 2018).

Le proto-oncogène *RET* est réarrangé dans 2% des CPNPC, ces patients sont traités avec des agents antinéoplasiques (pémétréxed, cabozantinib) (Drilon et al., 2013, 2016) ou des inhibiteurs de VEGFR (vandétanib) (Falchook et al., 2016).

L'efficacité de ces thérapies ciblées dépend directement de l'état d'activation des différentes voies de signalisation dans les cellules tumorales, ainsi que de l'affinité du traitement avec sa cible influencée par la présence de certaines altérations génomiques (Ilie and Hofman, 2012). La compréhension de la biologie des tumeurs permet donc le développement de nouveaux agents ciblant spécifiquement ces oncogènes, comme le développement d'inhibiteurs de KRAS (Canon et al., 2019), mais aussi l'amélioration d'inhibiteurs déjà existants (Shaw et al., 2020), ainsi que leurs évaluations dans des essais cliniques.

II.4-Immunothérapies :

Au cours de la dernière décennie, une révolution dans la prise en charge des patients atteints de cancer a été initiée par le développement de l'immunothérapie. En effet, la croissance et la propagation d'un cancer ne dépendent pas seulement des caractéristiques des cellules tumorales, mais sont aussi affectées par l'interaction avec le système immunitaire (Hanahan and Weinberg, 2011; Matsushita et al., 2012). L'immunothérapie consiste donc à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme contre les cellules cancéreuses en levant le blocage spécifique, initié par les cellules tumorales, des points de contrôle immunitaire tels que le PD-1 (programmed cell death protein 1) et son ligand PD-L1 (programmed death-ligand 1) (Brahmer et al., 2012; Topalian et al., 2012).

Plusieurs inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI : Immune Checkpoint Inhibitor) bloquant les voies PD-1/PD-L1 et CTLA4, ont été évalués dans le CPNPC. En raison de leur meilleur profil d'efficacité et de sûreté par rapport à la chimiothérapie, cinq d'entre eux sont approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) dans le traitement de stades avancés du CPNPC en première ligne de traitements de stade III et/ou métastatiques le plus souvent en combinaison avec des sels de platine (Takeda et al., 2019) (**Fig. 13**) : l'anti-CTLA4 : l'ipilimumab, les anti-PD-1 : le pembrolizumab et le nivolumab, et les anti-PDL-1 : l'atezolizumab et durvalumab (Lucibello et al., 2021).

Chapitre III-La voie de signalisation RAS-MAPK dans le cancer :

La voie de signalisation RAS-RAF-MEK-ERK (MAPK/ERK) fait partie des cascades de signalisation MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Sa fonction est de transduire les signaux extracellulaires vers le noyau où des gènes spécifiques sont activés pour le contrôle de la croissance, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Korzeniecki and Priefer, 2021; Rajasekharan and Raman, 2013). Cette voie de signalisation fait intervenir un ensemble de trois kinases agissant en cascade s'activant par phosphorylation séquentielle.

La voie de signalisation MAPK commence par l'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) qui est intégré dans la membrane plasmique (**Fig.15**). Le RTK est activé par la liaison d'un ligand extracellulaire, entraînant sa dimérisation et/ou son oligomérisation (Du and Lovly, 2018), une fois activé le récepteur se lie à une molécule adaptatrice permettant le recrutement d'un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF : Guanine nucleotide Exchange Factors). La liaison des GEF à RAS permet son activation par liaison du GTP (Guanosine TriPhosphate). Lorsqu'elle est activée, la protéine RAS est capable d'activer à son tour de nombreuses kinases dont les protéines RAF. Les protéines RAF actives phosphorylent les kinases MEK1/2, qui peuvent ensuite phosphoryler et activer les protéines ERK1/2, qui pourront pénétrer dans le noyau afin d'activer les facteurs de transcription qui se lient aux séquences d'ADN et initient la transcription des gènes cibles (Korzeniecki and Priefer, 2021).

Cette voie de signalisation est anormalement activée dans de nombreux cancers, dont le cancer du poumon comme décrit ci-dessus. Les mécanismes d'activation de cette voie sont principalement l'activation de récepteurs membranaires tels que l'EGFR, mais aussi la survenue d'amplifications ou de mutations somatiques, notamment au niveau des proto-oncogènes codant pour les protéines RAS ou RAF (Guo et al., 2020).

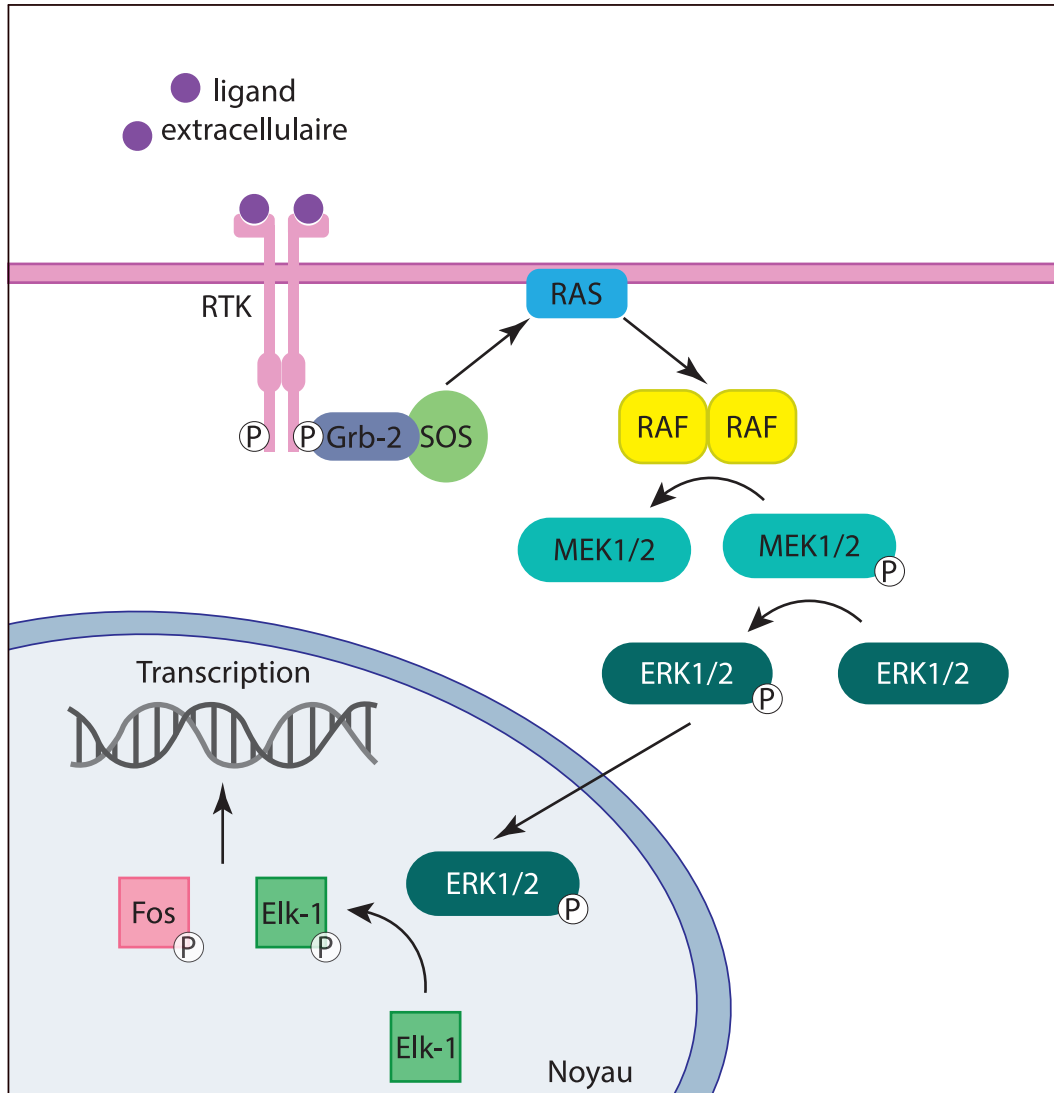


Figure 15 : Mécanisme d'activation de la voie de signalisation des MAPK.

La voie de signalisation MAPK commence par l'activation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) intégré dans la membrane plasmique par la liaison d'un ligand extracellulaire. Le récepteur se lie ensuite à une molécule adaptatrice permettant le recrutement d'un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) (Son of Sevenless : SOS). La liaison des GEF à RAS permet son activation par liaison du GTP. La protéine RAS est capable d'activer à son tour de nombreuses kinases dont les protéines RAF. Les protéines RAF peuvent alors phosphoryler les kinases MEK1/2, qui phosphorylent et activent les protéines ERK1/2, qui pourront pénétrer dans le noyau afin d'activer les facteurs de transcription qui se lient aux séquences d'ADN et initie la transcription des gènes. (Adapté de (Korzeniecki and Priefer, 2021)).

I-Acteurs de la voie de signalisation RAS-MAPK :

I.1-Récepteurs tyrosines kinases (RTK) :

L'activation de la voie RAS-MAPK est médiée par l'activation de récepteurs tyrosines kinases (RTK) transmembranaires. Ces récepteurs permettent de recevoir, d'intégrer et de convertir des signaux extracellulaires en réponses biologiques. Découverte dans les années 1980, chez l'Homme, la famille des RTK est codée par au moins 58 gènes, qui sont divisés en 20 sous-familles (Levinson et al., 1980) et partagent toutes une structure protéique similaire. Elles comprennent un domaine de liaison du ligand dans la partie N-terminale, une hélice transmembranaire et une région cytoplasmique contenant le domaine tyrosine kinase ainsi qu'une région régulatrice C-terminale juxta-membranaire (Lemmon and Schlessinger, 2010; Trenker and Jura, 2020). Le principal récepteur étant capable d'activer la voie RAS-MAPK est le récepteur à l'EGF ou HER1. Ce récepteur étant aussi le RTK le plus fréquemment retrouvé muté dans le CPNPC, nous nous focaliserons uniquement sur celui-ci.

Le récepteur à l'EGF est une glycoprotéine transmembranaire appartenant à la famille HER ou ErbB. Les HER appartiennent à la famille des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine-kinase et comportent, en plus de l'EGFR, 3 autres récepteurs : HER2 (ou C-erbB2), HER3 et HER4 (Wang, 2017). L'EGFR possède plusieurs ligands mais les deux principaux sont l'EGF (Epithelial Growth Factor) et le TGF α (Transforming Growth Factor α) (Yarden, 2001). La fixation du ligand sur le récepteur entraîne son homo- et/ou hétérodimérisation avec d'autres récepteurs de la famille ErbB tels que HER2, conduisant à son activation par autophosphorylation en *trans* au niveau de résidus tyrosines spécifiques situés sur son domaine intracellulaire (Sigismund et al., 2018). Cette autophosphorylation permet l'exposition des résidus phosphotyrosines entraînant la liaison de protéines adaptatrices comme la protéine GRB2. Les protéines adaptatrices recrutent ensuite le facteur d'échange de guanine SOS (Son of Sevenless) au niveau de la membrane plasmique, activant à son tour les protéines RAS dans la voie des RAS-MAPK (Muhammad et al., 2017).

Peu après son identification en 1970, il a été découvert que l'expression de l'EGFR pouvait conduire à une transformation cellulaire (Velu et al., 1987). En outre, l'hyperactivation, la surexpression ou des mutations dans le gène *EGFR* dans de nombreuses cellules cancéreuses entraînent une signalisation dérégulée (Arteaga and Engelman, 2014). D'ailleurs, l'EGFR est surexprimé dans la plupart des tumeurs solides (sein, côlon, ORL, rein, ovaire, et poumon)

(Sabbah et al., 2020) et les perturbations EGFR-dépendantes sont corrélées à un pronostic péjoratif pour les patients (Bossi et al., 2016; Kjaer et al., 2018; Nicholson et al., 2001).

I.2-Les GTPases RAS :

I.2.1-Structure et activation :

Les protéines RAS (Rat Sarcoma Virus) sont de petites GTPases (21kDa) jouant un rôle crucial dans la conversion du signal reçu par les RTK vers les protéines situées en aval. Chez les mammifères, il existe 3 gènes RAS codant pour trois isoformes de gènes, *HRAS*, *NRAS* et *KRAS* et quatre isoformes de protéines (le gène *KRAS* code pour deux isoformes : *KRASA* et *KRASB*). Les protéines RAS partagent une forte homologie de séquence (82-90%).

Les protéines RAS ne sont pas des protéines membranaires puisqu'elles ne possèdent pas de région hydrophobe transmembranaire, ni de séquence signal dédiée (Buday and Downward, 2008). En revanche, des modifications post-traductionnelles tels que la prénylation (modification post-traductionnelle consistant en l'attachement par liaison covalente d'un groupement farnésyl (C₁₅) ou géranylgeranyl (C₂₀)) permettent leur adressage membranaire, via un domaine CAAX (C : cystéine, A : Acide aminé aliphatique, X : autre acide aminé) (Lerner et al., 1995). Les protéines RAS naissantes dans le cytosol sont d'abord modifiées par la protéine farnésyltransférase ou la géranylgeranyltransférase sur le résidu cystéine de leur motif CAAX (Casey et al., 1989, 1991; Hancock et al., 1989), permettant leur association transitoire au réticulum endoplasmique (RE) (Hancock et al., 1989; Wright and Philips, 2006). Lorsqu'elles sont à la membrane du RE, elles sont clivées par l'endoprotéase RCE1 et méthylées par la protéine ICMT (Isoprenylcysteine CarboxylMethylTransferase) (Bergo et al., 2004; Boyartchuk et al., 1997). Ces modifications permettent de convertir l'extrémité C-terminale des protéines RAS d'une région hydrophile en une région hydrophobe, facilitant leur insertion dans les membranes cellulaires (Winter-Vann et al., 2003). Les protéines RAS peuvent subir des modifications spécifiques en fonction de l'isoforme, comme une phosphorylation pour *KRAS4B* et une palmitoylation pour *HRAS* et *NRAS*, facilitant leur transport et leur localisation à la membrane plasmique par des mécanismes distincts (Jang et al., 2015).

Une fois à la membrane, elles sont activées en réponse à l'activation des RTK par leurs ligands via la liaison d'un GTP. En tant que GTPases, les protéines RAS sont régulées par le cycle

GTP/GDP (McCormick, 1989), elles oscillent donc entre une forme active, liée au GTP, leur permettant de se lier et d'activer les effecteurs en aval, et une forme inactive, liée au GDP (Guanosine DiDhosphate) les empêchant d'établir de telles interactions. Le processus d'échange du GDP lié pour le GTP, activant RAS, est facilité par les protéines GEF comme la protéine SOS. En effet, l'activation des RTK (par exemple : l'EGFR) induit alors l'interaction de SOS avec la protéine adaptatrice Grb2 à la membrane, via le domaine SH2. L'activité intrinsèque de la GTPase RAS (GAP : GTPase Activating Protein) (**Fig.16**), hydrolyse le GTP lié en GDP et ramène la protéine à l'état inactif lié au GDP complétant ainsi le cycle GTP/GDP (Hennig et al., 2015a).

I.2.2-Les protéines RAS, carrefour de signalisation :

Les sérine/thréonine RAF kinases (ARAF, BRAF et CRAF/RAF1) et les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K α , PI3K δ , PI3K γ) ont été les premières protéines effectrices majeures identifiées de RAS (Castellano and Downward, 2011; Terrell and Morrison, 2019). Ces protéines effectrices comprennent des domaines de liaison à RAS (Ras Binding Domain, RBD) conservés qui s'associent préférentiellement aux protéines RAS lorsqu'il est lié au GTP, sous sa forme active, avec une affinité 1000 fois supérieure à la forme inactive. Cependant, la signalisation de RAS est complexe et ne se limite pas seulement aux voies RAF et PI3K, d'autres protéines ont été identifiées comme effectrices de RAS comme la protéine d'adhésion AFDN/Afadin (Kuriyama et al., 1996), la protéine RASSF5/NORE1 (Vavvas et al., 1998), l'activateur RAB RIN1 (Han and Colicelli, 1995), la phospholipase PLC ϵ 1 (Shibatohge et al., 1998) et les protéines RAL-GEF (Hofer et al., 1994) (**Fig.17**).

La famille des protéines RAF (ARAF, BRAF, CRAF) sont des sérine/thréonine kinases qui se lient à la région effectrice de RAS-GTP, induisant la translocation de la protéine vers la membrane plasmique, permettant leur phosphorylation par différentes protéines kinases. Les protéines RAF seront détaillées dans une autre sous partie (*Les kinases RAF*).

La deuxième famille d'effecteurs de RAS la mieux caractérisée est celle des phosphoinositides 3-kinases (PI3K) (PI3K α , PI3K δ , PI3K γ) qui jouent un rôle important en tant que médiateurs de la survie et de la prolifération cellulaire médiées par RAS (Castellano and Downward, 2010; Vivanco and Sawyers, 2002). Lorsqu'elle est active, la protéine PI3K convertit le PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate). PIP3 à son tour se lie au domaine d'homologie pleckstrine (PH) d'AKT stimulant son activité

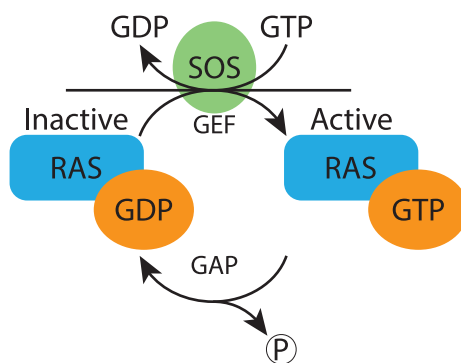


Figure 16 : Activation des protéines RAS.

En tant que GTPases, les protéines RAS sont régulées par le cycle GTP/GDP, elles oscillent donc entre une forme active, liée au GTP, leur permettant de se lier et d'activer les effecteurs en aval, et une forme inactive, liée au GDP les empêchant d'établir de telles interactions. Le processus d'échange du GDP lié pour le GTP, activant RAS, est facilité par les protéines du facteur d'échange de guanine (GEF) telle que la protéine SOS (Son of Sevenless). L'activité intrinsèque de la GTPase RAS (GAP), hydrolyse le GTP lié en GDP et ramène la protéine à l'état inactif lié au GDP complétant ainsi le cycle GTP/GDP.

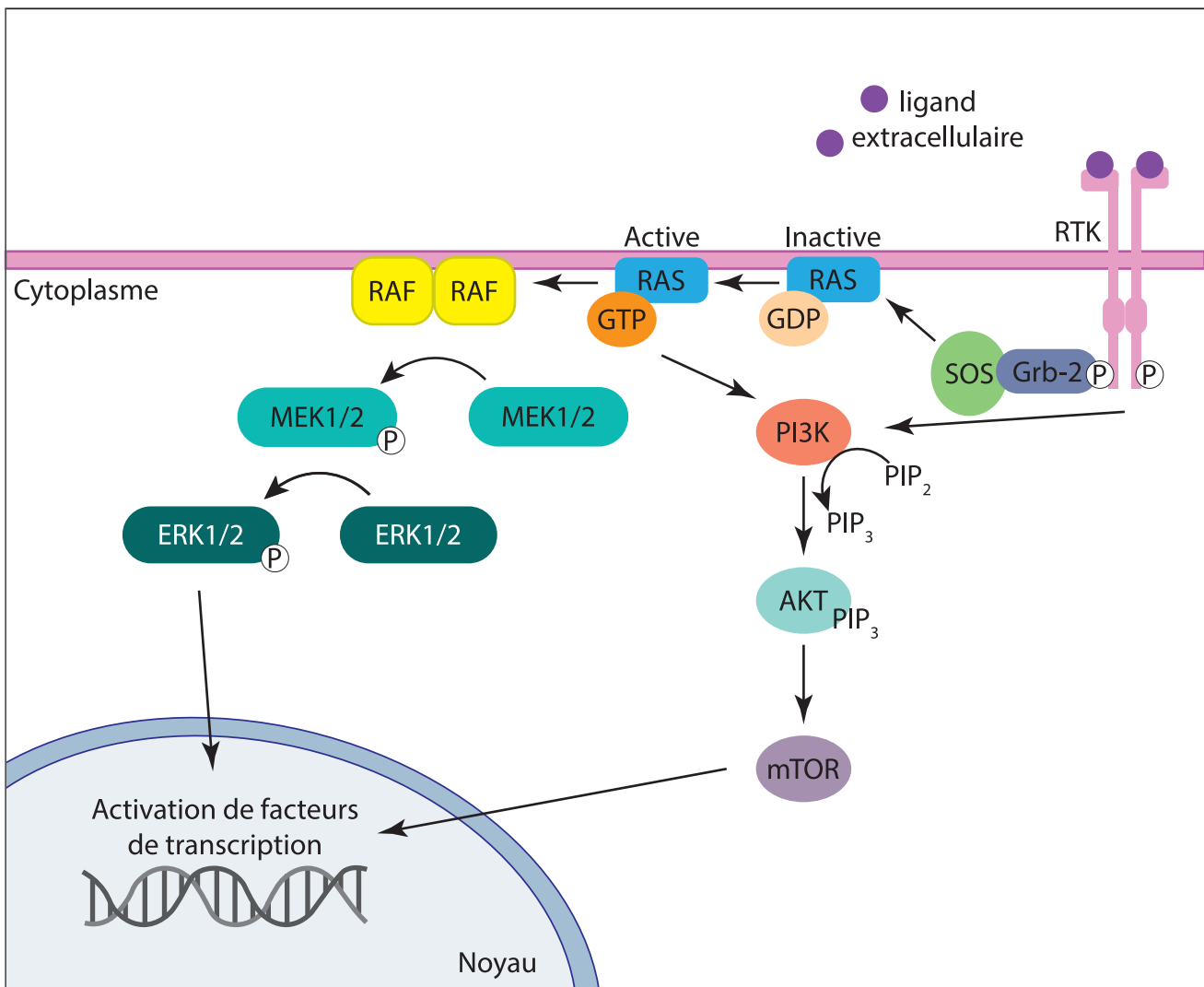


Figure 17 : Protéines effectrices de RAS.

Les sérines/thréonine RAF kinase (ARAF, BRAF et CRAF) et les phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) (PI3K α , PI3K δ , PI3K γ) ont été les premières protéines effectrices majeures de RAS identifiées. Ces protéines effectrices comprennent des domaines de liaison à RAS (RDB) conservés qui s'associent préférentiellement au RAS lorsqu'il est lié au GTP, sous sa forme active.

Cependant, la signalisation de RAS ne se limite pas seulement aux voies RAF et PI3K.

Les protéines RAS actives sont capables de recruter RAF à la membrane plasmique. La liaison de RAS entraîne également des changements au niveau de la phosphorylation de RAF et induit la formation de dimères de RAF, reconnue comme une étape requise dans le processus d'activation de Raf. Une fois actives les protéines RAF phosphorylent les kinases MEK1/2, qui peuvent ensuite phosphoryler et activer les protéines ERK1/2, qui pourront pénétrer dans le noyau afin d'activer les facteurs de transcription qui se lient aux séquences d'ADN et initient la transcription des gènes.

Lorsqu'elle est active la protéine RAS est capable d'induire l'activation de la protéine PI3K, qui peut alors convertir le PIP₂ (phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate) en PIP₃ (phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate). PIP₃, à son tour se lie à la protéine AKT stimulant son activité kinase, entraînant la phosphorylation d'autres protéines, et d'induire in fine, une réponse cellulaire complexe via la voie mTOR ou l'activation de facteurs de transcription.

kinase, entraînant la phosphorylation d'autres protéines, et induisant *in fine*, une réponse cellulaire complexe via la voie mTOR ou l'activation du facteur de transcription NF-κB (Castellano and Downward, 2011). L'activation de PI3K permet aussi l'activation de la protéine RAC, impliquée dans la réorganisation du cytosquelette (Cantley, 2002).

Une autre voie effectrice de RAS bien caractérisée implique les protéines Ral-GEF. Les membres de Ral-GEF dont RAL GDS (RAL Guanine nucleotide Dissociation Stimulator) sont des facteurs d'échange avec une spécificité pour les petites GTPases RalA et RalB (D'Adamo et al., 1997; Moghadam et al., 2017), 2 des 35 membres de la sous famille des petites protéines G RAS. La voie RAL est impliquée dans la régulation de divers facteurs de transcription. L'activation de la tyrosine kinase Src par la voie de signalisation RAL-GEF conduit à l'activation du facteur de transcription STAT3 et de la kinase JNK. Ce signal active ensuite la kinase c-JUN, un composant majeur de la famille AP-1, qui stimule l'activité transcriptionnelle, la différenciation cellulaire et l'apoptose (Behrens et al., 1999; Leppä and Bohmann, 1999; de Ruiter et al., 2000).

I.2.3-Les mutations oncogéniques de RAS et signalisation :

Les mutations :

Les gènes *KRAS*, *HRAS* et *NRAS* sont les oncogènes les plus fréquemment mutés dans les cancers humains (environ 20%) (Prior et al., 2020). Les mutations du gène *KRAS* surviennent dans environ 88% des adénocarcinomes pancréatiques, 50% des adénocarcinomes colorectaux. Les mutations de *NRAS*, moins fréquentes, sont retrouvées dans 19% des carcinomes anaplasiques de la thyroïde, 17% des mélanomes cutanés et 14% des leucémies aiguës lymphoblastiques. Les mutations *HRAS*, plus rares, sont présentes dans 7% des carcinomes urothéliaux et 5% des carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Prior et al., 2020). Les sites les plus récurrents des mutations oncogéniques pour les *RAS* correspondent aux résidus glycine 12 (*KRAS*, *HRAS*), glycine 13 (*KRAS*, *HRAS*) et glutamine 61 (*NRAS*, *HRAS*) (**Tabl.3**) (Korzeniecki and Priefer, 2021; Prior et al., 2020). Les glycines 12 et 13 se trouvent dans la région de liaison au GTP tandis que la glutamine 61 se trouve dans la région enzymatique. Néanmoins, au sein d'une isoforme et d'un codon donné, la fréquence des substitutions d'acides aminés varie selon le type de cancer. Par exemple, dans le cancer du poumon, la mutation *KRAS* la plus courante est la G12C, qui serait associée à l'exposition à la fumée de tabac (Dogan et al., 2012).

Gène	Abbréviations	Cancers	Mutations
Kristen rat sarcoma	<i>KRAS</i>	Poumon, Côlon, Pancréas	G12D, G12V, G12R, G13D, G12DC, G12A, G12S
Harvey rat sarcoma	<i>HRAS</i>	Vessie	G13R, Q61R, G12V, Q61L, Q61K, G12S, G13D, G12A
Neuroblastoma RAS	<i>NRAS</i>	Leucémie myéloïde mélanome	Q61R, Q61K, G12D

Tableau 3 : Mutations les plus fréquentes des gènes RAS.
(Tiré et traduit de (Korzeniecki and Priefer, 2021)).

La substitution induite par mutation de la glycine 12 ou 13 par tout autre acide aminé (à part la proline) perturbe l'inactivation de RAS, altérant ainsi la régulation de la forme active de RAS-GTP. L'inactivation du RAS est médiée par les GAP qui accélèrent le processus d'hydrolyse de la forme active du RAS-GTP en RAS-GDP. Des mutations sur ces trois sites communs diminuent l'activité GTPase médiée par les GAP conduisant à une hyperactivation des formes RAS-GTP, entraînant une perturbation de la voie de signalisation MAPK et une expression génique non régulée (Kötting et al., 2008).

La signalisation :

Au niveau de la signalisation, les isoformes RAS mutantes interagissent différemment avec les isoformes RAF, CRAF se lie à toutes les protéines RAS mutantes avec une affinité élevée, tandis que BRAF présente une forte préférence pour les mutants KRAS (Terrell et al., 2019). Comme souligné précédemment, les profils de mutations des isoformes RAS sont différents en fonction des cancers, suggérant des rôles tissulaires distincts pour les protéines RAS dans la conduite de l'oncogenèse. L'explication serait que les mutations conductrices pourraient être déterminées par les niveaux d'expression des protéines RAS. Tout d'abord, les niveaux d'expression des protéines dépendent de l'accessibilité de la chromatine en fonction du type cellulaire. Ensuite, l'expression d'autres protéines dans la voie respective ne doit pas être faible pour que le signal se propage. Enfin, la mutation conductrice dépendrait du niveau d'expression du gène dans la tumeur/lignée (Nussinov et al., 2021). En effet, un modèle de carcinogenèse chez la souris, a montré que la base préférentielle de la mutation KRAS dans le cancer du poumon n'était pas due à des différences fonctionnelles distinctes entre les isoformes RAS, mais plutôt à la régulation distincte de l'expression de l'isoforme du gène RAS (Pershing et al., 2015).

I.2.4-Différences entre les isoformes :

Localisation subcellulaire :

Les différences dans les isoformes RAS sont principalement attribuées à des différences de séquence au sein de la région HVR, un site sur lequel les protéines RAS sont modifiées de manière différentielle par les lipides. En effet, la relocalisation des protéines RAS à la membrane plasmique est différente. La palmitoylation et la farnésylation de NRAS et de HRAS au niveau des cystéines C-terminales dirigent les protéines du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique par la voie exocyttaire (Choy et al., 1999; Rocks et al., 2010). En raison

de l'absence de ces modifications, la protéine KRAS4B transite vers la membrane plasmique par la phosphodiesterase- δ (PDE δ) (Nussinov et al., 2021; Schmick et al., 2014). Contrairement à KRAS, les protéines NRAS et HRAS en plus de la membrane plasmique sont présentes et fonctionnelles au niveau de l'appareil de Golgi, (Fehrenbacher et al., 2009). De plus, les isoformes KRAS4A et KRAS4B ont des séquences polybasiques facilitant leurs insertions dans des régions acides de la membrane (Gelabert-Baldrich et al., 2014). Il semble aussi que la différence de localisation des protéines RAS ait un impact sur la tumorigène, la localisation de la protéine mutée constitutivement active HRAS V12 au niveau de l'appareil de golgi entraîne une inhibition de la transformation maligne (Casar et al., 2018).

Biais d'utilisation des codons :

Cependant, l'identification de différences entre les isoformes au niveau traductionnel pourrait expliquer pourquoi KRAS est l'isoforme principalement mutée dans le cancer. Contrairement à *HRAS*, la séquence codante de *KRAS* comporte une fréquence élevée de codons rares, entraînant une traduction médiocre et donc une expression faible de la protéine (Lampson et al., 2013). Comme les mutations de RAS sont les événements génétiques à l'origine de nombreux cancers, il a été proposé que l'expression élevée de HRAS activée, mais pas KRAS induirait la sénescence. Par conséquent, une cellule avec KRAS muté persistera pour permettre des événements génétiques ultérieurs afin de favoriser la progression tumorale. A l'appui de cette hypothèse, des souris possédant une séquence codante KRAS optimisée pour les codons fréquents, entraînant une expression accrue, présentent des tumeurs considérablement réduites (Pershing et al., 2015).

La dégénérescence du code génétique implique que 61 codons codent pour 20 acides aminés différents. A l'exception de la méthionine et du tryptophane, tous les acides aminés sont codés par des codons synonymes. En 1972, Goel et ses collègues à partir d'un calcul de la fréquence de l'usage des codons chez la levure sont arrivés à la conclusion que les codons synonymes n'étaient pas totalement équivalents et ont fait allusion au fait que ces différences de fréquence des codons étaient probablement dues à des codons conférant des taux de traduction différents (Goel et al., 1972). Ce biais systématique dans la fréquence de codons est connu sous le nom de biais d'utilisation des codons (CUB : Codon Usage Bias). La différence mentionnée précédemment dans les niveaux d'expression des isoformes KRAS et HRAS est la conséquence de ce biais de codon. L'expression ectopique de l'oncogène HRAS est 20 fois supérieure à celle de KRAS. Malgré une forte identité en terme d'acides aminés, la

comparaison des séquences de *KRAS* et de *NRAS* a révélé que la troisième position des codons était souvent un A/T pour *KRAS* et un G/C pour *HRAS* (Lampson et al., 2013). Ainsi, la conversion progressive des codons rares de *KRAS* en codons communs entraîne une augmentation proportionnelle de l'expression de la protéine *KRAS*. L'analyse de la composition en codons de *KRAS* et *HRAS* de 5 espèces (humain, souris, chien, poulet, et poisson-zèbre) ont permis de mettre en évidence que contrairement aux autres espèces, *hras* et *kras* du poisson-zèbre codés par un mélange entre les codons rares et communs présentent des niveaux d'expression comparable entre *KRAS* et *HRAS* (Lampson et al., 2013).

I.3-Les kinases RAF :

Les membres de la famille RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma) sont des sérine/thréonine kinases hautement conservées. Chez les mammifères, il existe 3 protéines ARAF, BRAF et CRAF/RAF1 (Wellbrock et al., 2004). Les protéines RAF sont des effecteurs directs de RAS activé, médiant la transmission du signal de RAS aux kinases en aval de MEK et ERK (Marshall, 1996). Sous forme inactive, les protéines RAF sont dans un état auto-inhibé par lequel leur région N-terminale entre en contact avec leur domaine catalytique et le réprime (Chong and Guan, 2003). Comme expliqué précédemment, les protéines RAS sont ancrées à la membrane plasmique par leur motif CAAX C-terminal prénylé. Lorsqu'elles sont sous forme active, les protéines RAS sont capables de recruter RAF à la membrane plasmique via son site de liaison à RAS (RBD), ce qui perturbe leur auto-inhibition (Ahearn et al., 2011). La substitution d'un seul résidu dans le RBD est suffisante pour perturber l'association de RAF avec RAS et abolir l'activation de RAF (Fabian et al., 1994). La liaison de RAS entraîne également des changements au niveau de la phosphorylation de RAF et induit la formation de dimères de RAF reconnue comme une étape requise dans le processus d'activation de RAF. Les kinases RAF peuvent se dimériser avec n'importe quel autre membre de la famille RAF, et bien que les facteurs qui déterminent les préférences de dimérisation soient mal compris, les hétérodimères de BRAF/CRAF prédominent dans la signalisation RAS-dépendante (Durrant and Morrison, 2018).

Dans le cancer, lorsque la voie est cooptée par l'activité RTK ou RAS constitutive, la dimérisation des protéines RAF de type sauvage est nécessaire pour activer MEK et ERK situées en aval de la voie de signalisation. Cependant, lorsque la signalisation oncogénique est pilotée par BRAF, l'exigence de dimérisation RAF peut varier. Parmi les kinases RAF, BRAF a

l'activité kinase intrinsèque la plus élevée et est mutée dans 50 à 70% des mélanomes malins, 40% des carcinomes de la thyroïde, 30% des tumeurs ovariennes et près de 100% des leucémies à thricholeucocytes (Turski et al., 2016). Bien que de nombreuses altérations de BRAF aient été détectées dans le cancer, les mutations affectant le résidu valine à la position d'acide aminé 600 (V600) sont les plus répandues, la mutation BRAF V600E représentant 80 à 90% des mutations dans le mélanome. Les mutations BRAF V600 permettent à BRAF d'adopter une conformation de kinase active en l'absence de dimérisation et, par conséquent, ces mutants peuvent activer la voie de signalisation en aval sous forme de monomères (Haling et al., 2014; Yao et al., 2015).

I.4-Les kinases MEK1/2 :

MEK1/2 sont des protéines kinases à double spécificité capables de phosphoryler les résidus thréonines et tyrosines activateurs de ERK1 et ERK2 (Cowley et al., 1994; McCubrey et al., 2007). Les protéines MEK se composent d'une séquence N-terminale trifonctionnelle, d'un domaine kinase et d'une séquence C-terminale. La partie N-terminale est constituée du « domaine D » qui interagit avec ERK1/2, la séquence d'exportation du noyau (NES), et un segment inhibiteur (Fischmann et al., 2009; Wu and Park, 2015). Alors que le rôle des résidus C-terminaux est moins connu, il affecte la localisation cytoplasmique de MEK1 (Wu and Park, 2015). La structure tertiaire de MEK1/2 se compose de deux lobes de tailles inégales : un petit lobe N-terminal et un grand lobe C-terminal contenant plusieurs hélices α et brins β qui sont des structures conservées dans la plupart des protéines kinases (Taylor and Kornev, 2011). Le site catalytique de MEK1/2 se situe au niveau de la jonction de ces deux lobes et s'ouvre et se referme pendant le cycle catalytique. Alors que la forme ouverte permet l'accès à l'ATP et la libération d'ADP, la forme fermée permet l'alignement de résidus clés dans des positions catalytiquement actives. La dynamique des mouvements des deux lobes est provoquée par des changements conformationnels au niveau de résidus conservés dans la boucle d'activation du lobe C-terminal, induit par la phosphorylation des kinases RAF sur les résidus S218/222 et S222/226 respectivement pour MEK1 et MEK2 (Alessi et al., 1994).

Les protéines MEK1/2 possèdent une spécificité de substrat très restreinte et la quasi-totalité de leurs activités est tournée vers ERK1/2 (Seger et al., 1992). Cependant, d'autres substrats tels que MyoD, β -arrestine 2 ou CRAF ont également été signalés comme substrats de MEK (Cassier et al., 2017; Hu et al., 2013; Jo et al., 2011). Bien qu'ils partagent les mêmes substrats,

leurs rôles biologiques semblent être différents. En effet, l'ablation constitutive de MEK1 chez la souris (*mek1^{-/-}*) est létale au stade embryonnaire E10.5, due à un défaut placentaire (Giroux et al., 1999), tandis que le KO constitutif de MEK2 est viable et fertile (*mek2^{-/-}*) (Bélanger et al., 2003). Cela suggère que la perte de MEK2 au cours du développement pourrait être compensée par MEK1. De plus, la formation d'hétérodimères de MEK au cours du développement semble importante puisque 85% de souris hétérozygotes pour *mek1* et *mek2* (*mek1^{-/+} ; mek2^{-/+}*) meurent avant la naissance (Bélanger et al., 2003).

Les mutations activatrices de MEK agissent comme de véritables oncogènes dans un nombre limité de cancers (Forbes et al., 2015). Seul un petit ensemble de mutations a été identifié dont Gln56-MEK1 et Lys57-MEK1 dans le cancer du poumon (Arcila et al., 2015; Marks et al., 2008) et Asp67Asn-MEK1 dans le cancer de l'ovaire (Estep et al., 2007). De plus, dans des lignées cellulaires l'expression de mutants constitutivement actifs est suffisante pour induire une transformation oncogénique de cellules normales (Cowley et al., 1994; Mansour et al., 1994).

I.5-Les kinases ERK1/2 :

Les protéines ERK1 et ERK2 (Extracellular signal Regulated protein Kinases) sont des sérine/thréonine kinases de la superfamille des MAPK activées en réponse à la phosphorylation des kinases MEK1/2 (Seger et al., 1992). Comme les protéines MEK, ERK1/2 possèdent un domaine kinase composé d'un lobe N-terminal contenant la boucle de fixation de l'ATP et d'un lobe C-terminal contenant le segment d'activation composé des résidus phosphorylables nécessaires pour la liaison au substrat et pour l'activation de la protéine (Barbosa et al., 2021; Roskoski, 2019). Le site catalytique est situé à la jonction entre le lobe-N et le lobe-C et est responsable de la conformation active ou inactive de la protéine par articulation des deux lobes l'un par rapport à l'autre (Barbosa et al., 2021; Roskoski, 2019).

L'activation des protéines ERK1/2 survient après la phosphorylation des résidus thréonines et tyrosines localisés dans la boucle d'activation (T202/Y204 et T182/Y182 respectivement pour ERK1 et ERK2) (Payne et al., 1991). Cette activation a lieu au niveau du cytoplasme et induit la translocation vers le noyau des kinases ERK1/2. Les protéines ERK1/2 ne contiennent pas de NLS dans leur séquence, cette translocation est due à l'interaction de ERK avec des protéines d'ancrage cytosoliques (Rubinfeld et al., 1999). La phosphorylation du motif SPS facilite la liaison de l'importine 7 (Imp7) qui assure le transport de ERK vers le noyau via les pores

nucléaires (Flores and Seger, 2013). Une fois dans le noyau, la dissociation ERK/Imp7 est assurée par de petites GTPases Ran, entraînant le retour de Imp7 dans le cytoplasme.

Une fois dans le noyau, ERK1/2 régule l'activité de divers facteurs de transcription par phosphorylation (Ünal et al., 2017) comme les proto-oncogènes *c-Fos*, *c-Jun* et *c-Myc*, la protéine contenant le domaine ETS Elk-1, et le facteur de transcription cyclique AMP-dépendant ATF2. L'activation de ces facteurs de transcription induit l'expression des gènes permettant la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la transcription cellulaire. Les composants du cytosquelette, tels que les protéines associées aux microtubules (MAP) 1, MAP2 et MAP4, sont phosphorylés dans le cytoplasme pour participer à la régulation de la morphologie cellulaire et à la redistribution du cytosquelette. ERK1/2 cytoplasmique peut aussi phosphoryler une série d'autres protéines kinases en amont de la voie ERK telles que SOS, BRAF et MEK induisant un rétrocontrôle négatif sur la voie (Guo et al., 2020).

L'activation de ERK1/2 n'est pas seulement impliquée dans la régulation des fonctions biologiques, elle est également liée à la formation de tumeurs. Une expression élevée, ainsi qu'une amplification de ERK a été détectée dans diverses tumeurs humaines (le cancer de l'ovaire, du côlon, du sein et du poumon) (Bang et al., 1998; Bhartiya and Singh, 2015; Campbell et al., 2016; Rao and Herr, 2017; Tang et al., 2017). Comme souligné précédemment, de nombreux acteurs de la voie en amont de ERK sont mutés entraînant une activation constitutive de la voie. L'activation continue de la voie de signalisation ERK-MAPK peut favoriser la transformation de cellules normales en cellules tumorales, à l'inverse, son inhibition peut restaurer les cellules tumorales à un état non transformé *in vitro* et inhiber la croissance tumorale *in vivo* (Sebolt-Leopold et al., 1999). C'est dans ce contexte que le développement d'inhibiteurs ciblant des protéines en amont de ERK a pris tout son sens.

I.6-Régulation de la voie ERK-MAPK par ERK :

La voie des MAPK est finement régulée, notamment par un rétrocontrôle négatif exercé par ERK. Cette boucle de rétrocontrôle négative se répartit en deux catégories principales : les modifications post-traductionnelles directes des composants de la voie et l'induction de la synthèse *de novo* de gènes inhibiteurs spécifiques de la voie. La principale différence entre ces deux mécanismes est le temps nécessaire pour qu'ils prennent effets. Alors que les modifications post-traductionnelles directes sont quasiment instantanées, l'expression des gènes *de novo* et la synthèse des protéines prennent plus de temps (Lake et al., 2016).

Presque tous les composants de la cascade ERK1/2 MAPK sont régulés par un rétrocontrôle négatif par phosphorylation. Les protéines ERK1/2 sont capables de phosphoryler directement plusieurs récepteurs à tyrosine kinases. Par exemple, après stimulation par l'EGF ou le TNF α , ERK1/2 peuvent phosphoryler le récepteur à l'EGF sur son site de phosphorylation principale Thr699 (Takishima et al., 1991). Cette phosphorylation dépendante de l'activité ERK1/2 conduit à une réduction du niveau de phosphorylation de la tyrosine constitutive de l'EGFR (Sato et al., 2013). Cependant, bien que la phosphorylation dépendante de ERK1/2 sur la Thr699 réduise la phosphorylation de la tyrosine et l'activité du récepteur à l'EGF, elle inhibe également la régulation négative du récepteur agissant ainsi comme un régulateur positif de signalisation (Li et al., 2008). L'activité ERK1/2 peut également activer la tyrosine phosphatase CDC25 qui à son tour entraîne la déphosphorylation de l'EGFR sur la Tyr1068, nécessaire pour son activation (Prahallad et al., 2012).

ERK1/2 exerce aussi un rétrocontrôle sur les protéines RAS, puisque la suppression de MEK1/2 et ERK1/2 conduit à une augmentation de l'activité de RAS (Hennig et al., 2016). Les protéines adaptatrices SOS qui connectent les RTK lorsqu'elles sont activées, aux protéines RAS seraient en partie impliquées dans cette boucle de rétrocontrôle négatif. En effet, la phosphorylation de la protéine SOS1 par ERK2 (Corbalan-Garcia et al., 1996; Ueki et al., 1994), perturbe son association avec les protéines adaptatrices Grb2 et par conséquent l'activation des protéines RAS (Boykevisch et al., 2006; Langlois et al., 1995; Saha et al., 2012). La neurofibromine échangeuse de guanine de RAS semble être elle aussi impliquée dans ce mécanisme puisque son inhibition conduit à une augmentation de la phosphorylation de ERK et à une diminution de l'activité de RAS (Hennig et al., 2016; Nissan et al., 2014). De plus l'inhibition de la phosphorylation des protéines ERK1/2 via l'utilisation d'inhibiteurs de MEK conduit à une augmentation d'expression des protéines RAS (Ambrosini et al., 2014; Wang et al., 2005).

Les protéines RAF sont elles aussi soumises à un rétrocontrôle négatif par ERK1/2. La surexpression de ERK1 conduit à un retardement de l'hyperphosphorylation de CRAF (Wartmann et al., 1997). De plus, l'hyperphosphorylation de CRAF est dépendante de l'activité de MEK1/2 (Wartmann et al., 1997) et l'inhibition de ERK1/2 entraîne une augmentation de l'activité de CRAF (Alessi et al., 1995; Weiss et al., 1998). *In vitro* ERK2 est capable de phosphoryler cinq sites sur CRAF et leur phosphorylation dépend de la signalisation en aval de MEK1/2. La phosphorylation de ces sites empêche l'activation de la protéine CRAF ainsi que

sa localisation à la membrane plasmique et donc son engagement avec RAS activé (Dougherty et al., 2005; Müller and Morrison, 2002). Ce mécanisme de rétrocontrôle a également été identifié pour la protéine BRAF, où il a été découvert quatre sites de phosphorylation dont un situé dans une séquence et une position similaire à celle de CRAF (Ser642) (Dougherty et al., 2005; Ritt et al., 2010). L'analyse mutationnelle a suggéré que la phosphorylation par ERK1/2 des quatre sites de BRAF contribue à la perturbation de sa dimérisation avec CRAF et à l'inhibition de son interaction avec la protéine RAS activée (Ritt et al., 2010).

II-Les inhibiteurs de la voie des RAS-MAPK :

Une dérégulation ou le plus souvent une suractivation de la voie RAS-MAPK se produit dans de nombreux cancers, entraînant une régulation négative des gènes antiprolifératifs et une croissance cellulaire non inhibée. Les mutations responsables de la régulation positive de cette voie de signalisation se produisent en amont de ERK, impliquant généralement les protéines RAS et RAF. De ce fait, plusieurs molécules capables d'inhiber cette voie ont été découvertes et ont bouleversé la prise en charge des patients.

II.1-Inhibiteurs de RAS :

Comme souligné précédemment, des mutations dans les gènes RAS surviennent fréquemment dans les tumeurs malignes. En effet environ 20% de toutes les tumeurs présentent une mutation dans au moins une isoforme (Prior et al., 2020). Deux types d'approches ont été développées afin de cibler les oncogènes RAS : des approches indirectes en ciblant les modifications post-traductionnelles de RAS, et des approches directes avec la découverte d'un inhibiteur ciblant la protéine mutante KRAS G12C.

II.1.1-Inhibiteurs indirects :

Les premières tentatives pour développer des inhibiteurs directs des protéines RAS ont échoué en raison de l'affinité de l'ordre du pico molaire de RAS pour le GTP et de l'absence de poches hydrophobes appropriées qui pourraient permettre une liaison de haute affinité avec des petites molécules (Wang et al., 2012). Dans les années 90, une approche indirecte a été adoptée et les efforts se sont concentrés sur le développement d'inhibiteurs ciblant le traitement post-traductionnel de RAS. Plusieurs inhibiteurs de la farsényl transférase (FTI) ont été développés et ont montré des résultats précliniques *in vivo* prometteurs contre les modèles de cancer induits par HRAS (Kohl et al., 1995). Cependant, KRAS et NRAS peuvent contourner la prénylation de la cystéine du motif CAAX via la géranylgéranylation (une autre forme de prénylation) (Whyte et al., 1997), rendant ces inhibiteurs inefficaces dans les cancers mutés pour KRAS et NRAS. Toutefois à la suite d'un essai clinique de phase II, le tipifarnib a été désigné comme une thérapie révolutionnaire (Breakthrough Therapy Designation : BTD) par la FDA pour le traitement des patients HRAS mutés en récurrence ou atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou à un stade métastatique (Ho et al., 2021).

Des inhibiteurs doubles de la farnésyltransférase et de la géranylgeranyltransférase I ont également été développés. Cependant, ces inhibiteurs étaient soit toxiques ou manquaient d'efficacité pour l'inhibition de la prénylation de KRAS (Lobell et al., 2002; Sebti and Hamilton, 2000). En parallèle, les efforts visant à inhiber les modifications post-traductionnelles de KRAS se sont déplacés vers les enzymes en aval RCE1 et ICMT (Marín-Ramos et al., 2019; Mohammed et al., 2016). La protéine NRAS semble dépendre fortement de l'activité de la protéine ICMT, suggérant que ces inhibiteurs pourrait-être une bonne stratégie thérapeutique pour les tumeurs induites par NRAS (Ahearn et al., 2021).

II.1.1-Inhibiteurs de KRAS G12C :

En 2013, un criblage de 480 composés basé sur une approche « tethering », (technique permettant de découvrir des ligands se liant faiblement à un site ciblé sur les protéines via une attache intermédiaire disulfure) (Erlanson et al., 2000) a permis la découverte de petites molécules capables de se lier de manière irréversible au mutant oncogénique KRAS G12C (Ostrem et al., 2013). La liaison avec l'inhibiteur se produit lorsque la protéine est sous la forme inactive, liée au GDP. Lorsque la protéine est sous sa forme active, la poche est encombrée empêchant la liaison avec le GTP. La liaison de la protéine KRAS G12C au composé altère sa fonction ; les affinités nucléotidiques sont modifiées, induisant une préférence pour le GDP par rapport au GTP et l'échange de nucléotides catalysés par SOS est bloqué, piégeant la protéine sous sa forme inactive, altérant son interaction avec ses effecteurs (Lito et al., 2016; Patricelli et al., 2016).

En continuant d'exploiter cette partie de la protéine, pour la liaison d'inhibiteurs, le composé ARS-853 a été développé (Patricelli et al., 2016). Une modélisation de la dose réponse en fonction du temps de l'engagement de KRAS avec l'ARS-853 a suggéré que KRAS G12C passait rapidement de l'état lié au GTP et au GDP, conformément aux travaux antérieurs montrant un taux d'hydrolyse intrinsèque plus rapide que les autres mutants (Hunter et al., 2015). Le traitement de lignées cellulaires mutantes KRAS G12C avec cet inhibiteur entraîne une inhibition de la voie en aval de KRAS. Cependant, une hétérogénéité dans l'efficacité et dans la durabilité de l'effet entre les différentes lignées cellulaires est observée, suggérant que d'autres facteurs au-delà de la mutation KRAS G12C peuvent modifier la sensibilité. Concernant la viabilité, certaines lignées étaient insensibles au composé, et ces mêmes lignées ont montré un manque de réponse lors de l'ablation génétique de KRAS, suggérant une

indépendance vis-à-vis de KRAS malgré la mutation G12C. En culture 3D, toutes les lignées ont montré une inhibition robuste de la prolifération après traitement, démontrant une dépendance hétérogène pour KRAS avec une sensibilité accrue à l'inhibition de KRAS en culture 3D en comparaison à la culture 2D (Patricelli et al., 2016). L'ARS-1620 a succédé à l'ARS-853, cette fois encore, la sensibilité varie entre la culture 2D et 3D, cependant, ce composé est très efficace *in vivo* en tant qu'agent unique dans plusieurs modèles de xénogreffes de souris dérivées de lignées cellulaires et de patients (Janes et al., 2018).

Ensuite, d'autres composés tels que le AMG-510 (sotorasib/lumakras) et MRTX849 (adagrasib) ont été développés et montrent une activité *in vivo* contre KRAS G12C. Le traitement *in vitro* avec l'AMG-510 entraîne une inhibition de la phosphorylation de ERK (pERK) dans les cellules mutantes KRAS G12C (Canon et al., 2019). Là encore, la réponse est hétérogène entre les lignées cellulaires testées. Le MRTX849 a également été capable d'inhiber la fonction RAS *in vitro* ainsi que la viabilité des cellules mutantes G12C (Hallin et al., 2020). De plus, *in vivo* des régressions tumorales ont été observées avec ces deux inhibiteurs, de façon dose dépendante, avec une proportion accrue de régressions complètes à une dose élevée, probablement en corrélation avec le degré d'inhibition de pERK (Canon et al., 2019; Hallin et al., 2020).

A la suite de ces résultats précliniques prometteurs, différents essais cliniques de phase I/II et de phase III, chez des patients atteints de cancers à des stades avancés ou métastatiques mutés KRAS G12C ont été lancés. Bien que ces essais cliniques soient toujours en cours, les premiers résultats ont été publiés. L'essai clinique CodeBreak 100 est une étude de phase I/II évaluant les propriétés pharmacologiques (tolérance, PK, efficacité) de l'AMG510 sur des patients atteints de tumeurs solides à des stades avancés et mutés KRAS G12C. L'AMG510 montre une activité anticancéreuse encourageante sur des tumeurs solides avancées et particulièrement sur un sous-groupe de patients atteints de CPNPC (Hong et al., 2020; Skoulidis et al., 2021). Dans la cohorte CPNPC de la phase II de cet essai, une réponse objective a été observée chez 37,1% des patients. A la suite de ces résultats prometteurs, l'AMG510 a été approuvé par la FDA en mai 2021, pour le traitement des patients atteints d'un CPNPC avancé mutant KRAS G12C*.

* <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=214665>

Des essais de phase III sont toujours en cours afin de comparer l'AMG510 en monothérapie avec le docetaxel (inhibiteur des microtubules) chez des patients atteints d'un CPNPC de stades avancés mutés KRAS G12C (NCT04303780), ainsi qu'en combinaison (NCT04185883) afin d'identifier les patients pouvant bénéficier de l'AMG510 dans le cadre d'un traitement de première ligne. D'autres inhibiteurs sont également en phase de test précoce, le GDC-6036 (NCT04449874), le D1553 (NCT04585035) et le JDQ443 (NCT04699188).

Cependant, l'étude des résistances après traitements avec le MRTX849 met en évidence une résistance acquise entraînant la réactivation de la voie RAS-MAPK via l'activation d'une autre isoforme RAS (*NRAS*), d'autres mutations activatrices de *KRAS* (G13D, G13V), ainsi qu'une nouvelle altération secondaire de *KRAS* (Y96D), qui modifie la liaison de l'inhibiteur (Moore and Malek, 2021; Pinnelli and Trusolino, 2021; Tanaka et al., 2021).

Bien que le développement d'inhibiteurs de KRAS G12C soit une grande avancée pour le traitement des patients porteurs de cette mutation, il reste nécessaire de cibler les autres mutations KRAS. Cependant, il faut envisager d'autres approches, puisque les autres mutations KRAS ne possèdent pas de cystéine réactive permettant la liaison covalente de l'inhibiteur. Deux inhibiteurs de KRAS G12D ont été découverts : le MRTX1133 un inhibiteur sélectif de KRAS G12D capable de cibler la protéine dans son état actif et inactif (Xie et al., 2021) ainsi qu'un peptide cyclique bloquant KRAS G12D lorsqu'il est lié au GTP (Zhang et al., 2020b). D'autres inhibiteurs de KRAS capables de cibler les mutants G12D et G12V, ainsi que des inhibiteurs sélectifs de KRAS G12D et G13C sont aussi en cours de développement (Nichols et al., 2021)

En raison des difficultés rencontrées lors du ciblage direct de RAS ou de ses modifications post-traductionnelles, les stratégies les plus couramment utilisées ont d'abord été de cibler la signalisation effectrice de RAS, avec le développement d'inhibiteurs de RAF et de MEK.

II.2-RAF inhibiteurs :

Le vémurafénib et le dabrafénib sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP, et sont les premiers inhibiteurs à avoir été approuvés dans les mélanomes possédant des mutations V600E avec une régression tumorale pour plus de 90% des patients (Chapman et al., 2011; Hauschild et al., 2012). Malheureusement, malgré des réponses initiales impressionnantes dans les mélanomes BRAF-V600E, la majorité des patients rechutent sous 12 mois, en développant des

résistances et des tumeurs malignes secondaires (tumeurs épithéliales bénignes ou malignes) dont beaucoup possèdent des mutations de RAS activatrices (Su et al., 2012). Ces inhibiteurs peuvent avoir des fonctions opposées (d'inhibiteur ou d'activateur de la voie de signalisation) en fonction du contexte cellulaire. Il a été observé, dans des cellules du mélanome mutées V600E, que ces inhibiteurs entraînaient un blocage de l'activation de ERK, tandis que dans des cellules RAS mutées ils entraînaient son activation (Gibney et al., 2013). En effet, lorsque les cellules sont mutées BRAF V600E, la voie est sensibilisée aux inhibiteurs compétitifs de l'ATP de RAF, mais lorsque les cellules sont BRAF sauvages, les inhibiteurs favorisent la formation d'hétérodimères BRAF/CRAF conduisant à une prolifération accrue (Hatzivassiliou et al., 2010; Heidorn et al., 2010) (**Fig. 18**). Sur la base de ces observations, la liaison des inhibiteurs déstabilise les interactions auto-inhibitrices de RAF, favorisant son interaction avec RAS (Karoulia et al., 2016). Par conséquent, ces inhibiteurs, ne sont pas efficaces contre les tumeurs où RAF est actif sous forme de dimères.

Le défi pour les inhibiteurs de RAF de nouvelle génération est donc de surmonter les problèmes liés à la dimérisation de RAF et d'empêcher ainsi l'activation de ERK. De ce fait, les nouvelles classes d'inhibiteurs de RAF, décrites comme des inhibiteurs de dimères, comme le LY3009120 ou le MLN2480/TAK-580, sont capables de se lier et d'inhiber à la fois les monomères et les dimères des mutants de RAF (Karoulia et al., 2016; Yao et al., 2015). Le LY3009120 caractérisé comme ayant une activité pan-RAF possède une affinité comparable pour les 3 membres des kinases RAF (Peng et al., 2015). Cet inhibiteur est capable de se fixer sur les deux sites de fixation de l'ATP du dimère de RAF, permettant ainsi de bloquer l'activité kinase du dimère. Dans des lignées du mélanome, du cancer colorectal et du CPNPC, LY3009120 s'est avéré inhiber l'activation de MEK induite par les mutants RAS, les monomères BRAF V600, ou les dimères BRAF non V600E (Miyachi et al., 2020; Peng et al., 2015; Vakana et al., 2017). De même, le MLN2480/TAK-580, se lie avec une affinité égale aux monomères et dimères de RAF, et inhibe la signalisation ERK médiée par les dimères BRAF non V600. *In vivo*, MLN2480/TAK-580 présente une bonne pénétrance cérébrale et tumorale, une propriété nécessaire pour supprimer l'activité des protéines de fusion KIAA1549:B-Raf que retrouvées dans 75% des astrocytomes pédiatriques de bas grade (Sun et al., 2017). Les inhibiteurs CCT196969 et CCT241161 se distinguent des autres drogues pan-Raf puisqu'ils possèdent également une activité contre la famille des kinases Src (SFK : Src Family Kinase) (Girotti et al., 2015). De nombreuses tumeurs présentent des niveaux accrus de Src actif après traitement au vémurafénib et la réactivation de ERK dans les cellules résistantes est souvent

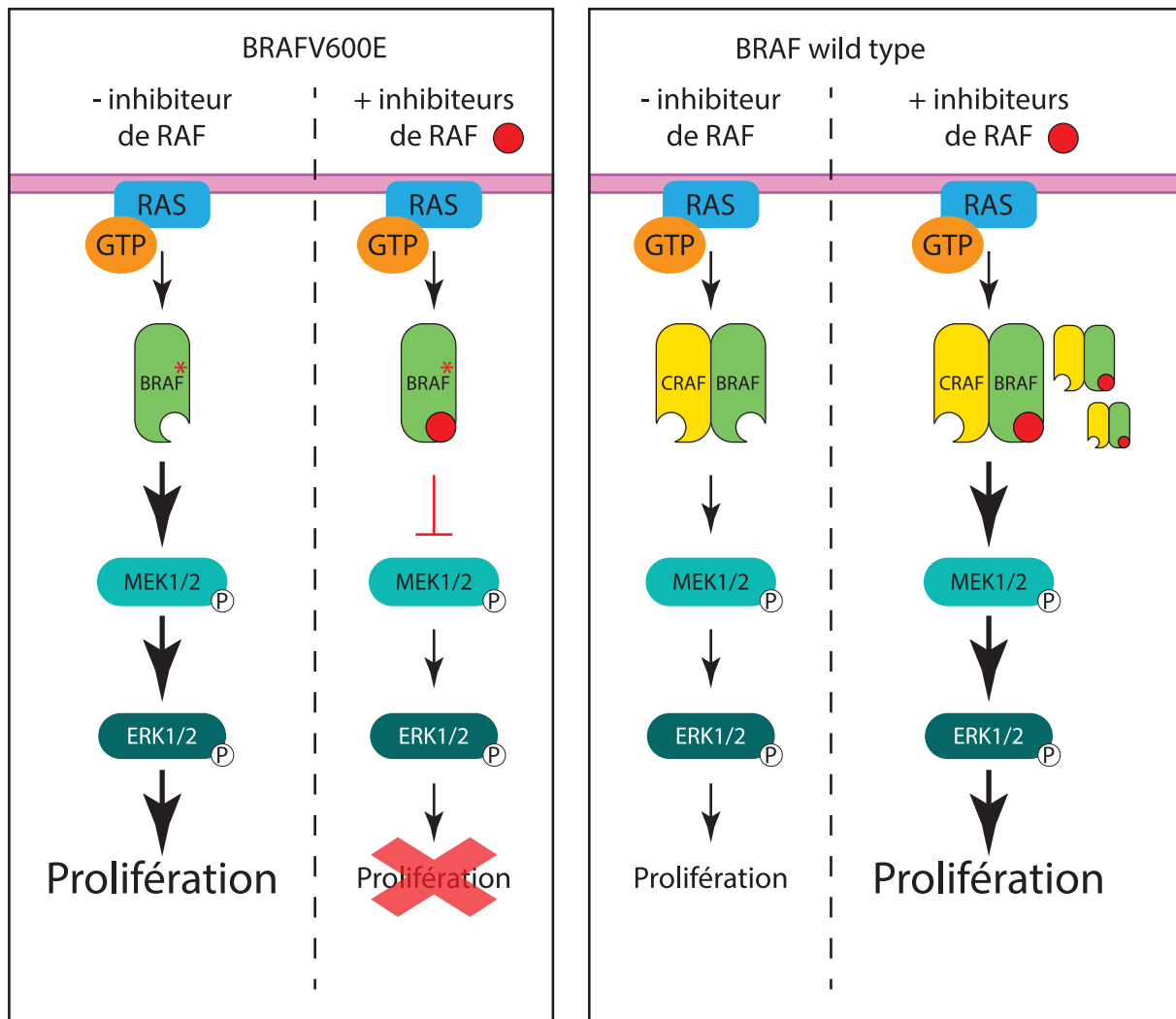


Figure 18 : Mécanisme d'action des inhibiteurs de RAF dans un fond génétique BRAFV600E versus BRAF sauvage.

Les mutations BRAF V600 permettent à la protéine BRAF d'adopter une conformation de kinase active en l'absence de dimérisation, ces mutants peuvent alors activer la voie de signalisation en aval sous forme de monomère. Dans les cellules BRAFV600E, la voie est sensibilisée aux inhibiteurs de RAF (rond rouge) compétitifs de l'ATP, conduisant à une inhibition de la voie de signalisation. Cependant, lorsque les cellules sont BRAF sauvages, les inhibiteurs favorisent la formation d'hétérodimères BRAF/CRAF conduisant à une prolifération accrue. (Adapté de (Hatzivassiliou et al., 2010)).

médiée par la voie de signalisation RTK/SFK. Ces inhibiteurs ont donc été suggérés comme thérapie de deuxième intention dans le traitement des mélanomes résistants au vémurafénib.

Une autre approche pour surmonter le dilemme du dimère RAF comprend l'identification de composants n'ayant pas la capacité de promouvoir la dimérisation de RAF en présence de RAS activé. Le PLX7904 a été développé à partir de la structure du vémurafénib mais contrairement à celui-ci, ne favorise pas l'activation de ERK dans les cellules mutantes pour RAS (Zhang et al., 2015). Des études examinant l'efficacité d'un autre inhibiteur le PLX8394 dans les adénocarcinomes pulmonaires, où 40% des tumeurs mutantes BRAF sont non V600, ont révélé qu'il pouvait inhiber la signalisation induite par les mutations BRAF V600 et non V600 (Okimoto et al., 2016). En effet, il est capable d'inhiber les dimères de BRAF, les homodimères BRAF, ainsi que les hétérodimères BRAF-CRAF (Yao et al., 2019).

II.3-Inhibiteurs de MEK :

II.3.1-Inhibiteurs de MEK de 1^{ère} génération :

Alors que les kinases RAS et RAF, en amont de MEK et ERK, sont fréquemment mutées dans les cancers, les mutations dans MEK et ERK sont moins fréquentes. Cependant malgré la rareté des mutations MEK et ERK, les inhibiteurs ciblant ces effecteurs en aval présentent un intérêt croissant en raison des résistances acquises aux thérapies par inhibiteur de RAF et de la dépendance de plusieurs types de tumeurs à la voie MAPK.

Le premier inhibiteur synthétique de l'activité kinase MEK1 et MEK2, le PD98059 a été découvert en 1995 (Dudley et al., 1995), suivi par U0-126 (Favata et al., 1998). Des expériences de cinétique ont démontré que les deux molécules partageaient un site de liaison commun et inhibaient MEK1/2 de manière non compétitive (ou allostérique, c'est à dire se liant de manière réversible ailleurs qu'au site actif de l'enzyme) par rapport à leur substrat Mg-ATP. Ces premiers inhibiteurs de MEK (MEKi) ont servi d'outils de recherche précieux, mais leur faible puissance, leurs propriétés physiques et certains de leur effets hors cibles (Kamakura et al., 1999; Wauson et al., 2013) ont stimulé le développement d'autres MEKi (Caunt et al., 2015).

Le PD184352 (CI-1040) a été identifié en 1999 comme un inhibiteur allostérique puissant et hautement sélectif, non compétitif pour l'ATP et ERK1/2. Il a aussi été le premier MEKi à être évalué *in vivo* et a montré jusqu'à 80% d'inhibition chez des souris atteintes de carcinome du

côlon (Sebolt-Leopold et al., 1999). Une analyse cristallographique de la structure de MEK1 liée à des analogues du PD184352 démontre la présence d'une poche de liaison à l'inhibiteur unique qui est séparée, mais adjacente, au site de liaison à l'ATP dans MEK1/2 (Ohren et al., 2004), cette région présente peu d'homologie avec les autres protéines kinases expliquant la spécificité de ces molécules à l'exception de MEK5 (Ohren et al., 2004). L'occupation de cette poche par les inhibiteurs allostériques de MEK, comme le PD184352, stabilisent MEK1/2 dans une conformation inactive entraînant le désalignement des résidus catalytiques et une occlusion partielle du site de liaison de la boucle d'activation ERK1/2 (Fischmann et al., 2009; Ohren et al., 2004; Yeh et al., 2007). Un essai clinique de phase I, a permis à la fois d'établir l'innocuité de l'inhibition intermittente et prolongée du PD184352, et d'identifier une dose orale appropriée de 800mg administrée en continu avec prise alimentaire (LoRusso et al., 2005). Lors d'une analyse multicentrique de phase II chez des patients de stades avancés de cancer du sein, du colon, pancréatique et du CPNPC, son activité antitumorale a été jugée insuffisante pour justifier un développement ultérieur dans le type de tumeurs testé (Rinehart et al., 2004).

II.3.2-Inhibiteurs de MEK de 2nde génération :

Le PD0325901, analogue du PD184352 est un MEKi de seconde génération, c'est un inhibiteur allostérique hautement sélectif qui n'entre pas en compétition avec l'ATP ou ERK1/2, et son interaction avec MEK1/2 ne perturbe pas le site de liaison à l'ATP (Barrett et al., 2008). Le PD0325901 présente non seulement une IC-50 faible (1nM) pour l'activité de MEK1/2, ainsi qu'une biodisponibilité orale et une stabilité métabolique considérablement améliorée par rapport à son analogue le PD184352. L'utilisation de cet inhibiteur sur des xénogreffes mutantes BRAFV600E a abrogé la croissance tumorale, cependant il n'a montré que des effets partiels sur les xénogreffes tumorales mutantes RAS (Solit et al., 2006). En effet, le PD0325901 entraîne un relâchement de la rétro-inhibition médiée par ERK1/2 sur C-RAF, entraînant une augmentation de l'activité de C-RAF dans les cellules KRAS mutantes augmentant l'interaction entre RAS et MEK dans des cellules tumorales (Lito et al., 2014). Ces résultats expliquent donc en partie le peu d'efficacité de cet inhibiteur sur des tumeurs mutées RAS. Cet inhibiteur a été testé dans différents essais cliniques de phase I et II, aucune réponse objective n'a été observée lorsqu'il a été administré seul chez des patients atteints de cancer à des stades avancés (Haura et al., 2010; LoRusso et al., 2010). Récemment, un essai de phase I chez des patients atteints d'un cancer colorectal, pancréatique ou de CPNPC mutés KRAS a testé

l'association du PD0325901 avec le dacomitinib (un inhibiteur de l'EGFR). Bien que des signes préliminaires de réponses dans le CPNPC aient été observés, la toxicité n'a pas permis l'administration de cette combinaison en continu. Par conséquent, cette association ne peut être recommandée chez ces patients (van Geel et al., 2020).

Le selumetinib (AZD6244/ARRY-142886) est un inhibiteur allostérique non compétitif de l'ATP. Il inhibe l'activité de MEK1/2 mais pas sa phosphorylation par les protéines RAF (Yeh et al., 2007). Sa modélisation moléculaire suggère que le selumetinib se lie à un site allostérique unique dans MEK1/2, lui conférant une sélectivité élevée. En effet, même utilisé à de forte concentration (10µM) cet inhibiteur n'a aucun effet hors cible y compris MEK5 (Yeh et al., 2007). Le selumetinib inhibe fortement la phosphorylation de ERK1/2 dans les cellules tumorales mutantes RAS ou BRAF (Haass et al., 2008; Huynh et al., 2007). De plus, *in vivo* seul ou en combinaison il diminue ou arrête la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffe de cancer colorectal, hépatique, cutané, pancréatique et pulmonaire (Davies et al., 2007; Haass et al., 2008; Huynh et al., 2007). De la même manière que le PD0325901, le selumetinib augmente l'interaction de MEK1/2 avec CRAF et active MEK1/2 dans les cellules tumorales KRAS mutées (Lito et al., 2014). Bien que les essais cliniques du selumetinib dans plusieurs tumeurs malignes aient été interrompus en raison d'un manque d'efficacité, de nombreux autres essais cliniques sont toujours en cours (Markham and Keam, 2020). Cependant, aux Etats-Unis et dans l'Union Européenne, le selumetinib est approuvé pour le traitement de la neurofibromatose de type 1 (ou maladie de Von Recklinghausen), qui est une maladie orpheline génétique neuro-cutanée se manifestant par des taches sur la peau et des tumeurs situées le long des nerfs* (Dombi et al., 2016). La FDA a également accordé le statut de médicament orphelin au selumetinib pour le traitement adjuvant du cancer de la thyroïde différencié de stade III ou IV[†].

* https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/18/2050-public-summary-opinion-orphan-designation-selumetinib-treatment-neurofibromatosis-type-1_en.pdf

† <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2016/selumetinib-granted-orphan-drug-designation-in-the-US-for-adjuvant-treatment-of-differentiated-thyroid-cancer-12052016.html#!>

Le tramétinib (GSK1120212/JTP-74057/Mekinist) est un inhibiteur non compétitif de l'ATP. Il se lie à MEK1/2 de façon similaire au PD0325901, induisant une inhibition allostérique de la catalyse de MEK1/2 (Gilmartin et al., 2011). Des études sur le tramétinib, ont évalué son effet sur la prolifération de nombreuses lignées cellulaires, parmi les lignées cellulaires testées les plus sensibles sont celles présentant une mutation BRAFV600E ou des mutations activatrices KRAS ou NRAS (Gilmartin et al., 2011; Yamaguchi et al., 2011). Dans toutes les lignées cancéreuses testées, le tramétinib inhibe la double phosphorylation activatrice T202 et Y204 dépendante de MEK1/2 sur ERK1/2 (Gilmartin et al., 2011). *In vivo* cet inhibiteur entraîne une régression de la croissance tumorale sur des xénogreffes issus de cancers du côlon, du poumon, de la prostate, du pancréas, du sein, et cutanés (Gilmartin et al., 2011). Il est important de noter que contrairement au PD0325901 et au selumetinib, il n'augmente pas l'interaction entre MEK1/2 et CRAF dans les cellules tumorales mutantes KRAS (Lito et al., 2014). Par conséquent, le tramétinib est capable d'inhiber l'activité de MEK1/2 et l'activation de MEK1/2 par RAF. Ces résultats précliniques ont fourni des preuves solides que l'inhibition de MEK *in vivo* conduisait à une activité antitumorale.

Sur la base de ces résultats, un essai de phase I a été réalisé, incluant des patients atteints de différentes tumeurs solides à des stades avancés, cette étude a permis de déterminer les effets toxiques limitant la dose de tramétinib, et révèle peu d'effets toxiques de grade 3 à 4 (<8%) (Infante et al., 2012). Ces résultats ont conduit à plusieurs essais cliniques de phase II et III du tramétinib seul ou en combinaison avec d'autres agents.

Le premier essai de phase III sur le tramétinib a été un essai randomisé sur des patients atteints d'un mélanome de stade avancé avec une mutation BRAF V600 préalablement traités avec de l'interféron ou de la chimiothérapie. Le but de l'étude était de comparer les effets du tramétinib à une chimiothérapie à base de dacarbazine (un antinéoplasique) ou de paclitaxel (inhibiteur des microtubules). Le tramétinib par rapport à la chimiothérapie, améliore la médiane de survie sans progression ainsi que le taux de survie globale chez les patients atteints d'un mélanome métastatique (Flaherty et al., 2012a). Dans d'autres essais cliniques le tramétinib entraînait un taux de réponse plus élevé par rapport à d'autres MEKi comme le selumetinib (Kirkwood et al., 2012) ou le PD0325901 (LoRusso et al., 2010).

Après traitement avec un inhibiteur de BRAF, des études *in vitro* ainsi que des analyses de biopsies tumorales avant et après progression montrent une résistance à la fois dépendante et indépendante de MEK (Fedorenko et al., 2011; Johannessen et al., 2010; Montagut et al.,

2008; Nazarian et al., 2010; Villanueva et al., 2010). De plus, l'inhibition de BRAF peut conduire à une activation de ERK, mais une combinaison de l'inhibition de BRAF et de MEK retarde le développement de résistance *in vivo* (Yaktapour et al., 2014).

Dans ce contexte le tramétinib a été testé lors de plusieurs essais cliniques en combinaison avec le dabrafenib chez des patients atteints de mélanome de stades avancés et montre une amélioration de la survie sans progression par rapport à une monothérapie avec un inhibiteur de BRAF (Flaherty et al., 2012b; Long et al., 2017; Robert et al., 2014). Basé sur ces données cliniques la FDA et la EMA (European Medicines Agency) ont approuvé le tramétinib en combinaison avec le dabrafenib pour le mélanome non résecable ou métastatique chez les patients porteurs de mutations BRAF V600E ou V600K n'ayant pas reçu d'inhibiteur de BRAF au préalable*. La combinaison tramétinib/dabrafenib a aussi été approuvée par la FDA dans les cancers de la thyroïde anaplasique[†], et dans les CPNPC de stades avancés[‡] BRAF V600E.

II.4-Mécanismes de résistance non génétiques :

Malgré les avancées prometteuses dans les soins contre le cancer, la résistance thérapeutique reste un problème indomptable dans l'ambition de traiter le cancer de façon curative. En effet, la plupart des traitements thérapeutiques disponibles, même en combinaison, laissent derrière eux un réservoir de cellules cancéreuses résiduelles ou persistantes, appelées maladie résiduelle minimale (MRD : minimal residual disease). Les résistances peuvent être divisées en deux grandes catégories : intrinsèque (ou primaire) ou acquise (secondaire). La résistance intrinsèque indique qu'avant le traitement des facteurs impliqués dans la résistance préexistent dans la majeure partie des cellules tumorales, entraînant une absence de réponse et rendant la thérapie inefficace. Au contraire, une résistance acquise peut se développer pendant le traitement de tumeurs initialement sensibles et peut être causée soit par des mutations survenant pendant le traitement, soit par diverses autres réponses adaptatives,

* <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppNo=204114>.

† <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-dabrafenib-plus-trametinib-adjuvant-treatment-melanoma-braf-v600e-or-v600k-mutations>

‡ <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mekinist>

telles qu'une expression accrue de la cible thérapeutique et l'activation de voies de signalisation compensatoires alternatives (Longley and Johnston, 2005). La résistance acquise représente une récurrence locale ou à distance après une réponse clinique. De plus, les tumeurs peuvent contenir un degré élevé d'hétérogénéité moléculaire, ainsi la résistance aux drogues peut survenir par la sélection induite d'une sous population mineure résistante de cellules présentes dans la tumeur d'origine (Swanton, 2012).

L'explication la plus communément admise de la résistance est la présence d'altérations génétiques (Holohan et al., 2013). Cependant, il existe de plus en plus de preuve que la voie inévitable vers la résistance aux thérapies ne peut pas être réduite à une simple cause génétique. En effet, plusieurs découvertes semblent indiquer que les phénotypes de persistance tolérante aux drogues (DTP : Drug-Tolerant persisting Phenotype) (définis comme la capacité de survivre aux traitements médicamenteux) peuvent être acquis de manière transitoire par des mécanismes adaptatifs non génétiques.

Bien que la grande majorité des cellules d'une population de CPNPC soit rapidement tuée lors de l'exposition à un inhibiteur de l'EGFR, une accumulation rapide et transitoire de cellules viables ou résiduelles (tolérantes aux traitements) a été observée avec une cinétique et une fréquence qui ne pouvaient pas être expliquées par des mécanismes mutationnels (Sharma et al., 2010). Contrairement à la résistance aux thérapies, la tolérance s'est manifestée comme un état dans lequel les cellules tumorales pouvaient survivre de manière transitoire en absence de prolifération lors du traitement. D'autres réponses protectrices similaires ont ensuite été rapportées dans des cultures provenant d'autres types de cancer en réponse à une variété de thérapies. Par exemple, la chimiothérapie induit une transition épithélio-mésenchymateuse dans diverses tumeurs épithéliales, tels que les cancers du côlon (Dallas et al., 2009), de l'estomac (Xue et al., 2012), du poumon (Pirozzi et al., 2011) et du sein (Gupta et al., 2011). De même, il est admis que les cellules du mélanome peuvent basculer entre un état cellulaire « prolifératif » et « invasif » (Hoek and Goding, 2010), avec une résistance intrinsèque du phénotype invasif (aussi appelé différencié) pour les inhibiteurs de la voie des MAPK (Kemper et al., 2014; Shaffer et al., 2017). En effet, l'exposition du mélanome à une thérapie ciblée provoque un déplacement de l'ensemble de la population cellulaire vers l'état cellulaire indifférencié, un événement contribuant à la tolérance et/ou à la résistance aux traitements (Boshuizen et al., 2018; Rambow et al., 2018; Shaffer et al., 2017). Ce programme semble également être une caractéristique de résistance aux inhibiteurs de PD-1 (Lee et al.,

2020). Ces résultats indiquent que des réponses adaptatives non génétiques se produisent en réponse à la plupart, sinon à toutes les modalités thérapeutiques.

II.4.1-Résistance non génétique transitoire et stable :

Transitoire :

Les cellules persistantes tolérantes aux drogues sont des cellules à cycle lent avec un métabolisme cellulaire altéré. Après le retrait du traitement, ces cellules persistantes peuvent relancer la progression du cycle cellulaire et de façon étonnante, leur descendance est souvent sensible à la réexposition au traitement initial (Fallahi-Sichani et al., 2017; Flusberg et al., 2013; Meyer et al., 2020; Shaffer et al., 2017). Ces découvertes pourraient représenter le réveil d'une réponse au stress ancestrale décrite chez les procaryotes, en effet lorsque des staphylocoques naïfs à la pénicilline sont exposés pour la première fois, une petite proportion de bactéries est résistante. Cependant lorsqu'elles sont réexposées à la pénicilline, la même proportion de cellules que lors de la première exposition reste résistante à l'antibiotique (Bigger, 1944). Ces résultats reflètent les découvertes décrites récemment avec les cellules cancéreuses DTP et suggèrent que l'état des cellules cancéreuses DTP est transitoire et n'est pas héréditaire de manière stable (**Fig.19**). Cependant, bien que ces cellules persistantes tolérantes aux drogues apparaissent rapidement lors d'un défi thérapeutique, il reste difficile de savoir si ces cellules représentent un enrichissement d'un état spécifique de tolérance aux traitements amorcés ou si cela se produit par une reprogrammation active, induite thérapeutiquement et de façon non génétique. L'évolution somatique dirigée vers un phénotype avantageux peut être appelée induction « lamarckienne » : un état héréditaire « adapté » induit par un apport environnemental. L'émergence de cellules souches de la crête neurale (NCSC) tolérantes aux thérapies dans le mélanome se produit de manière transitoire par un mécanisme actif plutôt que par sélection passive (Rambow et al., 2018). Cette observation selon laquelle les cellules de mélanome exploitent un tel mécanisme a été corroborée par d'autres études (Marin-Bejar et al., 2021; Su et al., 2017; Tsoi et al., 2018). D'ailleurs, l'exposition de cellules du mélanome à des thérapies combinant un inhibiteur de MEK et de BRAF conduisant à l'émergence de NCSC s'avère être dépendante de la kinase d'adhésion focale (FAK : Focal Adhesion Kinase). Son élimination par l'inhibition de FAK dans des xénogreffes tumorales dérivées de patients retarde la rechute. Mais de façon étonnante, les tumeurs qui échappent à ce traitement présentent des altérations génétiques conférant

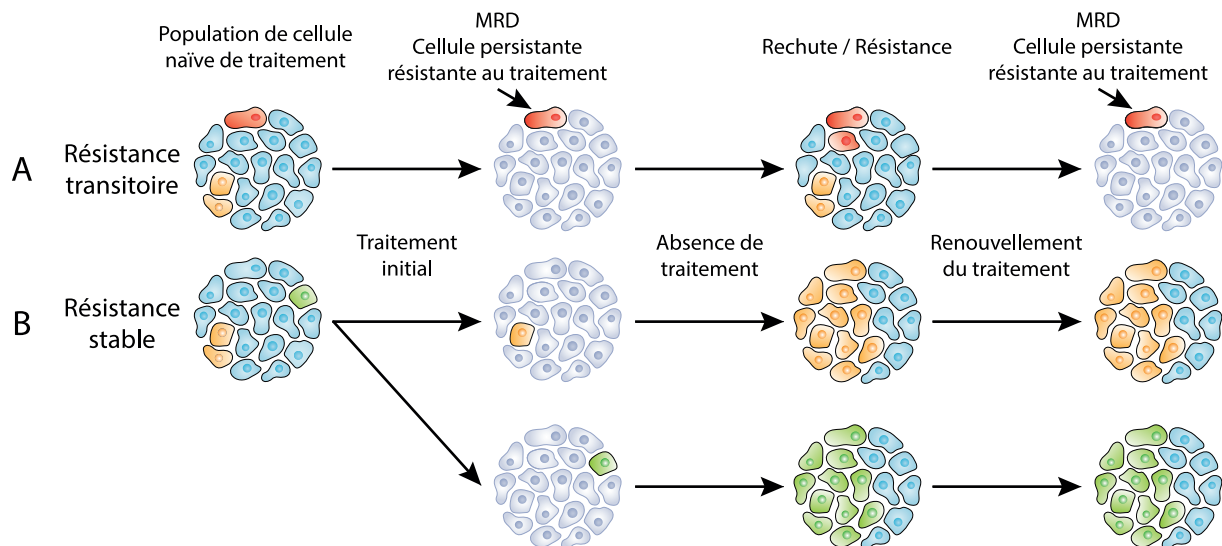


Figure 19 : Mécanisme de résistance non génétique transitoire et stable.

(A) Les cellules MRD peuvent se manifester sous la forme d'un état transitoire de cellules persistantes tolérantes aux traitements. Les cellules persistantes tolérantes aux traitements sont capables de régénérer la population de cellules tumorales, mais la plupart de la population reste sensible à la thérapie initiale.

(B) Dans le modèle de résistance non génétique stable, la population de cellules est capable de subir des processus transcriptionnels et métaboliques rapides et peut régénérer une population tumorale morphologiquement et phénotypiquement identique à la tumeur naïve de traitement ou présentant des caractéristiques phénotypiques distinctes de celles de la tumeur naïve de traitement. Dans les deux cas, la tumeur régénérée s'est adaptée au traitement initial et n'est plus sensible à la réexposition. (Adapté de (Marine et al., 2020)).

une résistance et une sensibilité accrue à l'inhibition de FAK, indiquant que le mécanisme de résistance serait dicté par la composition cellulaire de la maladie résiduelle minimale.

Stable :

Le processus d'adaptation non génétique stable est susceptible d'avoir de nombreuses voies qui aboutissent finalement à un nouvel équilibre qui n'est pas affecté par la pression thérapeutique. Cela se manifeste fréquemment par un programme transcriptionnel et une plasticité cellulaire modifiés. Ces modifications sont associées à un changement phénotypique comme l'EMT, une transdifférenciation vers une lignée différente dans le tissu cancéreux ou une dédifférenciation (Boumahdi and de Sauvage, 2020). Dans les tumeurs hématopoïétiques comme les LAM (Leucémie Aigüe Myéloïde) à la fois dans des modèles murins (Fong et al., 2015) et dans des échantillons de patients (Shlush et al., 2017), les cellules tumorales présentent une résistance thérapeutique non génétique stable avec des programmes transcriptionnels, des caractéristiques immuno-phénotypiques, et des propriétés fonctionnelles des cellules souches leucémiques. Dans ce cas, les cellules cancéreuses responsables de la rechute existaient avant le traitement, et ces cellules ne nécessitent pas de mutations codantes pour devenir stablement résistantes au traitement. Afin de déterminer si les cellules sont activées transcriptionnellement avant le traitement ou si la résistance est un processus adaptatif actif, l'analyse d'un modèle murin leucémie aigüe myéloïde a révélé une proportion de cellules présentes dans la tumeur naïve de traitement qui survivent à la thérapie initiale. Mais ces cellules sont aussi capables d'adopter un état transcriptionnel qui en plus d'être tolérant à la thérapie, accorde aux cellules la capacité de proliférer activement en présence d'une pression thérapeutique (**Fig.19**) (Bell et al., 2019). Cependant, contrairement aux cellules DTP, si ces cellules ne sont plus exposées pendant des périodes prolongées, puis retraitées, elles arrivent à conserver leur phénotype résistant malgré l'absence de nouvelles mutations codantes (Bell et al., 2019; Fong et al., 2015).

RESULTATS

ARTICLE I

Processing body dynamics drive non-genetic MEKi resistance by fine-tuning KRAS and NRAS translation

Olivia Vidal-Cruchez^{1,2}, Victoria Nicolini^{1,2}, Tifenn Rete^{1,2}, Roger Rezzonico^{2,3},

Caroline Lacoux⁴, Julien Fassy⁴, Karine Jacquet^{1,2}, Marie-Angela Domdom^{1,2},

Chloé Ventujol^{1,2}, Thierry Juhel^{1,2}, Barnabé Roméo^{1,2}, Jérémie Roux^{1,2}, Marius Ilié^{1,2,6},

Arnaud Hubstenberger⁵, Bernard Mari^{2,4}, Baharia Mograbi^{1,2,*}, Paul Hofman^{1,2,6,*},

Patrick Brest^{1,2,§}

1. Université Côte d'Azur, Institute of Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), CNRS, Inserm, Centre Antoine Lacassagne, Nice, France

2. FHU-OncoAge, Nice, France

3. Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), INSERM, CNRS, Sophia Antipolis, France

4. Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), CNRS, Sophia Antipolis, France

5. Université Côte d'Azur, Institut Biologie Valrose (IBV), CNRS, Inserm, Nice, France

6. Université Côte d'Azur, CHU-Nice, Pasteur Hospital, Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, FHU OncoAge, Hospital-Integrated Biobank (BB-0033-00025), Nice, France

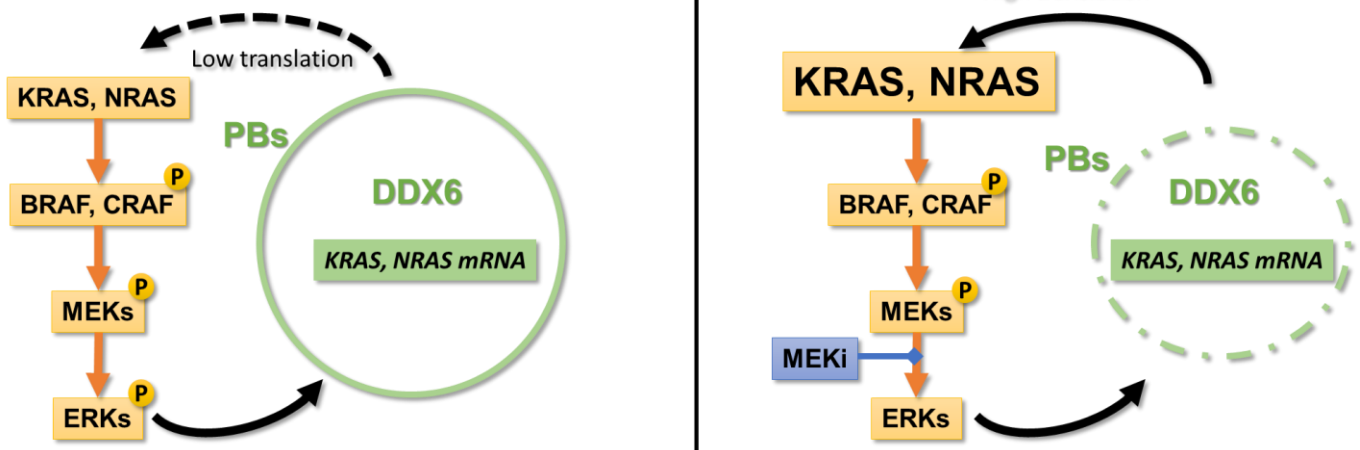
*Equal contribution

§ Corresponding author: Brest Patrick, Université Côte d'Azur, IRCAN, 28, Avenue de Valombrose, Nice, France. Patrick.BREST@univ-cotedazur.fr

Abstract

Overactivation of the MAPK pathway is a critical driver of many human cancers. However, therapies that target the MAPK pathway have only been effective in a few cancers, as cancers inevitably end up developing resistance. Puzzling observations have suggested that MAPK targeting in cancer fails because of an early KRAS or NRAS overexpression, but through unexplained mechanisms. Here, we identified a novel mechanism of drug tolerance for MEKi involving Liquid-Liquid phase separation (LLPS) and more particularly the essential processing bodies (PBs) protein DDX6. In response to MEKi, we first identified that the overexpression of KRAS and NRAS in drug persistent cells originated from an increased mRNA accumulation in heavy polysome fractions. Remarkably, the overexpression of KRAS and NRAS can compensate each other to trigger BRAF phosphorylation. This overexpression, which occurred in the absence of neo-transcription, depended on PBs dissolution as a source of mRNA reservoir. In addition, in response to MEKi removal, we showed that the process was dynamic since the PBs quickly reformed, reducing MAPK signaling. These results underline a dynamic spatiotemporal negative feedback loop of MAPK signaling via RAS mRNA sequestration and protein degradation. Furthermore, by genetic manipulation, we observed that KRAS and NRAS expressions were negatively correlated to the expression of DDX6. Altogether we describe here a new intricate mechanism involving LLPS and DDX6 in the translation regulation of essential cellular pathways that pave the way for future therapies targeting PBs to improve cancer targeted-drug therapies.

Graphical abstract



Highlights

- MEKi induce KRAS and NRAS increased translation
- KRAS and NRAS can compensate each other to activate BRAF
- MEKi-induced processing bodies (PBs) dissolution is an early response of drug tolerance
- DDX6 expression is inversely correlated with KRAS and NRAS expression

Keywords

RAS, KRAS, NRAS, MAPK, Liquid Liquid phase separation, DDX6, processing bodies, oncogene, MEKi.

Introduction

mRNAs are actively translated, repressed, stored, or degraded in response to environmental cues. These post-transcriptional pathways are critical for controlling cell fates that are altered in pathological conditions, such as cancers^{1,2}. In this regard, recent transcriptome-wide studies have revealed that most RNAs have a restricted, dynamic, and regulated subcellular localization. Of the key players of this control emerge two clusters of RNAs and associated regulatory RNA binding proteins (RBP), known as the constitutive P-bodies (PBs) and environmentally-induced stress granules^{3,4}. In contrast to organelles with a lipid bilayer membrane, membraneless structures are formed through a process known as liquid-liquid phase separation (LLPS) that confers a wide range of plasticity to these super-assemblies⁵. Sequestration of mRNAs into these ribonucleoprotein (RNP) granules is associated with translational repression, thus uncoupling mRNA expression from protein production, enabling spatiotemporal control of gene expression³. Furthermore, PBs and stress granules act as reservoirs of silent mRNAs that can be translated to adapt protein expression to the environment, providing plasticity to the genetic program^{3,5-7}. Even if this post-transcriptional control is key to cellular adaptation in changing and stressful environments¹, few studies have investigated the role of PBs in the context of cancer progression and particularly for the emergence of drug-tolerant cells.

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways represent ubiquitous signal transduction pathways that control all cell fates by phosphorylating hundreds of substrates. The RAS-RAF-MEK-ERK pathway is altered in ~40% of all human cancers, mainly due to RAS (32%) mutations and its downstream effector BRAF (~10%). KRAS is mainly found mutated in pancreatic cancer (88%), lung cancer (30%), and colorectal adenocarcinoma (50%). NRAS and BRAF are found mutated in melanoma (17% and 55% respectively), thyroid carcinoma (19% and 55% respectively), and lung cancer (1% and 5% respectively)^{8,9}. Given the importance of the RAS-RAF-MEK-ERK pathway in cancer, several MEK, BRAF, and KRAS inhibitors (MEKi, BRAFi, and KRASi respectively) were developed over the last decades. Unfortunately, these treatments are inevitably associated with drug tolerance, acquired resistance, and tumor relapse^{10,11}.

Even if a part of the resistance is directly attributable to somatic mutation acquisition, the early drug resistance arose from plastic drug-tolerant or persister cells. Among these non-genetic early resistance events, the upregulation of KRAS and NRAS proteins in response to BRAFi or MEKi was suggested as a possible contributor¹², even if the underlying mechanism

remains unknown. Employing a combination of genetic and pharmacological approaches, we demonstrate herein that PBs are associated with drug tolerance through a DDX6-dependent negative feedback loop that fine-tune KRAS and NRAS expression by controlling mRNA translation.

Results

MEKi response is associated with potent KRAS and NRAS translation.

We first confirmed the accumulation of both NRAS and KRAS in response to MEKi, PD184352 (CI-1040) and trametinib, in four different cell lines (A549, H1650, Mel501, BT549) regardless of cancer type (lung, breast, melanoma) and oncogenic drivers (KRASG12S, EGFR, BRAFV600E, PTEN respectively) (Fig.1A). These overexpressions occurred after 8h of treatment, independently of cell cycle progression (Fig.1B-C).

In keeping with this scenario, we checked that this MEKi-induced KRAS and NRAS overexpression were able to activate the downstream BRAF phosphorylation in A549 (Fig.1D). In order to understand the respective contributions of both KRAS and NRAS proteins, we used siKRAS and siNRAS, either alone or in combination. Interestingly, under these conditions, we provide the first evidence that KRAS or NRAS compensated each other to drive sustained BRAF phosphorylation in the presence of PD184352. The complete inhibition of BRAF phosphorylation was indeed almost achieved only when both siRNAs were combined (Fig.1D). Altogether, these results highlight in MEKi-tolerant cells the rapid overexpression of KRAS and NRAS that were each sufficient for downstream BRAF phosphorylation.

In this context, we investigated the potential causes of this increase in protein expression. At the transcriptional level, we showed that *KRAS* and *NRAS* mRNA levels were stable under PD184352 treatment (Fig.2A-B). Furthermore, the PD184352-increase in KRAS and NRAS protein levels was maintained in the presence of the potent transcription inhibitor Actinomycin D (Fig.2C). Taken together, these results strongly support a post-transcriptional mechanism. Using a ribosome profiling experiment, we showed that *KRAS* and *NRAS* mRNAs shifted from monosome to heavy polysome fractions in the presence of PD184352 (Fig.2D). In order to confirm the enhanced translation, we pretreated A549 cells with MG132, a proteasome inhibitor, to accumulate proteins by blocking their degradation. In PD184352 and MG132 treated cells the accumulation of KRAS was more potent than with MG132 alone, confirming an increased translation of *KRAS* mRNA in the presence of PD184352 (Suppl. Fig.1). Finally, altogether, these results suggest that the rapid PD184352-induced NRAS and KRAS overexpression relies more importantly on an increase in translation rather than transcription.

MEK inhibition is associated with PBs dissolution.

Since *KRAS* and *NRAS* mRNAs have been reported to be accumulated in p-bodies (PBs)^{3,14}, we hypothesize that *KRAS* and *NRAS* overexpression is associated the *KRAS* and *NRAS* pool of mRNA previously-stored in PBs becoming available for translation. In this context, we analyzed the number and size of cellular PBs in different cancer cell lines. Strikingly, we recapitulated a decrease in PBs size and number in response to PD184352 and trametinib in all cell type investigated (Fig.3A-F, Suppl. Fig.2). This MEKi-reduction was even more potent as early as 8h, showing a PBs dissolution kinetics resembling the time course of *KRAS* and *NRAS* overexpression (Fig.3G-H, Suppl. Fig.3). This global decrease was not associated with changes in DDX6, LSM14A levels, two proteins required for PBs formation (Fig.3I) nor with stress granules induction (Suppl. Fig.4).

Then, we explored the dynamics of the relationship between MAPK activity, PBs formation and *KRAS* expression. For this purpose, after a 24h treatment with PD184352 to dissolve PBs and induce *KRAS* and *NRAS* overexpression, the MEKi was removed, and cells were harvested at different times (Fig.4A). After PD184352 washout, strong activation of ERK was observed and maintained over 4h, together with a stable expression of both *KRAS* and *NRAS* and phosphorylation of BRAF (Fig.4B). At 8h up to 24h, a gradual decrease in *KRAS* and *NRAS* expression along with a decrease in BRAF phosphorylation were inversely correlated with an increasing number of PBs over time (Fig.4B-D, Suppl. Fig.5) suggesting stalled translation. Therefore, our results provide the first evidence that the high plasticity orchestrated by PBs help to adapt the rate of RAS translation through negative feedback loops. Secondly, we evidenced the ability of this *KRAS* and *NRAS* overexpression to trigger BRAF phosphorylation in presence of MEKi. This PBs/RAS balance distinguished the establishment of drug tolerance from the normal cancer cell growth condition.

This new notion was strengthened by the dynamics of PBs number and size in drug-tolerant A549 cells. After tumor cell treatment with PD184352 at 2.5 μ M for 8 weeks, the drugs were washed out, and the drug tolerant cells were then cultured for an additional 24h in the presence or the absence of PD184352. Figure 5 shows that after MEKi washout for 24h, ERK activation was identical to levels in normal cells. Strikingly, the PBs number and size were significantly lower than in the control condition and even in single-dose PD184352 treated cells (Fig.5, Suppl. Fig.5). Interestingly, at 10 μ M of PD184352, the *KRAS* expression was strongly induced in the resistant cells, together with a potent decrease in PBs (Fig.5, Suppl.

Fig.6). This overexpression was strong enough to maintain a residual phosphorylation of ERK that overcame MEKi inhibition. Altogether, these results point to the new notion that MEKi-induced PBs dissolution is an early event in the drug-tolerant cells and that this mechanism is built up over time as a strategy for maintaining KRAS/NRAS oncogene addiction.

DDX6 expression is inversely correlated with KRAS and NRAS expression.

A role for P-bodies in controlling RAS expression was then demonstrated by genetic manipulation of the RNA helicase DDX6, an essential PBs protein that suppresses translation, by degrading mRNAs, and controlling PBs plasticity. Overexpression of GFP-tagged DDX6 KRAS and NRAS expression, concomitantly with an increased PBs size and numbers (Fig.6A-C, Suppl. Fig.7). Of note, under these conditions, *KRAS* and *NRAS* mRNA levels were unchanged, suggesting a storage rather than a degradation process (Fig.6D-E). Inversely, silencing of DDX6 induced a complete dissolution of PBs, that was sufficient to trigger alone the overexpression of KRAS and NRAS (Fig.6F-G). All in all, these results strongly suggest a working model in which the dissolution of DDX6-dependant P-bodies plays a critical role in the mediation of MEKi-induced RAS overexpression and the establishment of MEKi drug tolerance.

Discussion

So far, most studies suggest that the acquisition of resistance to targeted therapy depends on irreversible gene mutations. However, growing evidence challenges this consensus showing that non-genetic heterogeneity actively participates in plastic drug tolerance¹⁵. Recently, new profiling techniques, like FATE-seq, have been carried out to dissect the non-genetic mechanisms of resistance¹⁶. However, it is clear that genetic and non-genetic mechanisms of resistance or drug tolerance are frequently linked and not mutually exclusive^{17,18}. Non-genetic resistance is due to the intrinsic plasticity of tumor cells, i.e., the ability to undergo transcriptional and epigenetic reprogramming in response to environmental challenges or upon therapy. In this context, current therapeutic options for BRAFV600E/K patients include MAPK pathway-targeted therapies, which show remarkable efficacy during the first months of treatment¹⁰. However, most patients treated with a combination of BRAF inhibitor (BRAFi) and MEK inhibitor (MEKi) inevitably relapse within months^{10,19}. This relapse has been highlighted by the presence of so-called persister, cancer stem, drug-tolerant or resistant cells as reported by different studies that either harbor a genetic or non-genetic program for survival^{20,21}.

Here, we focused on the early events of drug tolerance. We showed that within 8h, cells were able to set up an overexpression of KRAS and NRAS that was independent of *de novo* transcription and inhibition of protein degradation, as previously partly showed¹². Interestingly, we observed that this overexpression persisted over weeks, eventually overcoming MAPK inhibition. The drug-tolerant cells, cultured for long periods in the presence of MEKi, were associated with persistent PBs decrease even 24h following treatment washout, while the restoration of PBs to normal levels could be found in drug-tolerant cells after a short exposure to MEKi. Continuous versus intermittent BRAF and MEK inhibition in melanoma patients harboring BRAF V600E/K mutations has been tested in a randomized, open-label, phase 2 clinical trial (NCT02196181)¹⁹. In this study, continuous dosing yielded a statistically significant improvement in post-randomization progression-free survival compared with intermittent dosing, suggesting that drug-tolerant cancer cells with enhanced plasticity may grow faster after intermittent dosing than long term resistant cells. Moreover, by showing that both KRAS and NRAS are equally important for sustaining BRAF activity, we revealed a new range of possibilities to overcome MAPKi treatments like with the development of KRAS G12C inhibitors resistances in patients harboring either *KRAS* or *NRAS* mutations²².

In this paper, we also showed for the first time that both PD184352 and trametinib MEKi can dissolve PBs. The involvement of MAPK pathway is consistent with a previous study showing that MAPK3 (ERK1) was associated with PBs dissolution in the absence of DDX6 decrease in a 1,354 human genes siRNA screening²³. Here, our study highlights the fact that it is the activity of ERK rather than the level that is the key for PBs dissolution. However, since ERKs are able to phosphorylate more than 200 intracellular targets, at this stage more studies are necessary to determine whether the formation of PBs is dependent on ERK activity, either through direct targeting of PBs components or indirectly through a partner of PBs.

Finally, we showed here that DDX6 expression, a helicase associated with miRNA-dependent repression of translation and PBs storage, was negatively correlated with KRAS and NRAS expression. These results are consistent with previous studies showing an accumulation of *KRAS* and *NRAS* mRNAs in PBs^{3,14} likely dependent on several *let-7* miRNA response-elements on both 3'UTR²⁴. In addition, several features of *KRAS* and *NRAS* mRNA (i.e. the 5.3kb and 4.3kb respective length and the low-GC content in their coding region sequence 38% and 44%, respectively) may also contribute to their targeting to PBs²⁵. Of note, previous studies have shown that *KRAS* is poorly translated compared to *HRAS* due to enrichment in genomically underrepresented or rare codons^{26,27}. In our study, if the translation was indeed poor in basal conditions, we observed that either MEKi-induced dissolution or DDX6 downregulation were associated with potent translation in polysome fractions of *KRAS* and *NRAS* mRNAs and with their respective protein overexpression. These results suggest that rare codons, which are often associated with the presence of AU-rich third codon, may favor the recruitment of mRNA repressors due to low-speed translation processing that can however be overcome in specific conditions.

Collectively, these results reveal a new negative feedback loop involving PBs in the translational control of *KRAS* and *NRAS* mRNAs. The new negative feedback loop we described here under MEKi treatments, should pave the way for future studies by proposing to combine targeted therapies to avert early resistance and target drug-tolerant cells before relapse.

Material and methods

Cell culture.

The A549, H1650, Mel501, BT549 were cultured according to the recommendations of the ATCC. A549 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line, ATCC, number CCL-185) and Mel-501 (melanoma epithelial cell line), were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). BT549 (Breast epithelial cell line, ATCC, number HTB-122) was grown in DMEM supplemented with 10% FBS and non-essential amino-acid (Thermofischer). H1650 (human lung adenocarcinoma epithelial cell line, ATCC, number CRL-5908) was grown in RPMI-1640 supplemented with 10% FBS, 1mM sodium pyruvate. All the cells were maintained at 37°C in a 5% CO₂ in a humidified incubator. All cells were maintained no more than one month and were identified using STR profile (Eurofins Genomics).

DDX6 and LSM14A GFP stable cell lines.

The pPRIPu GFP-DDX6 and LSM14A plasmids used in this study were constructed as follows:

The pPRIPu CrUCCI vector²⁸ (kind gift of Dr. F Delaunay) was amplified with primer adaptors for AgeI and BamH1. pEGFP-C1_p54cp and pEGFPC3_LSM14A_1 (kind gift of Drs D. Weil and M. Kress) were digested by AgeI and BamH1 and the respective resulting fragments were inserted in pPRIPU. The integrity of the entire sequence in the latter has been confirmed by sequencing analysis. Briefly, replication-defective, self-inactivating retroviral constructs were used to establish stable A549 cell lines. Selection was performed by puromycin (10µg/ml). Then, the cells were sorted as a polyclonal population and used in the following experiments.

siRNA transient transfection.

Cells were plated at 200 000 cells/well in 6-well plates. After 24h, cells were transfected with siRNA negative Control or Silencer Pre-designed siRNA XRN1 using JetPrime (PolyPlus) according to the manufacturer's instructions as previously described²⁹. 48h after transfection, cells were lysed for RNA or protein analysis as described below.

Immunoblotting.

Immunoblotting was performed as described previously²⁹. Protein was extracted from cells using Laemmli lysis buffer (12.5mM Na₂HPO₄, 15% glycerol, 3% SDS). The protein concentration was measured with the DC Protein Assay (BIO-RAD) and 30µg – 50µg of total proteins were loaded onto 7.5% or 11% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for electrophoresis and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Millipore). After 1h of blocking with 5% bovine serum albumin or non-fat milk prepared in Phosphate-Buffered Saline (PBS)-0.1% Tween-20 buffer, the blots were incubated overnight at 4°C with antibodies (cf table). After 1h of incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:3000, Promega), protein bands were visualized using an enhanced chemiluminescence detection kit (Millipore) with the imaging system, Syngene Pxi4 (Ozyme).

Isolation of RNA and quantitative real-time RT-PCR analysis.

Total RNA extraction was performed using TRI-reagent (Sigma-Aldrich). Isolation of RNA from cultured cells was performed as described previously³⁰. The RNA concentration was measured by NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). For mRNA, the cDNA strand was synthesized from 500ng of total RNA. Quantification of *KRAS* and *NRAS* and *RPLP0* genes was measured by power-Sybr-green assays with the StepOne™ Real-time PCR System. qPCR Primers are referenced in the supplementary table.

Immunofluorescence and confocal microscopy.

Cells were grown to confluence and fixed in 4% paraformaldehyde for 20min. After fixation, cells were permeabilized with a solution containing 0.3% Triton X-100 for 5min. Then, cells were incubated with primary antibodies (listed in suppl table) overnight at 4°C in humidified chambers in a solution containing 0.03% Triton X-100, 0.2% gelatin and 1% BSA. Cells were washed and incubated with Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (1:500; Molecular Probes) for 1h at room temperature and mounted in ProLong Diamond Reagent with DAPI (Molecular Probes). Images were captured on a Zeiss LSM880 confocal microscope.

Statistical analysis.

Quantitative data were described and presented graphically as medians and interquartiles or means and standard deviations. The distribution normality was tested with the Shapiro's test and homoscedasticity with a Bartlett's test. For two categories, statistical comparisons were performed using the Student's t-test or the Mann–Whitney's test. For three and more categories, analysis of variance (ANOVA) or non-parametric data with Kruskal–Wallis (KW) was performed to test variables expressed as categories versus continuous variables. If this test was significant, we used the Tukey's test or the Nemenyi's test to compare these categories.

All statistical analyses were performed by the biostatistician using R.3.2.2 software and Prism8.0.2 program from GraphPad software. Tests of significance was two-tailed and considered significant with an alpha level of $P < 0.05$. (Graphically: * for $P < 0.05$, ** for $P < 0.01$, *** for $P < 0.001$).

Polysome gradient.

Subcellular fractionation. All steps of the subcellular fractionation were performed at 4°C. Cells (60–80x10⁶ cells) with or without treatment were trypsinized and washed twice with 15 ml of ice-cold PBS by centrifugation. Cell pellets were resuspended in 1 ml of hypotonic Buffer composed of 40mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM KCl, 3mM MgCl₂ and 0.2% Nonidet P-40 supplemented with 1mM DTT and 0,5mM PMSF. After incubation for 15min on ice, cells were lysed in a Dounce homogenizer with B pestle. The efficiency of cell lysis keeping the nuclei intact was verified by staining with trypan blue under an optical microscope. The cell lysates were spun at 900g for 5min to obtain the cytoplasm (supernatant) and nuclei (pellet) fractions.

Sucrose gradient fractionation. About 10 OD 260nm of cytosolic extracts were loaded on the top of a linear sucrose gradient (10–50%) made in Sucrose Gradient Buffer (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 12mM MgCl₂, 1mM DTT) in Ultra-Clear ultracentrifugation tubes (Beckman Coulter). The cytosolic fraction samples were fractionated by ultracentrifugation for 2h 45min at 39,000rpm at 4°C in a Beckman Optima ultracentrifuge with SW41 Ti swinging bucket rotor with the following settings: acceleration 9 and deceleration 4. Following ultracentrifugation, the sucrose gradients were fractionated using a Foxy JR fraction collector and monitoring UA-6 UV light (254-nm wavelength) absorbance detector (Teledyne ISCO), obtaining 12 to 14 fractions.

After addition of 0,5mM CaCl₂ and 0,2% SDS, the collected fractions were treated with proteinase K (50mg/ml, Sigma) for 30min at 40°C. Then 10pg of an RNA spike-in was added in each fraction to serve as an internal calibrator of RNA extraction and detection. For this, we used an in vitro transcribed RNA encoding the spike protein of SARS-CoV-2.

Total RNA was extracted by vigorous shaking with an equal volume of Tris pH 8,0 saturated phenol, chloroform, isoamyl alcohol mixture (25:24:1, v/v/v) (Sigma-Aldrich), and phase separation was performed by centrifugation at 12,000g for 15min at 4°C. The upper aqueous phase was washed once with an equal volume of chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v/v) (Sigma-Aldrich) by vigorous shaking and centrifugation at 12,000g for 15min at 4°C. The aqueous phase was transferred to a fresh tube and the RNA was precipitated overnight at -20°C by mixing with an equal volume of isopropanol, 2ml of glycoblue TM coprecipitant (Thermo Fisher Scientific) and 1/10 volume of 3M Na acetate pH 5.2. RNA was pelleted by centrifugation at 12,000g for 15min at 4°C.

Conflict of Interest

The authors declare no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work over the previous three years and no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

Acknowledgments

Our thanks to the UCA Office of International Scientific Visibility for comments on the English version of the manuscript. Authors would like to thank Dr Julien Cherfils and Ludovic Cervera (Cytomed facility), and Nadir Djerbi (PICMI) for technical help, Dr Dominique WEIL, Dr Michel Kress, and Dr Franck Delaunay for plasmid kind gifts.

Funding

Authors acknowledged from the French Government (Agence Nationale de Recherche, ANR) through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01 and IDEX UCAJedi ANR-15-IDEX-01), ANR FibromiR N° ANR-18-CE92-0009-01; "Association pour la Recherche contre le Cancer" (Canc'air GENExposomics and PJA-20191209562), Canceropole PACA; DREAL PACA, ARS PACA, Région Sud, Institut National du Cancer, INSERM cancer; Plan Cancer 2014-2019 (14APS001MCSR and 18CN045). The authors greatly acknowledge the IRCAN's Flow Cytometry Facility (CytoMed) and the IRCAN's Molecular and Cellular Core Imaging (PICMI) Facility that were supported by le FEDER, Ministère de l'Enseignement Supérieur, Conseil régional Provence Alpes-Côte d'Azur, Conseil Départemental 06, ITMO Cancer Aviesan (plan cancer), Gis Ibis, Cancéropole PACA, le CNRS and Inserm.

References

1. Anderson, P., Kedersha, N. & Ivanov, P. Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1849**, 861–870 (2015).
2. Masuda, K. & Kuwano, Y. Diverse roles of RNA-binding proteins in cancer traits and their implications in gastrointestinal cancers. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **10**, 1–18 (2019).
3. Hubstenberger, A. *et al.* P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Mol. Cell* **68**, 144–157.e5 (2017).
4. Khong, A. *et al.* The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules. *Mol. Cell* **68**, 808–820.e5 (2017).
5. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A. & Rosen, M. K. Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 285–298 (2017).
6. Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. & Parker, R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* **7**, 719–23 (2005).
7. Pitchiaya, S. *et al.* Dynamic Recruitment of Single RNAs to Processing Bodies Depends on RNA Functionality. *Mol. Cell* **74**, 1–13 (2019).
8. Prior, I. A., Hood, F. E. & Hartley, J. L. The frequency of ras mutations in cancer. *Cancer Res.* **80**, 2669–2974 (2020).
9. Anguera, G. & Majem, M. BRAF inhibitors in metastatic non-small cell lung cancer. *J. Thorac. Dis.* **10**, 589–592 (2018).
10. Aldea, M. *et al.* Overcoming resistance to tumor-targeted and immune-targeted therapies. *Cancer Discov.* **11**, 874–899 (2021).
11. Awad, M. M. *et al.* Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibition in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **384**, 2382–2393 (2021).
12. Wang, Y. *et al.* A role for K-ras in conferring resistance to the MEK inhibitor, CI-1040. *Neoplasia* **7**, 336–347 (2005).
13. Courel, M. *et al.* GC content shapes mRNA storage and decay in human cells. *Elife* **8**, 1689–1699 (2019).
14. Pillai, R. S. *et al.* Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. *Science (80-.).* **309**, 1573–1576 (2005).

15. De Conti, G., Dias, M. H. & Bernardis, R. Fighting drug resistance through the targeting of drug-tolerant persister cells. *Cancers (Basel)*. **13**, 1–15 (2021).
16. Meyer, M. *et al.* Profiling the Non-genetic Origins of Cancer Drug Resistance with a Single-Cell Functional Genomics Approach Using Predictive Cell Dynamics. *Cell Syst.* **11**, (2020).
17. Vendramin, R., Litchfield, K. & Swanton, C. Cancer evolution: Darwin and beyond. *EMBO J.* **40**, 1–20 (2021).
18. Marine, J. C., Dawson, S. J. & Dawson, M. A. Non-genetic mechanisms of therapeutic resistance in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **20**, 743–756 (2020).
19. Algazi, A. P. *et al.* Continuous versus intermittent BRAF and MEK inhibition in patients with BRAF-mutated melanoma: a randomized phase 2 trial. *Nat. Med.* **26**, 1564–1568 (2020).
20. Marin-Bejar, O. *et al.* Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell* **39**, 1135-1149.e8 (2021).
21. Oren, Y. *et al.* Cycling cancer persister cells arise from lineages with distinct programs. *Nature* **596**, 576–582 (2021).
22. Tanaka, N. *et al.* Clinical Acquired Resistance to KRAS G12C Inhibition through a Novel KRAS Switch-II Pocket Mutation and Polyclonal Alterations Converging on RAS–MAPK Reactivation. *Cancer Discov.* 1913–1923 (2021) doi:10.1158/2159-8290.cd-21-0365.
23. Berchtold, D., Battich, N. & Pelkmans, L. A Systems-Level Study Reveals Regulators of Membrane-less Organelles in Human Cells. *Mol. Cell* **72**, 1035-1049.e5 (2018).
24. Johnson, S. M. *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**, 635–647 (2005).
25. Courel, M. *et al.* GC content shapes mRNA storage and decay in human cells. *Elife* **8**, (2019).
26. Fu, J., Dang, Y., Counter, C. & Liu, Y. Codon usage regulates human KRAS expression at both transcriptional and translational levels. *J. Biol. Chem.* **293**, 17929–17940 (2018).
27. Lampson, B. L. *et al.* Rare codons regulate KRas oncogenesis. *Curr. Biol.* **23**, 70–75 (2013).
28. Feillet, C. *et al.* Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 9828–9833 (2014).

29. Zangari, J. *et al.* Rapid decay of engulfed extracellular miRNA by XRN1 exonuclease promotes transient epithelial-mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res.* **45**, gkw1284 (2016).
30. Lassalle, S. *et al.* MicroRNA-375/SEC23A as biomarkers of the *in vitro* efficacy of vandetanib. *Oncotarget* **7**, (2016).

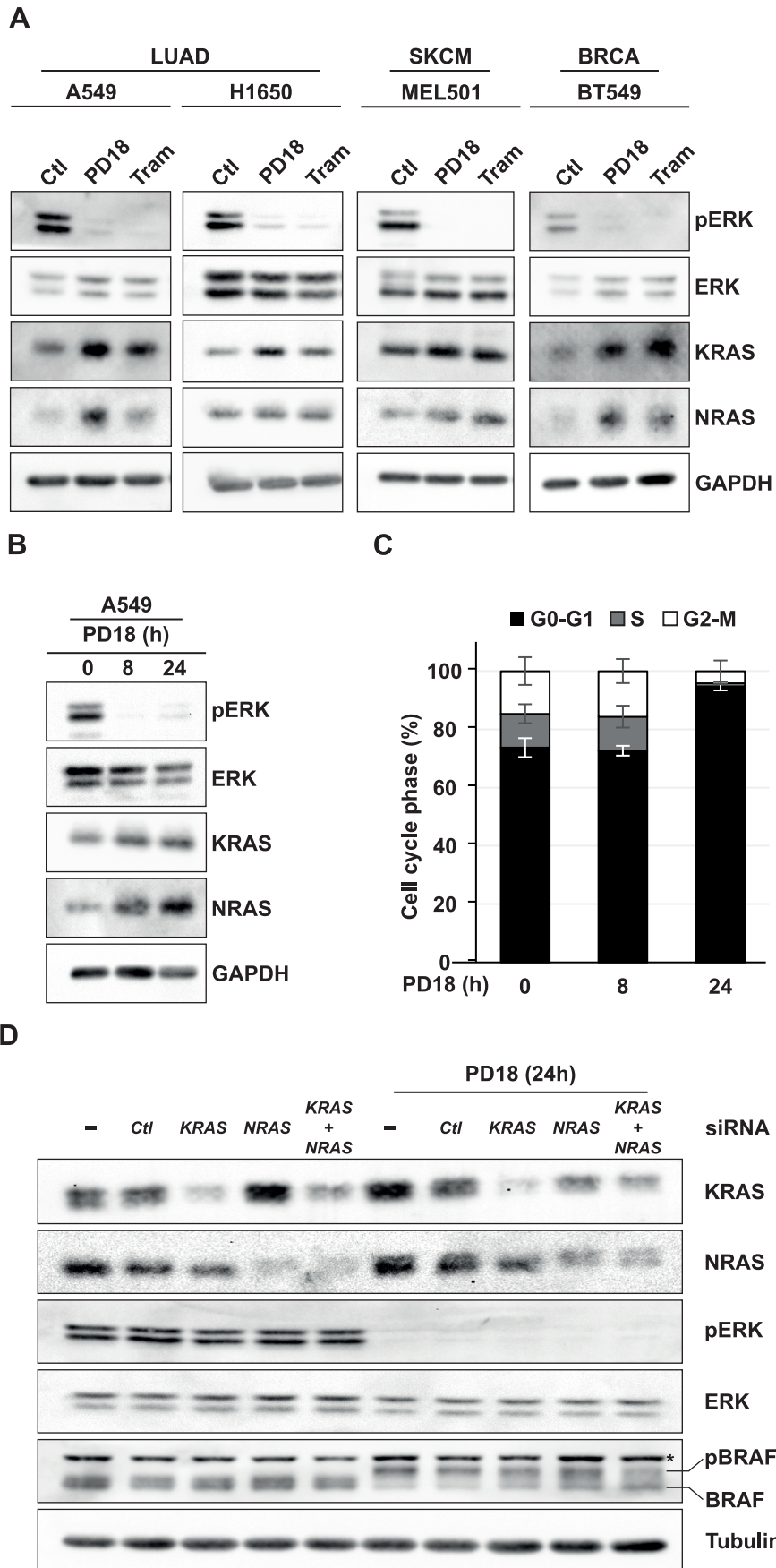


Figure 1

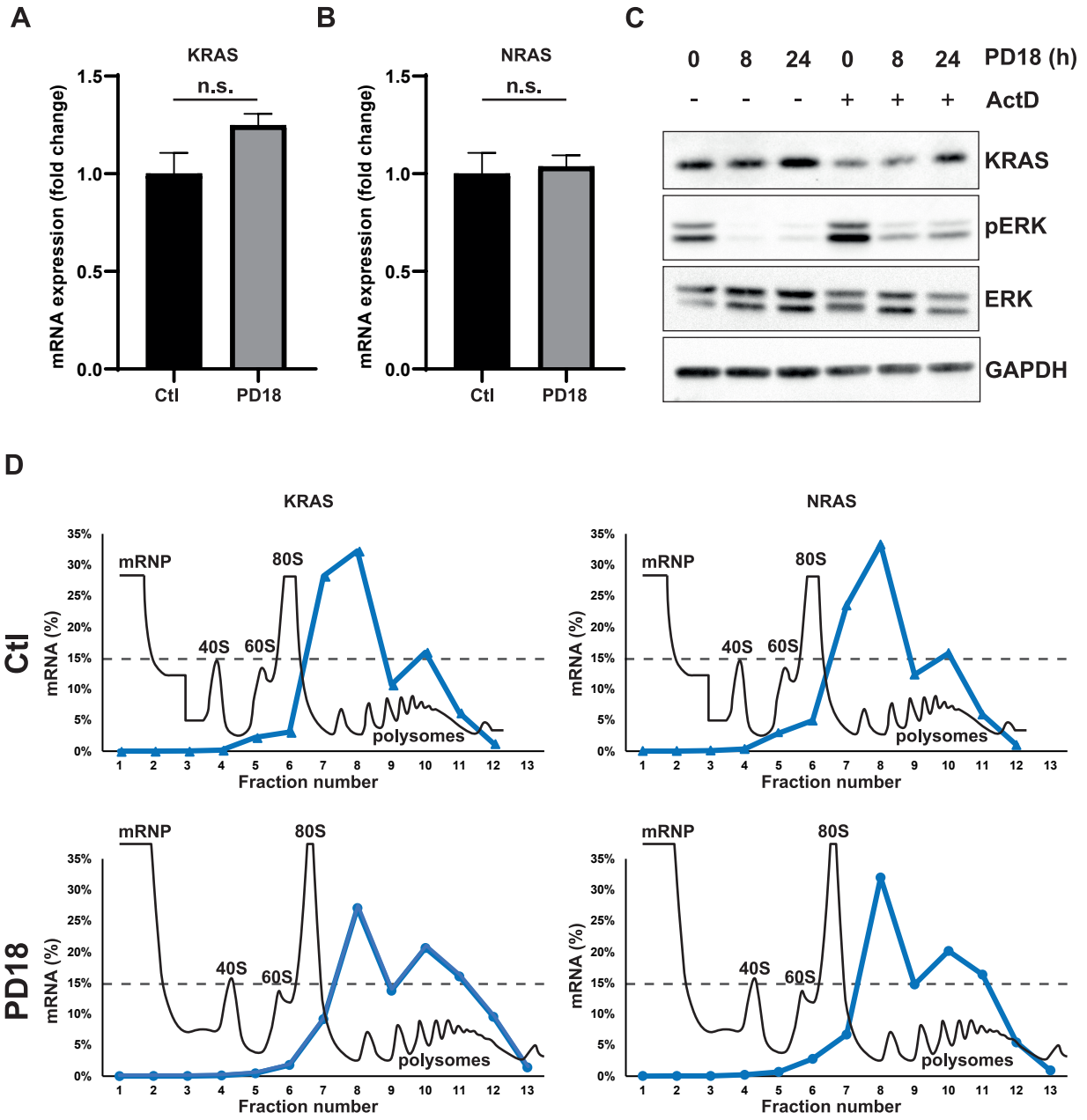


Figure 2

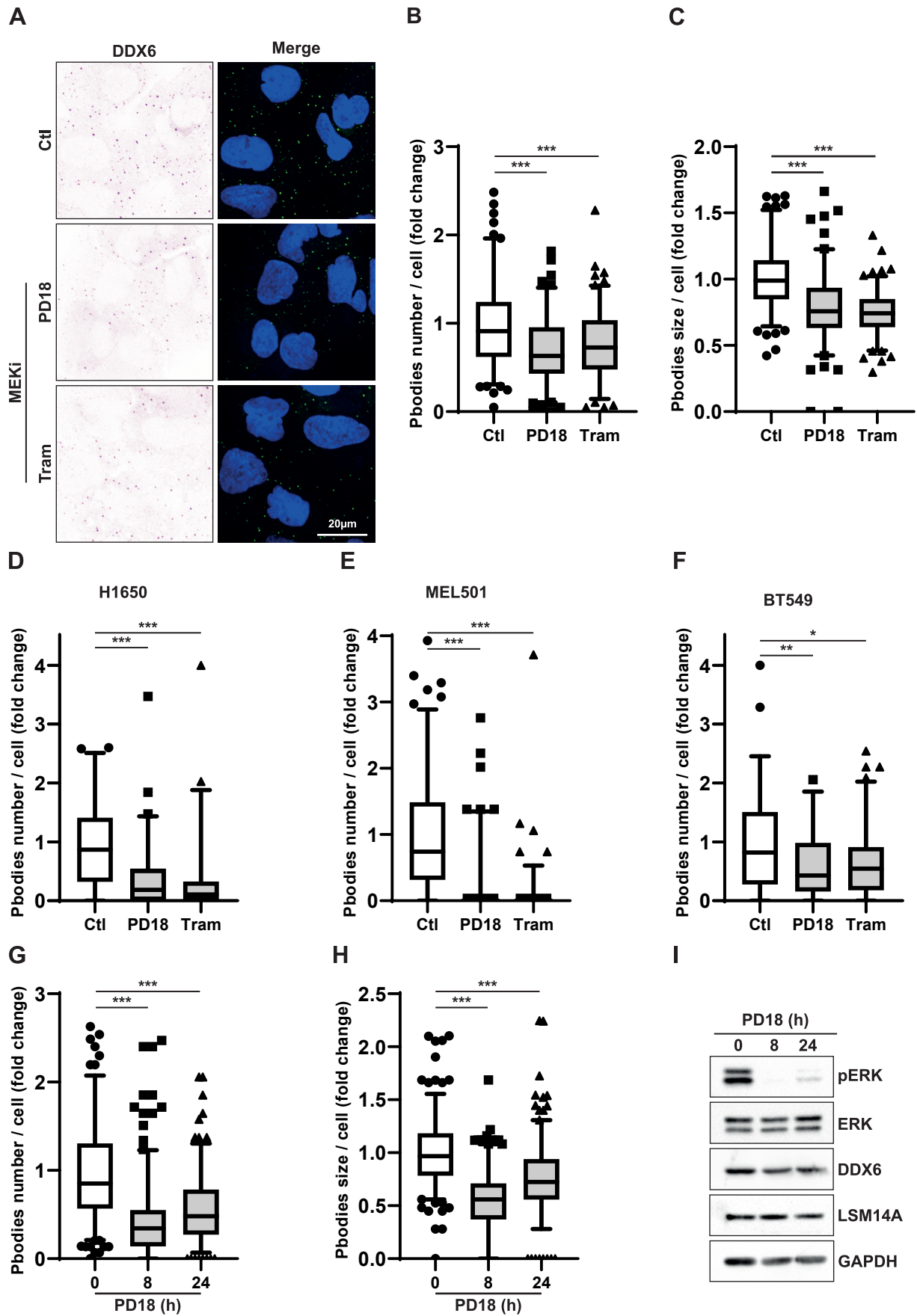


Figure 3

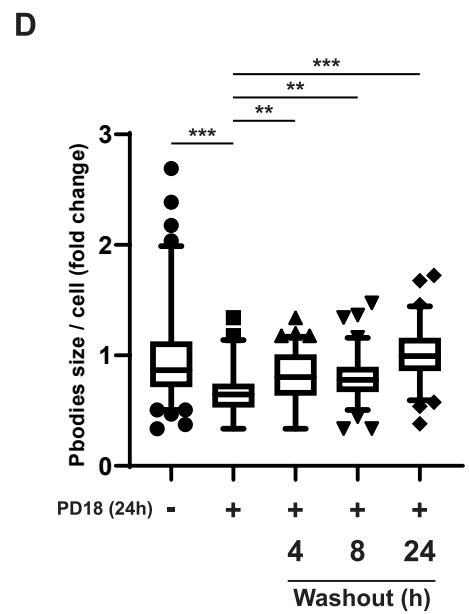
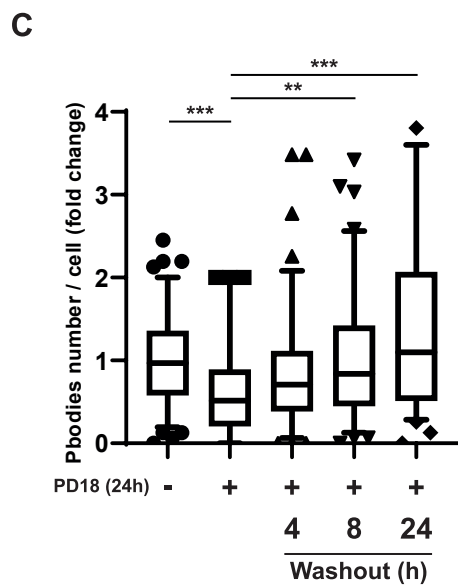
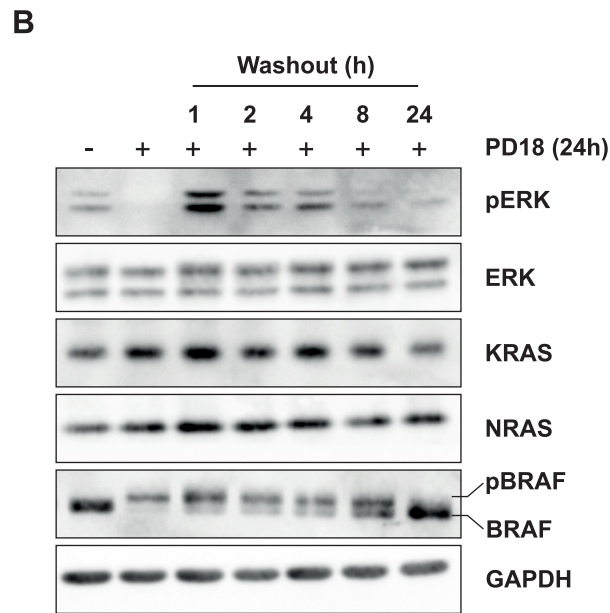


Figure 4

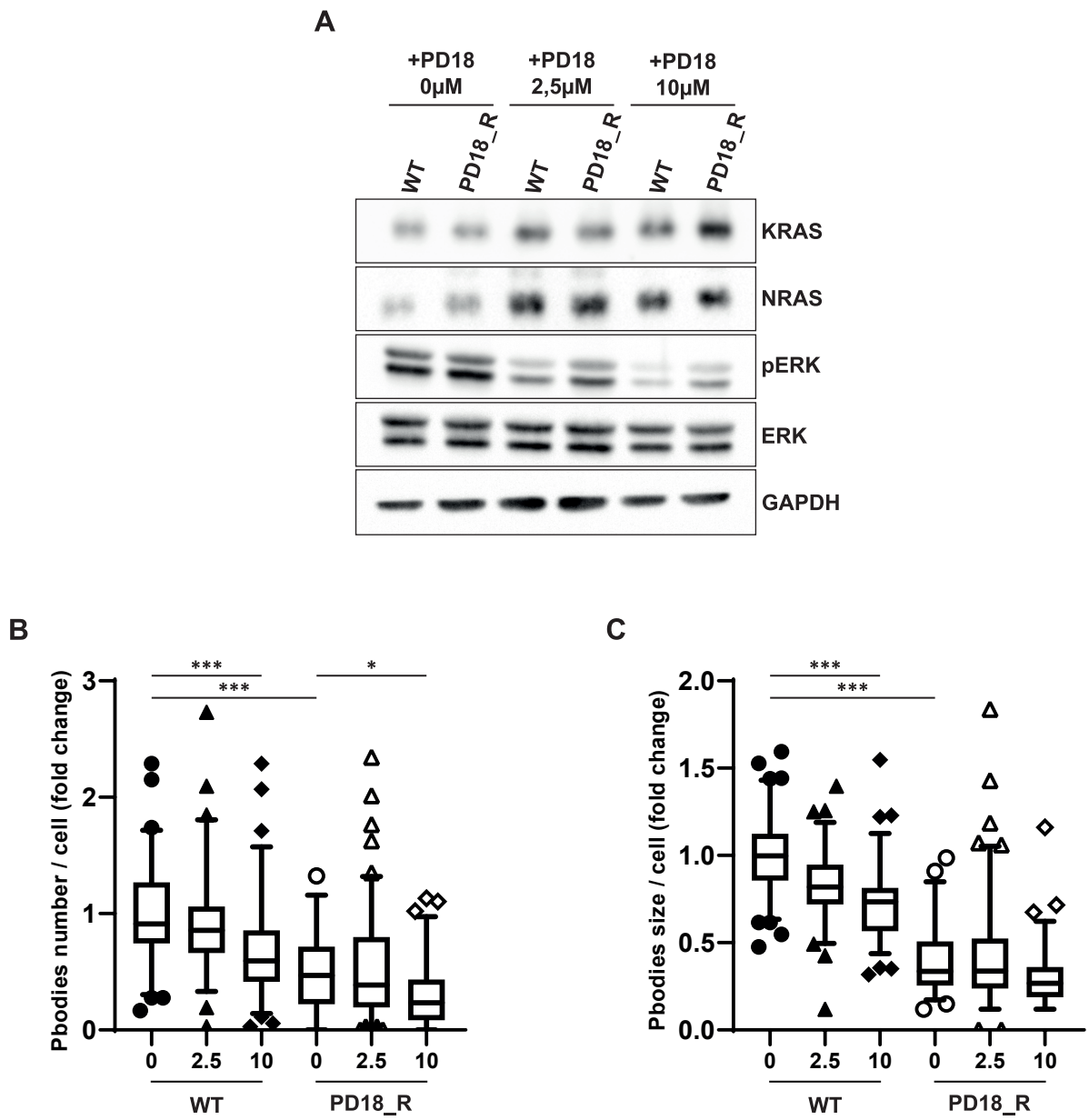


Figure 5

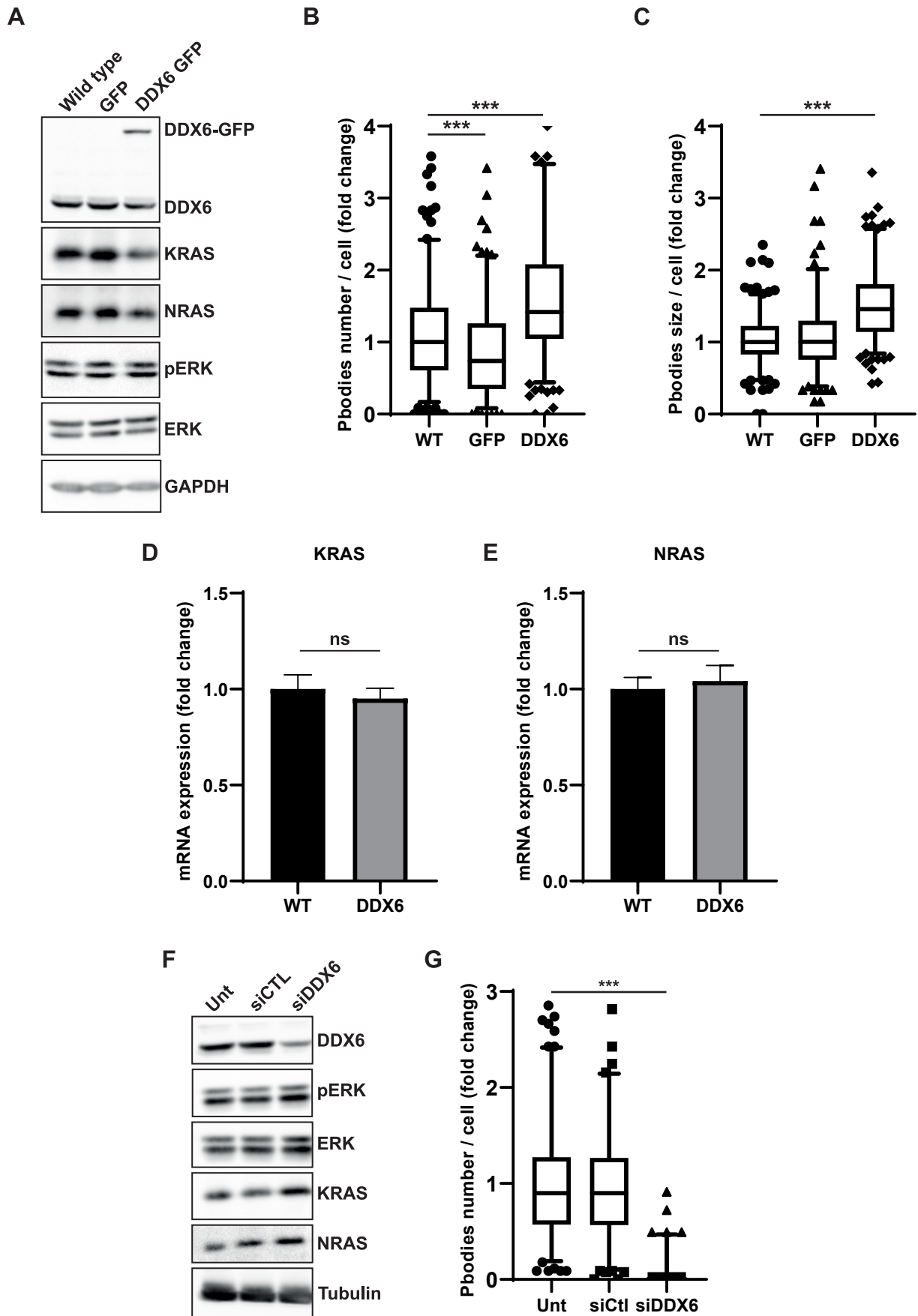
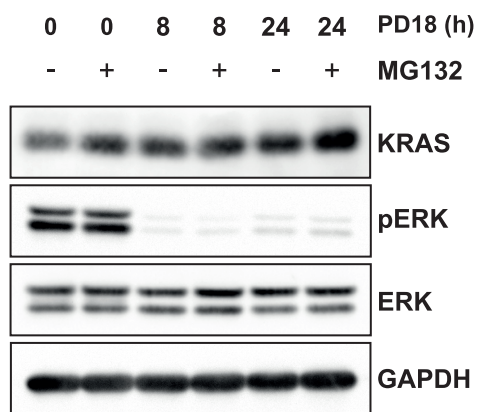
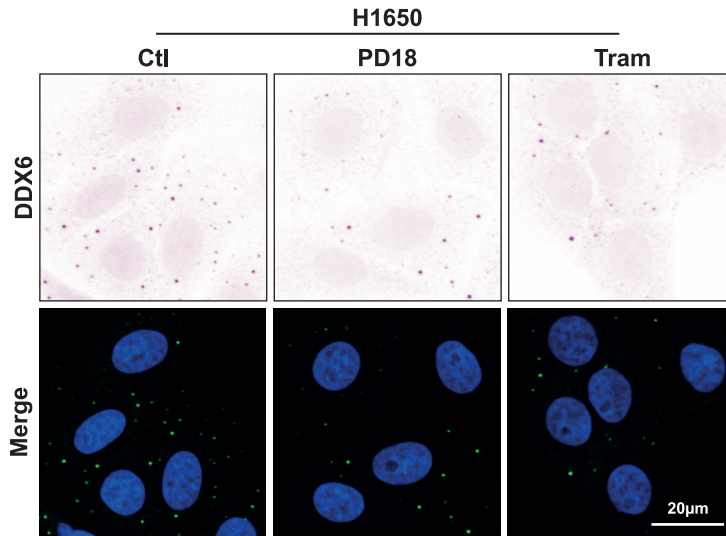


Figure 6

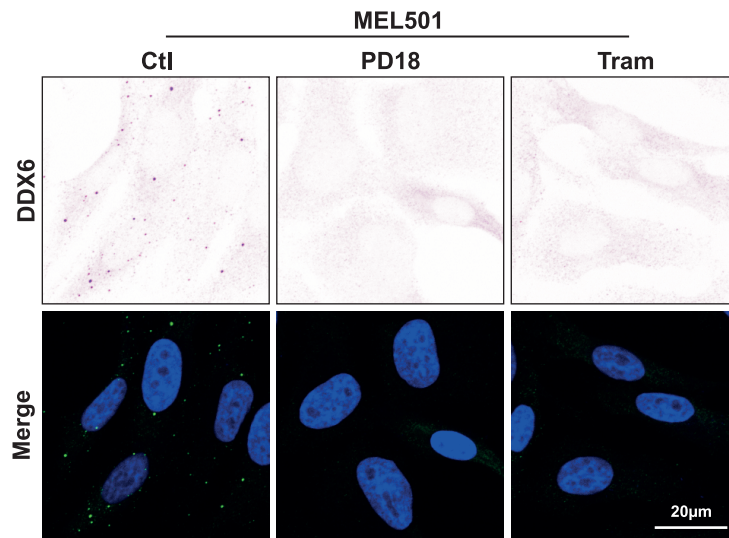


Supp. Figure 1

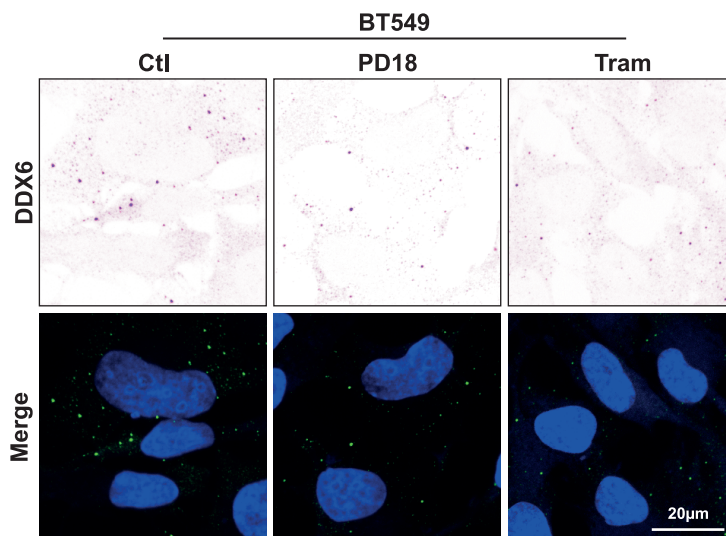
A



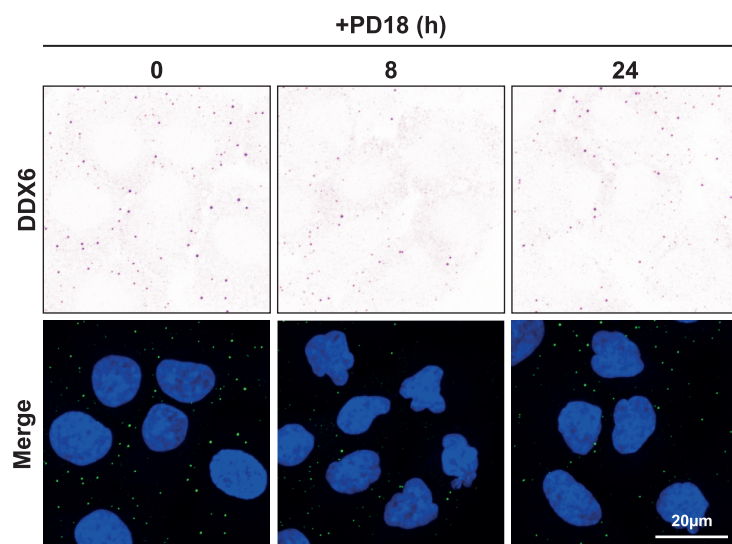
B



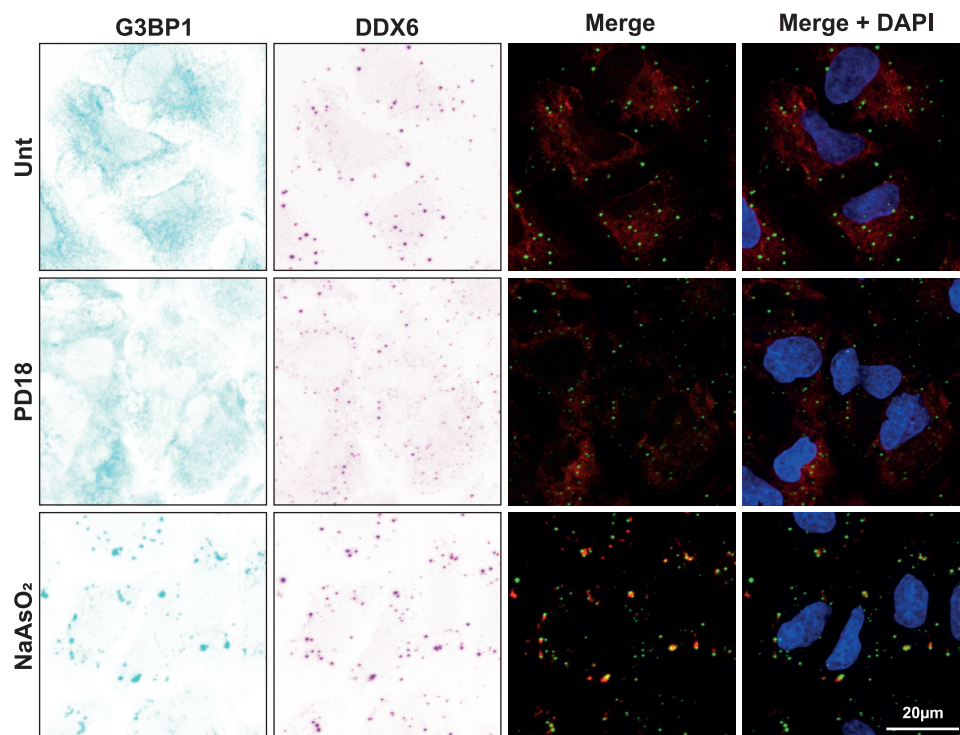
C



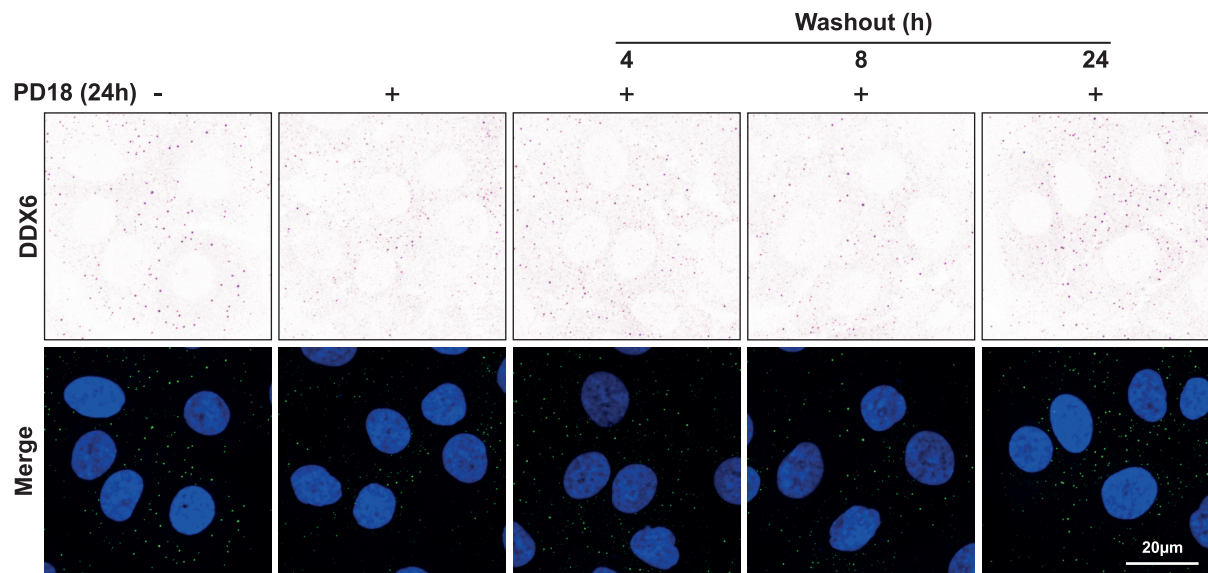
Supp. Figure 2



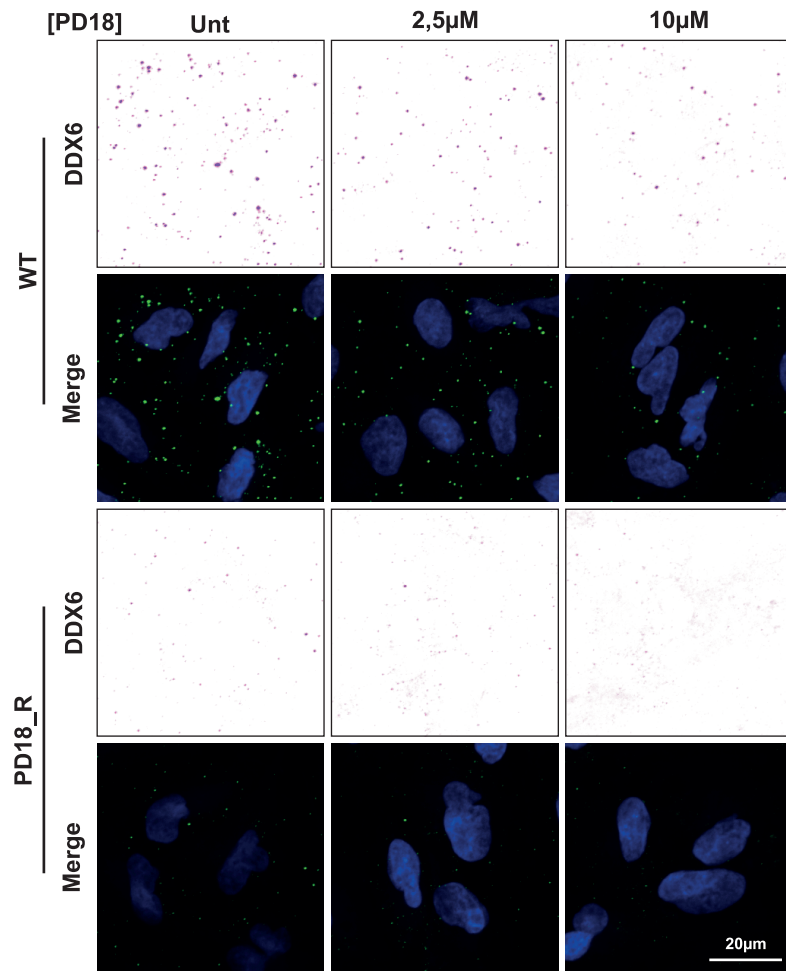
Supp. Figure 3



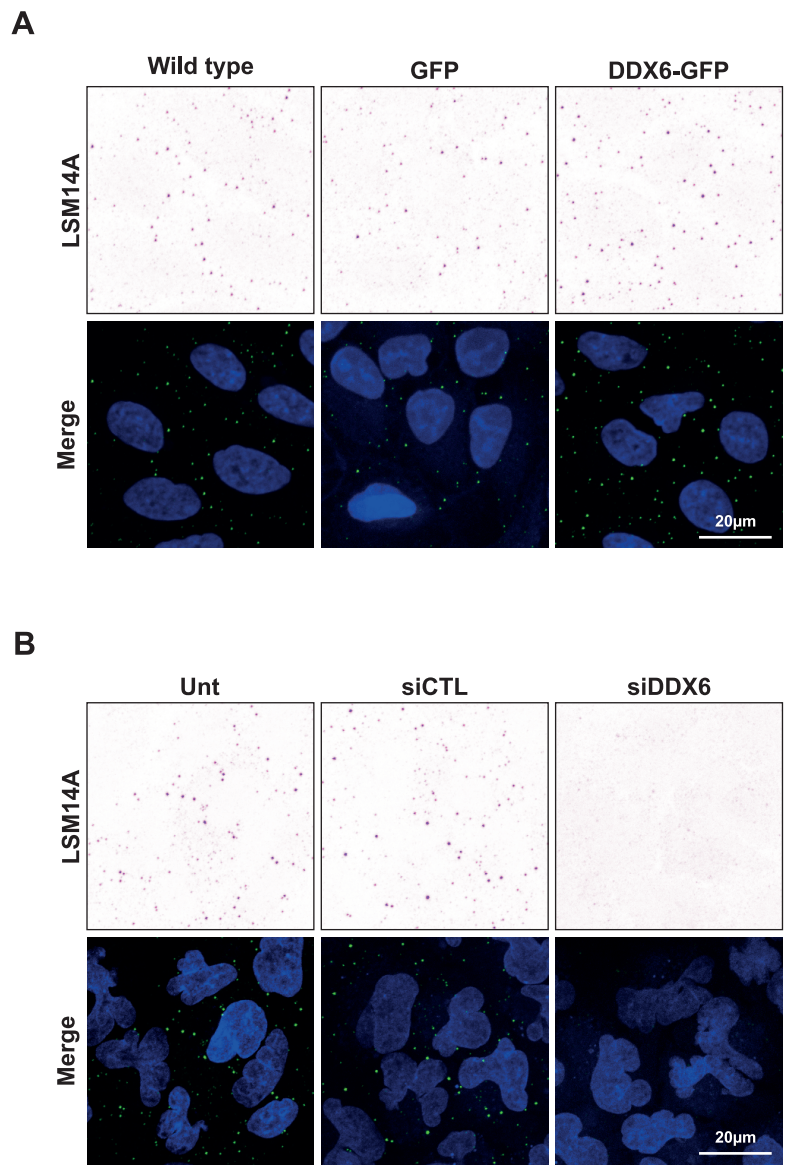
Supp. Figure 4



Supp. Figure 5



Supp. Figure 6



Supp. Figure 7

Figure legends

Figure 1. MEKi treatments induce potent KRAS and NRAS overexpression in cancer cells.

A. Cancer cells were treated 24h with PD184352 (PD18) and trametinib (Tram) at 10 μ M and 10nM respectively. **B-C.** A549 cells were treated with PD184352 (PD18) at 10 μ M and harvested at 8h and 24h. **D.** A549 cells were transfected with the indicated siRNAs for 24h followed by 24h of treatment with PD184352 at 10 μ M (PD18). **A. B. D.** Western blot analysis of the indicated proteins. Results are representative of 3 independent experiments. **C.** Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Results represent the merge of 3 independent experiments.

Figure 2. KRAS and NRAS overexpression is dependent on increased translation.

A-B. A549 cells were treated with PD184352 (PD18) at 10 μ M and harvested at 24h. mRNA expression analysis of the indicated genes were analyzed by RT-qPCR using RPLP0 for normalization and untreated (Ctl) as reference. Results represent the combination of 3 independent experiments. A Mann-Whitney test was performed for statistical analysis. (n.s.: non-significative) **C.** A549 cells were treated with PD184352 (PD18) at 10 μ M and Actinomycin D (ActD) at 1 μ g/mL and harvested at the indicated time. Western blot analysis of the indicated proteins. Results are representative of 3 independent experiments. **D.** Polysome profiles (grey) of A549 cells treated 24h with PD184352 (PD18) at 10 μ M. One representative profile from two independent experiments is shown. RNA levels of indicated transcripts in each polysomal fraction obtained by sucrose-gradient ultracentrifugation was quantified by qRT-PCR.

Figure 3. MEKi treatment is associated with a PBs decrease in size and number.

A-C. A549 cells were treated 24h with PD184352 (PD18) and trametinib (Tram) at 10 μ M and 10nM respectively. **D-F.** H1650, MEL501, BT549 cells respectively were treated with PD184352 (PD18) at 10 μ M. **G.H.** A549 cells were treated with PD184352 (PD18) at 10 μ M and harvested at the indicated time. **A.** Confocal analysis of PBs using anti-DDX6 antibodies (Inverted/green) with DAPI nuclear staining (blue). Results are representative of 3 independent experiments. **B-H.** Quantification of PBs indicated parameters by ImageJ. Results are representative of 3

independent merged experiments with a minimal quantification of 100 cells for each condition. Mann-Whitney test was performed for statistical analysis. For all experiments, the P-value was indicated as $* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.005$. **I.** Western blot analysis of the indicated time. pERK represents phosphorylated form of ERK. Results are representative of 3 independent experiments.

Figure 4. Dynamic regulation of PBs formation and MAPK signaling.

A549 cell were treated with PD184352 (PD18) at $10\mu\text{M}$, after 24h MEKi was removed, and cells were harvested at the indicated time. **A.** Scheme of the global experiment. **B.** Western blot analysis of the indicated time. pERK represents phosphorylated form of ERK. Results are representative of 3 independent experiments. **C.D.** Quantification of PBs number and size respectively by ImageJ. Results are representative of 3 independent merged experiments with a minimal quantification of 100 cells for each condition. Mann-Whitney test was performed for statistical analysis. For all experiments, the P-value was indicated as $** < 0.01$; $*** < 0.005$.

Figure 5. Resistant cells maintain a low PBs phenotype overtime.

A549 wild type (WT) cells and $2.5\mu\text{M}$ PD18 resistant cells (PD18_R) were treated 24h with PD184352 (PD18) at $2.5\mu\text{M}$ or at $10\mu\text{M}$. **A.** Western blot analysis of the indicated time. pERK represents phosphorylated form of ERK. Results are representative of 3 independent experiments. **B.C.** Quantification of PBs number and size respectively by ImageJ. Results are representative of 3 independent merged experiments with a minimal quantification of 100 cells for each condition. A Mann-Whitney test was performed for statistical analysis. For all experiments, the P-value was indicated as $* < 0.05$; $** < 0.01$; $*** < 0.005$.

Figure 6. DDX6 expression is negatively associated with KRAS and NRAS translation.

A-E. A549 wild type (WT) cells, overexpressing a green fluorescent protein (GFP) and a DDX6-GFP fused protein (DDX6). **F.G.** A549 cells were transfected with a siControl (siCTL) or with a siDDX6 for 48h. **A.F.** Western blot analysis at the indicated time. Results are representative of 3 independent experiments. **B.C.G.** Quantification of PBs number and/or size by ImageJ. Results are representative of 3 independent merged experiments with a minimal

quantification of 100 cells for each condition. A Mann-Whitney test was performed for statistical analysis. **D.E.** A549 wild type (WT) cells, overexpressing a DDX6-GFP fused protein. mRNA expression analysis of the indicated genes was analyzed by RT-qPCR using RPLP0 for normalization and untreated (WT) as reference. Results represent the combination of 3 independent experiments. A Mann-Whitney test was performed for statistical analysis. (n.s.: non-significant). For all experiments, the P-value was indicated as * <0.05 ; ** <0.01 ; *** <0.005 .

Supplementary Figure 1.

A549 cells were pretreated with MG132 at 2.5 μ M and treated with PD184352 (PD18) at 10 μ M and harvested at the indicated time. Western blot analysis of the indicated proteins. Results are representative of 3 independent experiments.

Supplementary Figure 2.

A. H1650, **B.** MEL501 and **C.** BT549 cells were treated 24h with PD184352 (PD18) or trametinib (Tram **A-C.** Confocal analysis of PBs using anti-DDX6 antibodies (inverted color/green) with DAPI nuclear staining (blue).

Supplementary Figure 3.

A549 cells were treated with PD184352 (PD18) at 10 μ M and harvested at indicated time. **A-** Confocal analysis of PBs using anti-DDX6 antibodies (inverted color/green) with DAPI nuclear staining (blue).

Supplementary Figure 4.

A549 cells were treated 24h with PD184352 (PD18) at 10 μ M and 20min with Sodium Arsenite (NaAsO₂) at 0.5mM. Confocal analysis of PBs using anti-DDX6 (Inverted/green) and stress granule anti-G3BP1 (Inverted/red) antibodies respectively with DAPI nuclear staining (blue).

Supplementary Figure 5.

A549 cells were treated with PD184352 (PD18) at 10 μ M, after 24h MEKi was removed, and cells were harvested at the indicated time. Confocal analysis of PBs using anti-DDX6 (Inverted/green) antibodies with DAPI nuclear staining (blue).

Supplementary Figure 6.

A549 wild type (WT) cells and 2.5 μ M PD18 resistant cells (PD18_R) were treated 24h with PD184352 (PD18) at 2.5 μ M or at 10 μ M. Confocal analysis of PBs using anti-DDX6 (Inverted/green) antibodies with DAPI nuclear staining (blue).

Supplementary Figure 7.

A. A549 wild type (WT) cells, overexpressing a green fluorescent protein (GFP) and a DDX6-GFP fused protein (DDX6). **B.** A549 cells were transfected with a siControl (siCTL) or with a siDDX6 for 48h. **A-B.** Confocal analysis of PBs using anti-LSM14 (Inverted/green) antibodies with DAPI nuclear staining (blue).

Supplementary Table

List of reagents

<u>REAGENT or RESOURCE</u>	<u>SOURCE</u>	<u>IDENTIFIER</u>
<u>Antibodies</u>		
AlexaFluor 488 chicken anti-Rabbit IgG	Invitrogen	A21441
AlexaFluor 594 chicken anti-Rabbit IgG	Invitrogen	A21442
Anti-mouse IgG (HRP conjugate)	Promega	W402-B
Anti-rabbit (HRP conjugate)	Promega	W401-B
Anti-tubulin	Sigma	T9026
BRAF (55C6)	Cell Signaling Technology	9433S
DDX6	Bethyl	A300-460A
G3BP1	Santa cruz biotechnology	sc-365338
GAPDH	Cell Signaling Technology	2118L
KRAS	Novus	H00003845
LSM14A	Bethyl	A305-102A-M
NRAS (F155)	Santa cruz biotechnology	sc-31
p44/42 MAPK (ERK1/2)	Cell Signaling Technology	9102S
P-p44/42 MAPK (pERK)	Cell Signaling Technology	9101S
<u>Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins</u>		
DC™ Protein Assay Kit	BioRad	5000111
Direct-zol RNA MiniPrep Plus	ZymoResearch	R2072
Fast SYBR-Green Master Mix	Applied Biosystems	4385612
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4368814
Paraformaldehyde 32% solution EM grade	Electron Microscopy Science	15714
Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI	Invitrogen	P36962
Protein ladder	Euromedex	06P-0111
RNase OUT	Invitrogen	10777-019
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems	4444965
TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems	4366597
TRI Reagent®	Molecular Research Center	TR 118
<u>Cell culture and treatments</u>		
Puromycin Dihydrochloride	Invitrogen	A1113803
0,05% trypsin-EDTA (1X)	gibco	25300-054
Actinomycin D	gibco	11805-017
Amicon Ultra-15, PLHK, 100 kD	Sigma-aldrich/Merck	UFC9100024
DDX6 silencer select	Ambion	4392420 (id : s4010)
Dimethyl-sulfoxide	Sigma-aldrich/Merck	276855-100mL
DMEM (1X) + Glutamax-l	gibco	31966-021
Jet Prime transfection reagent	Polyplus	114-15
KRAS silencer select	Ambion	4390824 (id : s7940)
Lipofectamine 3000	Invitrogen	L3000-008
LSM14A silencer select	Ambion	4392420 (id : s25051)
MEM NEAA	gibco	11140-35

MG132	Tocris	1748
Negative Control siRNA #1 Silencer Select	Ambion	4390843
NRAS silencer select	Ambion	4390824 (id : s55)
PD184352	Sigma-aldrich/Merck	P30181-5mg
Polybrene Infection / Transfection Reagent	Sigma-aldrich/Merck	TR-1003-G
RPMI Medium 1640 (1X) + Glutamax-I	gibco	61870-010
Sodium Arsenite Solution	Supelco	106277
Trametinib	TargetMOI	TA-T2125-5mg
<u>Oligonucleotides</u>		
KRAS-Forward	GACTGGGGAGGGCTTTCTTT	
KRAS-Reverse	GCATCATCAACACCCTGTCT	
NRAS-Forward	CCAATACATGAGGACAGGCGA	
NRAS-Reverse	TCACACTTGTTTCCCACTAGCA	
RPLP0-Forward	GCATCAGTACCCATTCTATCAT	
RPLP0-Reverse	AGGTGTAATCCGTCTCCACAGA	
<u>Recombinant DNA</u>		
pEGFP-C1_p54cp	Gift	
pPRIPu-CrUCCI	Gift	
<u>Software and Algorithms</u>		
CytExpert 2.3		
ImageJ 1.53j		
Prism 8.0.2		
StepOne Software v2.3		

ARTICLE II

Définition des zones d'adressage d'XRN1 dans les « processing bodies »

I-Introduction :

Le contrôle spatial et temporel de l'expression des gènes est crucial pour de nombreux processus biologiques tels que le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire et la réponse immunitaire. La cellule eucaryote possède différents moyens de réguler ce contrôle spatial et temporel au niveau de la régulation de la transcription, le transport, la dégradation des ARNm et depuis quelques années le stockage des ARNs dans les « processing bodies » (p-bodies) ou dans les stress granules (SG).

Durant de nombreuses années, les p-bodies, qui sont des agrégats de protéines et d'ARNs, ont été considérés comme des plateformes de dégradation des ARNm puisqu'on y retrouve de nombreux facteurs de la voie de dégradation 5' – 3' dont l'exoribonucléase 1 (XRN1). Cependant, l'absence d'intermédiaire de dégradation 5' et 3' (Horvathova et al., 2017; Hubstenberger et al., 2017; Tutucci et al., 2018) et d'ARNm riche en GC, cibles de XRN1 (Courel et al., 2019; Pashler et al., 2021) ont remis cette hypothèse en question et considère à ce jour, les p-bodies comme des centres de stockage des ARNs soulevant la question du rôle de XRN1 dans les p-bodies.

L'exoribonucléase 1 (XRN1) est responsable de la dégradation des ARNm décapés possédant une extrémité 5' monophosphorylée (Jones et al., 2012). Elle est aussi impliquée dans la dégradation des fragments d'ARNm clivés par les endonucléases générés par la NMD (No Mediated Decay) (Kim and Maquat, 2019) ou par la voie des ARNs interférents (Jones et al., 2013; Zangari et al., 2017). La protéine XRN1 est composée de deux parties. La partie N-terminale hautement conservée où est localisé le domaine catalytique suffisant pour la dégradation des ARNs 5' monophosphorylés (Langeberg et al., 2020). La partie C-terminale, aussi appelée domaine CIR (Complex Interacting Region) (acides aminés 1174 à 1706), n'est pas structurée, et se lie aux protéines des p-bodies, PATL1, CNOT7 et EDC4 (liaison à EDC4 : acides aminés : 1651-1706) (Chang et al., 2014, 2019) ainsi qu'à DCP1 chez *D. melanogaster* (Braun et al., 2012).

En résumé, la protéine XRN1 semble être au carrefour entre la dégradation et le stockage des ARNm. Toutefois, les principales études autour de XRN1 s'intéressent uniquement à la dégradation des ARNs ou à ses interactions avec ses partenaires en dehors des p-bodies. Pour la première fois, nous avons étudié le rôle de XRN1 dans les p-bodies. La déplétion de constituants des p-bodies conduit dans la majorité des cas à une diminution de leur nombre

et/ou de leur taille (Andrei et al., 2005; Berchtold et al., 2018; Yang et al., 2006b, 2004b). A l'inverse, la déplétion de XRN1 conduit, chez la levure, à une augmentation de la taille des p-bodies (Sheth and Parker, 2003). Ce qui pose la question du rôle de XRN1 dans la formation des p-bodies.

Afin de répondre à cette question, nous avons tout d'abord voulu déterminer l'effet de la déplétion de XRN1 sur les p-bodies dans les cellules humaines. Ensuite, afin de comprendre le rôle de XRN1 dans les p-bodies, nous avons étudié la localisation de la protéine XRN1. Dans cette étude, nous avons observé que la déplétion de la protéine XRN1 dans des cellules humaines conduisait à une augmentation de la taille des p-bodies. Ensuite, des délétions successives et des mutations dirigées ont permis de déterminer les régions nécessaires dans la partie C-terminale à l'adressage de XRN1 dans les p-bodies. A terme, cette étude permet de mieux comprendre les mécanismes de formation et de régulation des p-bodies.

II-Matériels et méthodes :

II.1-Culture cellulaire :

Les cellules HEK293 et HeLa sont cultivées en accord avec les recommandations de l'ATCC. Les cellules HeLa (cellules humaines d'adénocarcinome épithélial de l'utérus, ATCC, numéro CCL-2) et les cellules HEK293T (CVCL-0063) sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Les cellules ne sont pas maintenues plus d'un mois et ont été identifiées en utilisant le profil STR (Eurofins Genomics).

II.1.1-Génération des lignées stables :

Génération des lignées shXRN1 :

Les cellules HeLa sontensemencées à 10% de confluence la veille de l'infection. Le lendemain, elles sont infectées avec les particules virales shXRN1 ou shContrôle (Sigma-Aldrich) avec 4µg/ml de polybrène. Les particules virales sont éliminées 24h après transduction. Les cellules sont sélectionnées par ajout de puromycine (2µg/mL).

Constructions des plasmides rétroviraux XRN1 :

Les plasmides rétroviraux XRN1 utilisés dans cette étude ont été construits par une approche utilisant des enzymes de restrictions comme expliquée ci-dessous : le vecteur a été amplifié à partir du plasmide pPRIPU-CrUCCI (Feillet et al., 2014) avec des amorces adaptatrices pour AgeI et BamHI. Les différents fragments de XRN1 produits dans les plasmides pTurquoise-N1-XRN1 ont pu être directement clonés entre AgeI et BamHI et séquencés.

Génération des lignées cellulaires pXRN1 stables :

Les cellules HEK293T sontensemencées à 20% de confluence en flasque T25. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées avec 1,5µg de packaging (pCMV-gag-pol), 1,5µg d'enveloppe (pCMV-env-VSV-G) et 3µg des différentes constructions de XRN1 en utilisant la lipofectamine 3000. Après 16h, le milieu est remplacé par 5mL de milieu frais (jour 3). Le surnageant est récupéré 72h (jour 5) et 120h (jour 7) après transfection et filtré sur des filtres 0,45µm PES pour éliminer les débris cellulaires, et les virus sont concentrés sur des Amicon Ultra-15, PLHK, 100kD (Sigma-aldrich/Merck). Les cellules HeLa shXRN1ensemencées à 20% de confluence la veille ont été directement infectées par application du surnageant filtré et concentré avec

ajout de 4µg/ml de polybrène sur les cellules. Après amplification, les cellules HeLa sont triées par sur un FACS Aria sur la base de leur fluorescence turquoise.

II.1.2-Transfection transitoire :

Construction des plasmides pTurquoise-N1_XRN1 :

Les plasmides pTurquoise-N1_XRN1 utilisés dans cette étude ont été construits comme expliqué ci-dessous : le vecteur plasmidique a été amplifié à partir du pEGFP-C1_p54cp avec des amorces adaptatrices pour AgeI et BamHI. Les différents fragments de XRN1 ont été amplifiés à partir du pLNHA-C1-HsXRN1 (AddGene) à l'aide d'amorces adaptatrices pour les enzymes NotI et BamHI. Le fragment Turquoise a été amplifié à partir du plasmide mTurquoise2-N1 à l'aide d'amorces adaptatrices AgeI et NotI. Enfin, les fragments Turquoise et XRN1 ont été ligués dans le vecteur et séquencés.

Transfection :

Les cellules sontensemencées à 60% de confluence sur des lamelles de verre dans des plaques 12 puits. Après 24h, les cellules sont transfectées avec le plasmide contrôle turquoise, ou les différents plasmides XRN1 avec du Jet Prime en accord avec les instructions du vendeur. 4h après transfection, le milieu des cellules est remplacé par du milieu frais. 24h après transfection, les cellules sont arrêtées en PBS - paraformaldéhyde 4% pour analyse en microscopie confocale.

II.2-Immunofluorescence :

Les cellules sont fixées dans du PBS – paraformaldéhyde 4% pendant 20min. Après fixation, les cellules sont perméabilisées avec une solution de PBS contenant 0,3% de Triton X-100 pendant 5min. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire DDX6 (1 : 200, Bethyl) en chambre humide à 4°C toute la nuit dans une solution contenant 0,03% de Triton X-100, 0,2% de gélatine et 1% BSA. Le lendemain, les cellules sont lavées et incubées avec un anticorps secondaire conjugué Alexa Fluor (1 : 500, Invitrogen) durant 1h à température ambiante, puis montées sur lame avec le liquide de montage contenant du DAPI (Invitrogen). Les images sont acquises avec un microscope confocal LSM880 Zeiss. Les analyses d'images et la quantification de la taille des p-bodies ont été réalisés à l'aide du logiciel Fiji.

II.3-Immuno-blot :

Les protéines ont été extraites des cellules en utilisant un tampon de lyse Laemmli (12,5 mM de Na_2HPO_4 , 15% de glycérol, 3% de SDS). La concentration en protéines a été mesurée avec le kit DC Protein Assay (BioRad) et 30 μg de protéines totales ont été chargées sur des gels SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) à 7,5%, et transférées sur des membranes de PVDF (polyfluorure de vinylidène) (Milipore). Après 1h de blocage avec 5% de sérum d'albumine bovin, les blots ont été incubés une nuit à 4°C avec les anticorps primaires. Après 1h d'incubation avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (1/3000^e, Promega), les bandes protéiques ont été visualisées à l'aide d'un kit de chimiluminescence amélioré (Milipore) avec le système d'imagerie Syngene Pxi4 (Ozyme).

II.4-Analyses statistiques :

Les données quantitatives ont été décrites et présentées graphiquement sous forme de médianes et d'interquartiles. La normalité de la distribution a été testée avec le test de Shapiro et l'homoscédasticité avec un test de Bartlett. Les données répondants à une distribution normale ont été traitées soit par ANOVA ($n > 2$) soit par Test de Student (comparaison 2 à 2). Si les données ne répondaient pas à une loi normale, les comparaisons statistiques ont été effectuées à l'aide du test de Mann-Whitney (Prism 8.0.2, GraphPad). Les tests de significativité étaient bilatéraux et considérés comme significatifs à partir d'une valeur de $p < 0,05$. (Graphiquement : * pour $P < 0,05$, ** : $P < 0,01$ et *** : $P < 0.001$).

Liste des réactifs

<u>REAGENT or RESOURCE</u>	<u>SOURCE</u>	<u>IDENTIFIER</u>
Antibodies		
AlexaFluor 488 chicken anti-Rabbit IgG	Invitrogen	A21441
AlexaFluor 594 chicken anti-Mouse IgG	Invitrogen	A21203
Anti-tubulin	Sigma	T9026
DDX6	Bethyl	A300-460A
RCK (DDX6)	Santa cruz biotechnology	sc-376433
XRN1	Bethyl	A300-443A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
DC™ Protein Assay Kit	BioRad	5000111
Paraformaldehyde 32% solution EM grade	Electron Microscopy Science	15714
Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI	Invitrogen	P36962
Protein ladder	Euromedex	06P-0111
Cell culture and treatments		
0,05% trypsin-EDTA (1X)	gibco	25300-054
Amicon Ultra-15, PLHK, 100 kD	Sigma-aldrich/Merck	UFC9100024
DMEM (1X) + Glutamax-I	gibco	31966-021
Jet Prime transfection reagent	Polyplus	114-15
Lentiviral Particles shCtrl	Sigma-aldrich/Merck	SHC002V
Lentiviral Particles shXRN1	Sigma-aldrich/Merck	lot 01241804NM (NM_019001) TRCN0000049677
Polybrene Infection / Transfection Reagent	Sigma-aldrich/Merck	TR-1003-G
Puromycin Dihydrochloride	Invitrogen	A1113803
Recombinant DNA		
mTurquoise2-N1	Addgene	54843
pLNHA-C1-HsXRN1	Addgene	66596
pPRIPu-CrUCCI	Gift	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1407-1426	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1407-1446	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1427-1446	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1427-1467	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1447-1467	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1607-1649	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1650-1706	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1665-1706	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1680-1706	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/1694-1706	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/Ex37	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/Ex37;42	House	
pPRIPu-XRN1-Δ1-1313/Ex42	House	
pTurquoise2-N1-XRN1Δ1024-1706	House	

pTurquoise2-N1-XRN1Δ1-1312	House	
pTurquoise2-N1-XRN1Δ1314-1706	House	
pTurquoise2-N1-XRN1Δ1-345	House	
pTurquoise2-N1-XRN1Δ1-571	House	
pTurquoise2-N1-XRN1Δ1-944	House	
pTurquoise2-N1-XRN1Δ323-1706	House	
pTurquoise2-N1-XRN1Δ669-1706	House	
pTurquoise-N1	House	
<u>Software and Algorithms</u>		
ImageJ 1.53j		
Prism 8.0.2		

III-Résultats :

Chez la levure, la déplétion de XRN1 conduit à une augmentation de la taille des p-bodies (Parker and Sheth, 2007). Afin de vérifier si ces résultats sont reproductibles chez l'Homme, nous avons diminué l'expression de XRN1 de façon stable dans des cellules HeLa grâce à un shARN (Fig1A ; D). La quantification du nombre et de la taille des p-bodies indiquent que la déplétion de XRN1 conduit à une augmentation statistique ($p < 0.001$) d'environ 1,5 fois du nombre des p-bodies (Fig1A ; B), alors que leur taille n'est pas affectée (Fig1A ; C). Ces résultats indiquent donc l'importance de XRN1 dans la régulation de la taille des p-bodies. Dans le but de déterminer le rôle de XRN1 dans cette régulation, nous avons voulu comprendre quels étaient ses domaines d'interactions avec les p-bodies.

Pour cela, nous avons complété par transfection transitoire des cellules HeLa shXRN1 avec différentes constructions de la protéine XRN1 délétée en fusion avec une protéine fluorescente turquoise afin de suivre la localisation de la protéine. Tout d'abord, afin de déterminer si la zone importante pour l'adressage était située dans la région N-terminale ou C-terminale de la protéine, nous avons réalisé des délétions successives à partir de chacune des extrémités (Fig2A). Ce premier criblage révèle que l'expression de la région N-terminale des acides aminés 1 à 1313 de la protéine XRN1 conduit à une localisation diffuse de la protéine dans le cytoplasme. A l'inverse, l'expression des acides aminés 1314 à 1706 permet à elle seule sa localisation sous forme d'agrégats (Fig2B) colocalisés dans les p-bodies (Fig2C). Par conséquent, la région 1314 à 1706 est nécessaire et suffisante pour l'accumulation de la protéine XRN1 dans les p-bodies.

Ensuite, dans le but de déterminer plus précisément la ou les région(s) d'adressage(s) de XRN1, nous avons effectué un second criblage. A partir de la région d'adressage identifiée précédemment (Fig2), nous avons cloné différentes formes tronquées de la partie C-terminale de XRN1 en fusion avec la protéine turquoise (Fig3B) dans des plasmides rétroviraux afin d'obtenir des lignées stables XRN1 Δ . Nous avons confirmé que l'expression des acides aminés 1314-1706 permet l'accumulation de la protéine sous forme de condensat (Fig3A_{1 ; 2}). La région 1314-1706 entraîne l'exclusion de la protéine du noyau en comparaison avec la région 1-1313 qui elle entraîne une localisation diffuse cytoplasmique et nucléaire (Fig3A_{1 ; 2}). Nos résultats montrent que la région 1314-1406 est suffisante pour permettre l'exclusion de la protéine hors du noyau (Fig3A_{3 ; 4}). Cette région d'exclusion correspondant aux zones définies

par les sites de prédictions bioinformatiques : 1390-1405 pour le NLS (Nuclear Localization Signal) (Prosite^{*}) (de Castro et al., 2006) et 1314-1327 pour le NES (Nuclear Export Signal) (LOCNES[†]) (Xu et al., 2015). Ensuite, la délétion des régions 1406-1468 et 1606-1706 conduit à une diffusion cytoplasmique de la protéine (Fig3A_{5;11}), indiquant que XRN1 contient dans sa région C-terminale deux régions d'adressages aux p-bodies : 1407-1467 et 1607-1706 (Fig3A_{5;11}) et plus précisément au niveau des acides aminés 1427 à 1448 et 1694 à 1706 (Fig3A₅₋₁₆). L'analyse de la conservation de la protéine XRN1 entre les espèces indique que la région N-terminale, où se trouve le site catalytique, est hautement conservée dans le règne animal montrant une divergence d'évolution de la fixation de XRN1 au p-bodies même si celle-ci est maintenue chez la levure par vraisemblablement d'autres interactions (Fig1Supp). Si nous nous concentrons sur les régions d'adressage définies précédemment 1314-1706 uniquement chez les vertébrés, les deux régions de XRN1 1427-1448 (rouge) et 1694-1706 (vert) semblent conservées (Fig4). Ces résultats révèlent que le mécanisme d'adressage de la protéine XRN1 chez les vertébrés est conservé.

^{*} <https://prosite.expasy.org/cgi-bin/prosite/ScanView.cgi?scanfile=35318732333.scan.gz>

[†] http://prodata.swmed.edu/LRNes/predictNES/web_data/LocNES1836848320.php

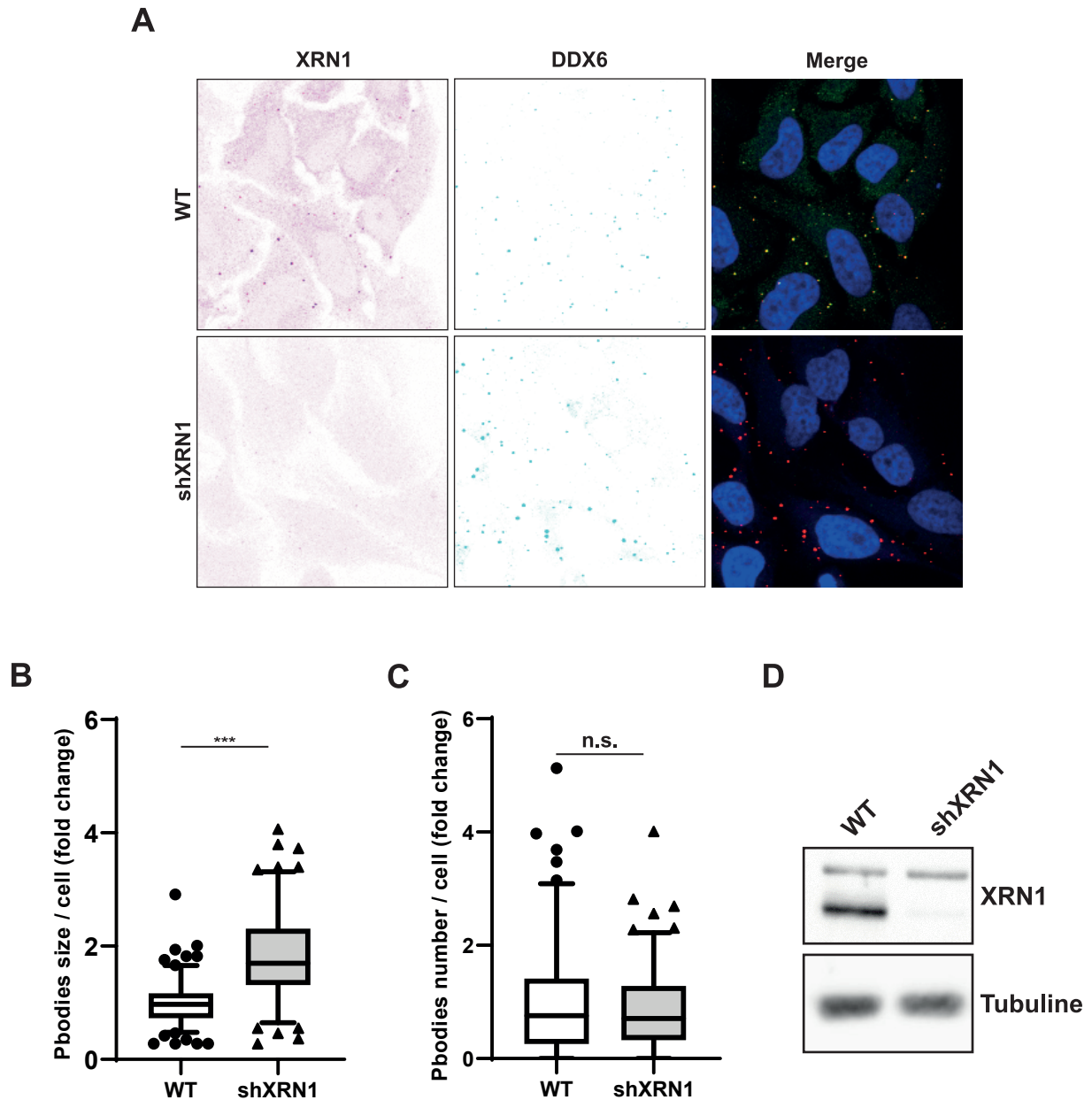


Figure 1 : La délétion de XRN1 conduit à une augmentation de la tailles des PBs.

Cellules HeLa wild type (WT) ou transduites avec un shXRN1. **A.** Image de microscopie confocale de XRN1 (vert), DDX6 (rouge), Dapi (bleu) (couleurs inversées). **B. C.** Quantification de la taille (**B**) et du nombre (**C**) des p-bodies par ImageJ. **D.** Analyse par immuno-blot des protéines XRN1 et de la Tubuline. Les boxplots représentent 5-95 percentile. Nombre de cellules par condition $n > 30$. Les p.values ont été calculées en utilisant le test de Kruskal-Wallis (***) p.value ≤ 0.001 , n.s. indique la non significativité).

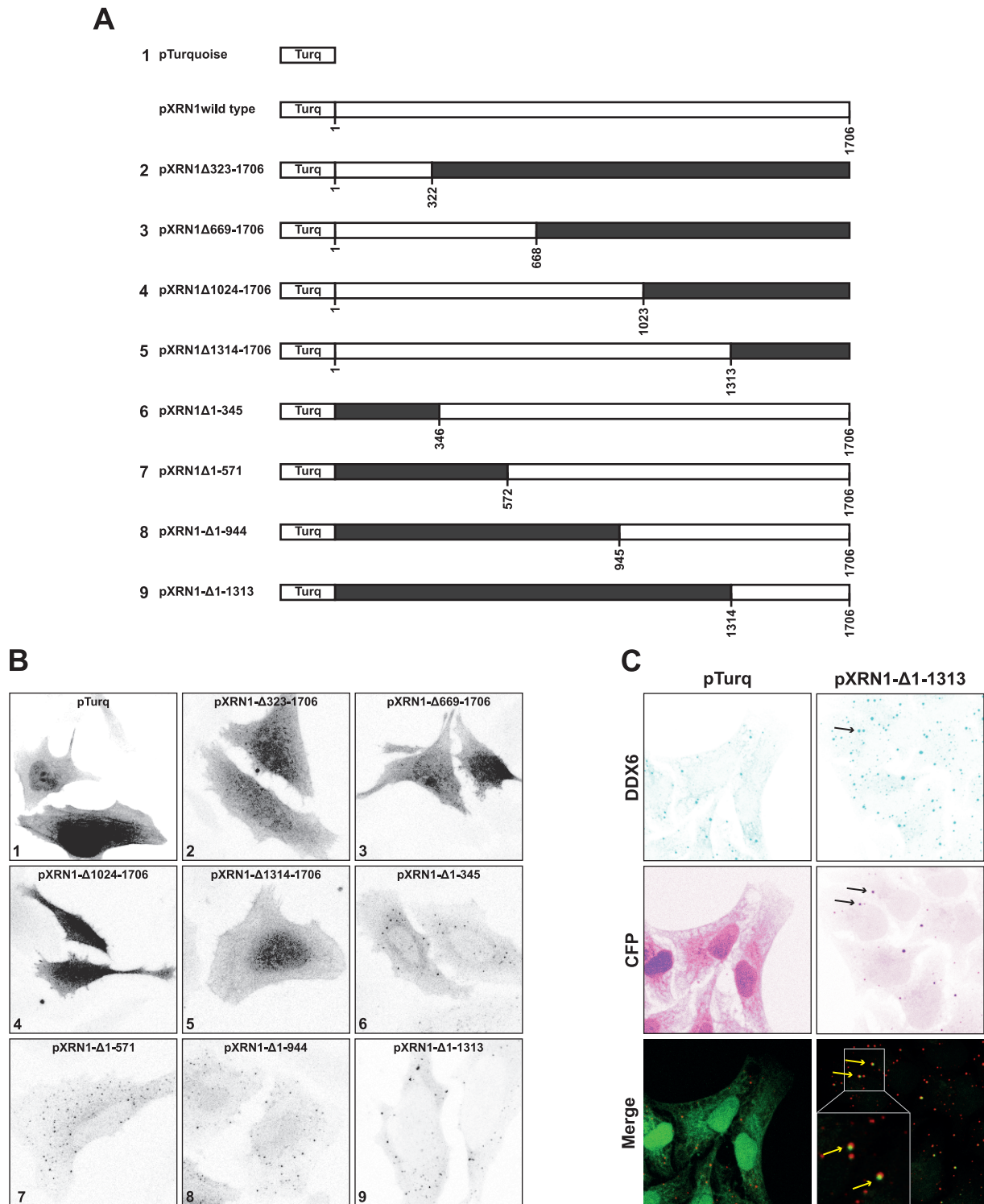


Figure 2 : La partie C-terminale est suffisante et nécessaire à la localisation dans les PBs.

A. Stratégie des constructions plasmidiques. Les cadres grisés représentent les zones délétées. **B.** Les cellules HeLa shXRN1 ont été transfectées avec les différents plasmides pendant 48h. Images de microscopie confocale de la fluorescence turquoise (pTurq) (couleurs inversées). **C.** Les cellules HeLa shXRN1 ont été transduites avec le plasmide contrôle turquoise ou avec la construction pXRN1- Δ 1-1313. Images de microscopie confocale de la fluorescence turquoise (vert) et d'un marquage des p-bodies par DDX6 (vert) (couleurs inversées).

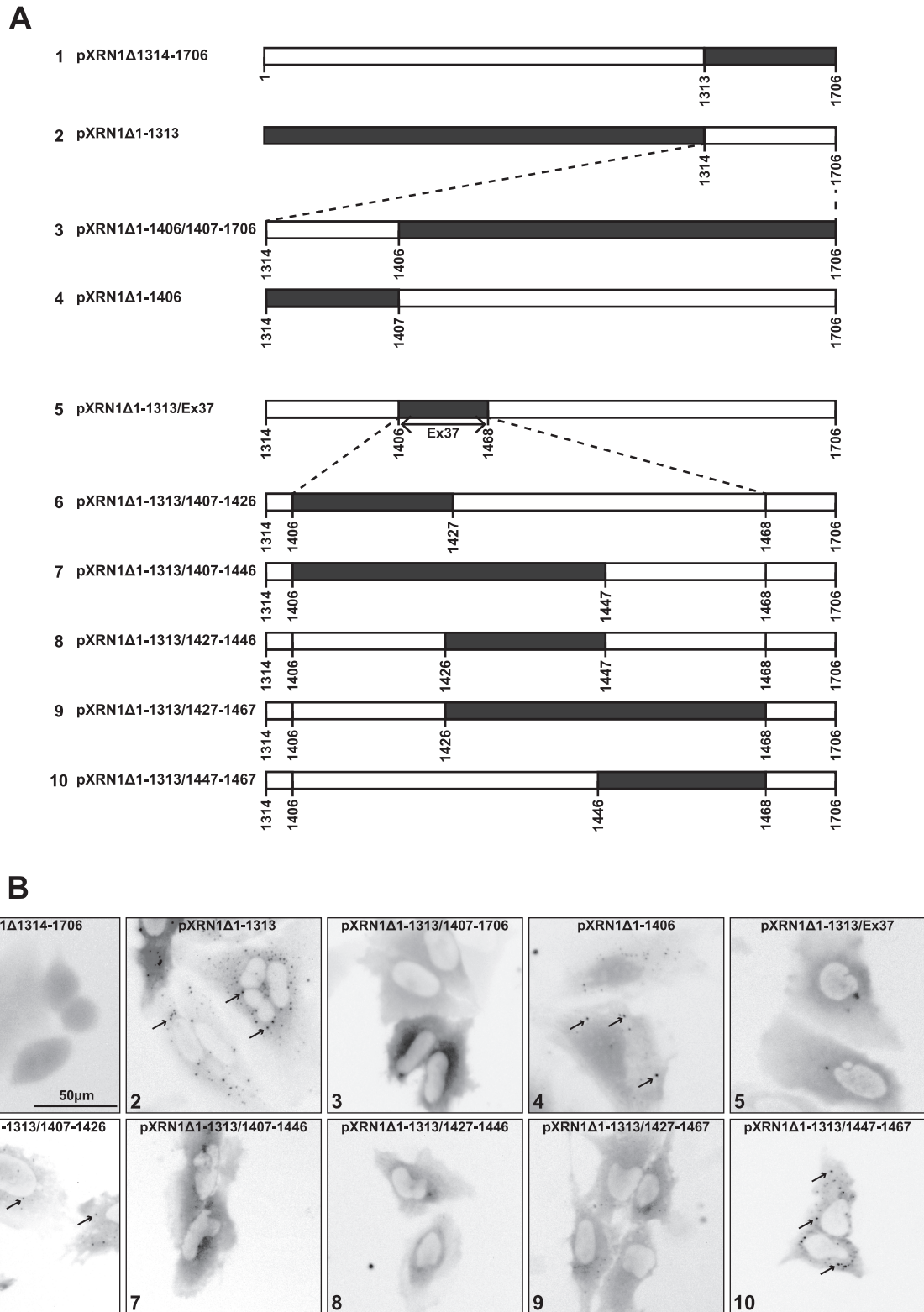


Figure 3 : Définition des zones minimales d'interactions avec les PBs.

A. Les cellules HeLa shXRN1 ont été transduites avec les différents plasmides. Image de microscopies en fluorescence direct (couleurs inversées). **B.** Stratégie de constructions plasmidiques. Les cadres grisées représentent les zones délétées.

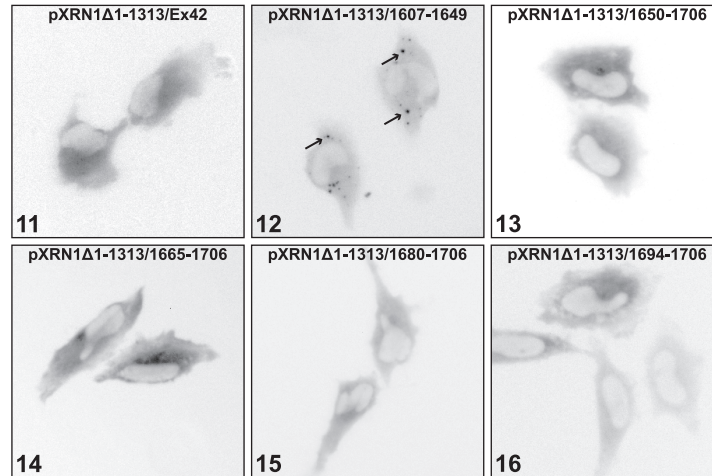
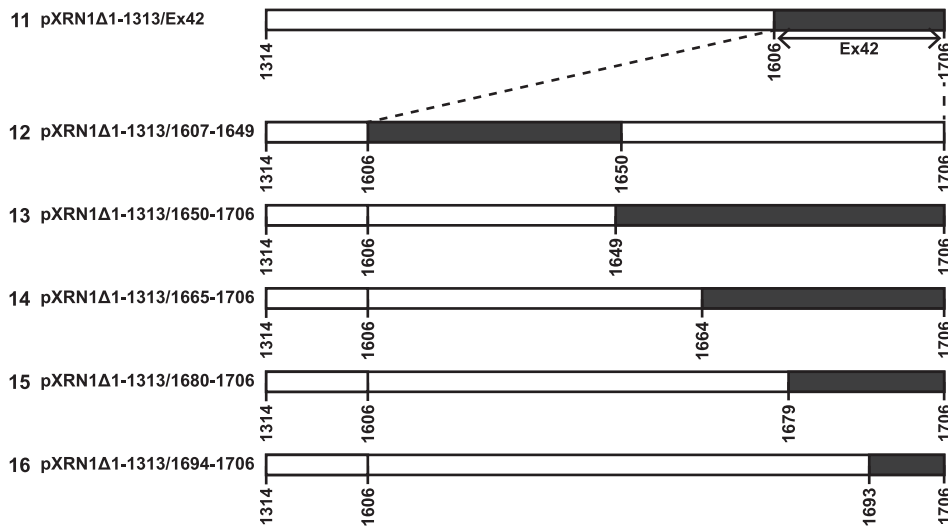
A**B**

Figure 3 suite : Définition des zones minimales d'interactions avec les PBs.

A. Les cellules HeLa shXRN1 ont été transduites avec les différents plasmides. Image de microscopies en fluorescence direct (couleurs inversées). **B.** Stratégie de constructions plasmidiques. Les cadres grisées représentent les zones délétées.

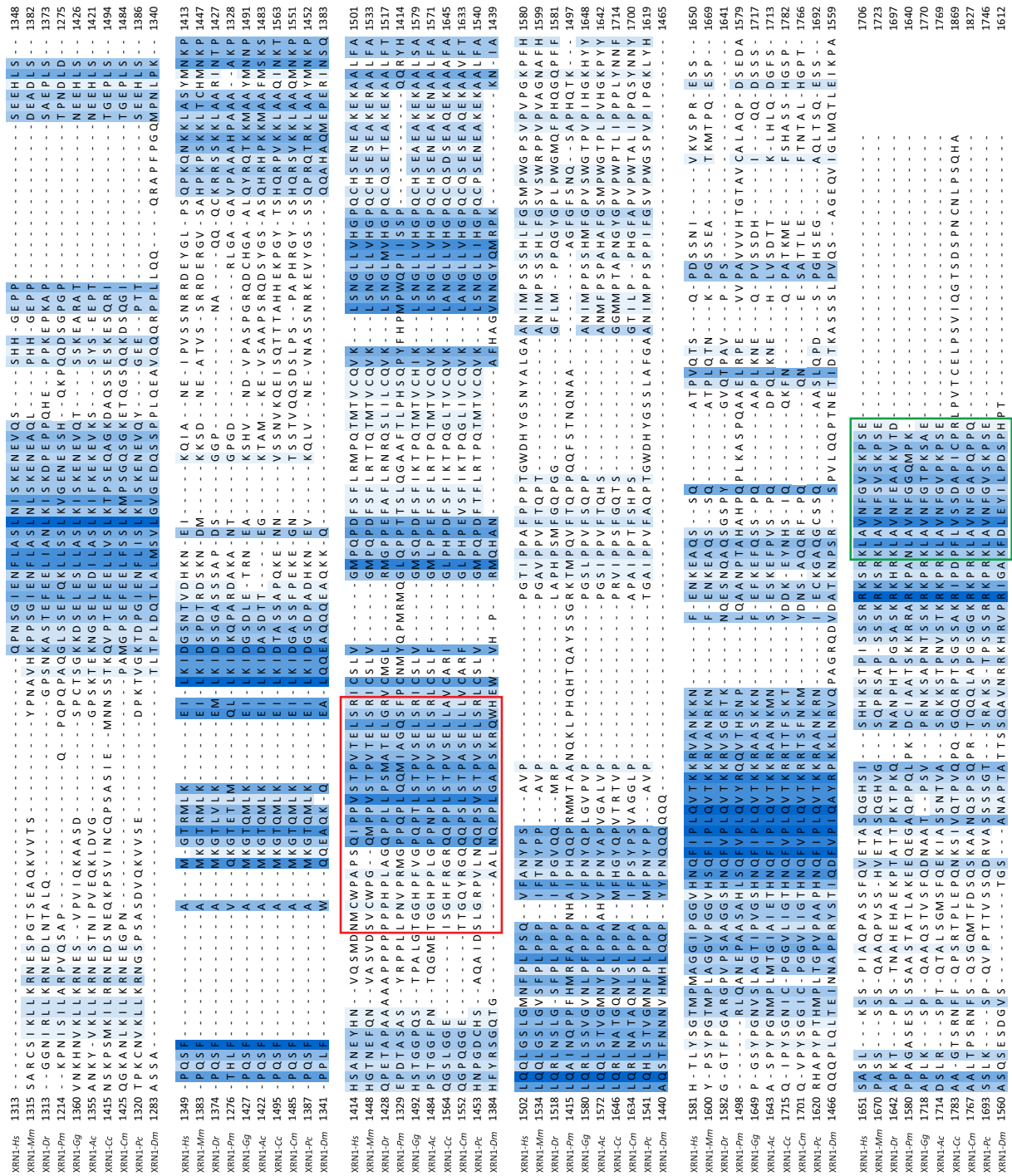
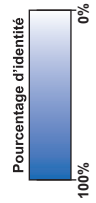


Figure 4 : Alignements protéiques de XRN1 chez les vertébrés.

Hs : Homo sapiens, **Mm** : Mus musculus, **Dr** : Danio rerio, **Pm** : Petromyzon marinus, **Gg** : Gallus gallus, **Ac** : Anolis carolinensis, **Cm** : Callorhinchus milii, **Pc** : Phascolarctos cinereus, **Dm** : Drosophila melanogaster. L'alignement a été réalisé à partir du logiciel Clustal Omega, et les résultats visualisés avec Jalview. Les zones d'adressages de XRN1 sont encadrées en rouge et en vert.



XRNI-H6 648 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Mm 649 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Dr 649 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Pm 650 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Gg 647 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Gg 647 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Cc 646 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Cc 646 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Cc 660 --- V-D-KGSLYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Cc 661 --- V-D-KGSLYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Pc 647 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Pc 647 --- R-D-QKALYFCGPEPTLKHHRKFFLUKKSQVQVQQS3RGCENMMLLELVDAESDELTENVAVASVVLGK3VFVNWPHLEEARVAVASDGETKFFYLEPPGOTKL YSGRTAPP SKVHVLGDK EQSNWAKEVQGIS EHYLRKRGKI J INET-
XRNI-Sc 723 6LFPNALGAEMLAGPEPTLULSHLPHKFSILVTHGYTSLGHEIRFANCNIEGMA5RLEESMVLKVENER --- AHTDIJ EUGSELCDEVCIDWPIJ LKAVKIDSJWGBDDKIVR-K --- CDEJ IIVKDMSEEEKORQWARHQLTTEHLMWTFALTEIAAQK
XRNI-Sc 684 6LPPCC-RLSYVMEAGPEPTLULSHLPHKFSILVTHGYTSLGHEIRFANCNIEGMA5RLEESMVLKVENER --- AHTDIJ EUGSELCDEVCIDWPIJ LKAVKIDSJWGBDDKIVR-K --- CDEJ IIVKDMSEEEKORQWARHQLTTEHLMWTFALTEIAAQK
XRNI-Cc 700 6LFPNV-KMDVYXPEPTLULSHLPHKFSILVTHGYTSLGHEIRFANCNIEGMA5RLEESMVLKVENER --- AHTDIJ EUGSELCDEVCIDWPIJ LKAVKIDSJWGBDDKIVR-K --- CDEJ IIVKDMSEEEKORQWARHQLTTEHLMWTFALTEIAAQK
XRNI-H6 793 --- SAVVAQLLTKRKYQINQNGE --- VRIEKQWSK --- GVPPFVQYIVKDIKRAFDRFEN --- IKTLDLLEPFRSMVFMLGTP --- VYECTBEVADSDG --- VITEGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 920
XRNI-Mm 793 --- SAVVAQLLTKRKYQINQNGE --- VRIEKQWSK --- GVPPFVQYIVKDIKRAFDRFEN --- IKTLDLLEPFRSMVFMLGTP --- VYECTBEVADSDG --- VITEGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 920
XRNI-Dr 794 --- DVLVQGLTVSRKVVYIQRNGK --- VHLKQFAR --- QVLPFPYQIVKDIKRAFDRFEN --- IKTLDLLEPFRSMVFMLGTP --- VYECTBEVADSDG --- VITEGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 920
XRNI-Pm 742 --- GCVLVAHP LGRRVYVFTQRG --- ATIQORQAAR --- NAFPLMHTSLDKICTPEVAASH --- SKTLEEPELSTVFMGLTP --- HYGAMBEVADSD --- VYEGMEVADSD --- VITEGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 877
XRNI-Gg 792 --- SAVVAQLLTKRKYQINQNGE --- VRIEKQWSK --- QVLPFPYQIVKDIKRAFDRFEN --- IKTLDLLEPFRSMVFMLGTP --- VYECTBEVADSDG --- VITEGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 920
XRNI-Gg 791 --- SAVVAQLLTKRKYQINQNGE --- VRIEKQWSK --- QVLPFPYQIVKDIKRAFDRFEN --- IKTLDLLEPFRSMVFMLGTP --- VYECTBEVADSDG --- VITEGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 920
XRNI-Cc 805 --- SVLVAQLLTKRKYVFGHNGE --- VTIKEMSK --- QVLPFAHQITVIRNLIKAFDSSH --- FSLDLEPPKIKVFMGLTP --- VYECMBEVADES --- VIKDGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 937
XRNI-Cc 806 --- SVLVAQLLTKRKYVFGHNGE --- VTIKEMSK --- QVLPFAHQITVIRNLIKAFDSSH --- FSLDLEPPKIKVFMGLTP --- VYECMBEVADES --- VIKDGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 937
XRNI-Pc 792 --- SVVVAQLLTKRKYVFGHNGE --- VTIKEMSK --- QVLPFAHQITVIRNLIKAFDSSH --- FSLDLEPPKIKVFMGLTP --- VYECMBEVADES --- VIKDGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 937
XRNI-Pc 791 --- SVVVAQLLTKRKYVFGHNGE --- VTIKEMSK --- QVLPFAHQITVIRNLIKAFDSSH --- FSLDLEPPKIKVFMGLTP --- VYECMBEVADES --- VIKDGRIRVIFLSTI --- PCEPNDALIQNKHYS IKNYPGVVIAGR 937
XRNI-Dm 751 --- DVLVVTRTFAENSTEFDRKGA --- LMWRDWSB --- SVTQVPAQGVVADLVTWEMRKN --- FVNHVFPVGTSTIIFLTP --- VYSEGTVADPRL --- AYVNGRIQVJSMV --- PRPEPKVNAARQLQEDRDVLSITFQCNL 878
XRNI-Sc 865 --- EAIAVTVPVTGLVDRSDG --- YIKTFSP --- PDYYPQLQVLESVNBEDERYKGRPIJEELEPKNSKVIJLGDY --- AYSGEITIDGYS --- DRRLIKITVEKKFLDSEPTIGKERLQMDHQAVKVPYSVYVSKN 990
XRNI-CI 885 5DK6KHIRPAVAWVRKFTGLVYEAAGG6K EPLVKACQWS SPQQLMPLV LPLVVKRDLVLENSRVLA --- DLPKMQA YPKGSI VMVTDPFKALF6MPGMVNF6SNEKSACRILETIGMS --- TQNKVQDKMEAR KKKMEQKSLRWMG6YDCAR Q 981
XRNI-Cc 921 LVS6YLVSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Mm 951 LVAALVSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Dr 973 LAISGHVLSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Pm 900 LVS6YLVSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Gg 910 LVS6YLVSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Cc 919 LVS6YLVSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Cc 918 LVS6YLVSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Cc 933 LVS6YLVSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Pc 950 LVS6YLVSRFTGSIPIGRGSRNPH --- GDRKAVGNLNFKNKEEVPYTKV --- GEMWY'SAAEQLLAEVLERAPLESYIAK --- NSQEDVYEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1050
XRNI-Pc 1009 TVCRETELIIIAAV --- DDLR-SLPHYKVLQVPHLIPVNTLQPVDRV --- SKRPVRI FDRVAVR IVMVPTGTGVIIG IHPVTPMVR LECVADTCKYVLDSPVPCNNIHGI --- AEDRVYKVEIADV IKTDFEKGQJ 1148
XRNI-Sc 1114 SLTTSJIAAEDHIMKYAANIJEHERKOLAKV --- PREAVLNPR --- S5FALIQSLQVLDGRVVYIQQSGVPIJESKGTAVGVYITLS --- S5LSIQILFDHBEHVAAGNEFEGRILTRMGTGULDAEFLNITNQFIYH- 1242
XRNI-CI 982 6QVDFRLEARIITGMPELWNERPEYERVQDQIIS55DKINGLALVSRDLVADYVDTGTEHNRQVNTKVMVYNTLALTRVSEERKFPYDVKWYLETITIQDQDYVYTEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1129
XRNI-Cc 1051 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Mm 1051 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Dr 1050 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Pm 1009 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Gg 1008 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Gg 1009 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Cc 1049 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Cc 1063 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Pc 1050 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Pc 1009 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Dm 1009 VIDRAVVEKIEEVE --- ECKQKRSKVRVTVKPHL LRRPLEQGHV IPRDAEFCIFDRVAVR ENFSPVVLGRTIIG IKGAEAE --- ADVLYEYVDFEFPESGTLIR-C-SPGRGYRPLPTSALNLSHGSRGSETG 1191
XRNI-Sc 1114 SLTTSJIAAEDHIMKYAANIJEHERKOLAKV --- PREAVLNPR --- S5FALIQSLQVLDGRVVYIQQSGVPIJESKGTAVGVYITLS --- S5LSIQILFDHBEHVAAGNEFEGRILTRMGTGULDAEFLNITNQFIYH- 1242
XRNI-CI 982 6QVDFRLEARIITGMPELWNERPEYERVQDQIIS55DKINGLALVSRDLVADYVDTGTEHNRQVNTKVMVYNTLALTRVSEERKFPYDVKWYLETITIQDQDYVYTEDDIWPGENENG --- AKVQEIITWLGKHPVSTLRSQSCDLQ 1129
XRNI-H6 1182 NQKIL --- TAIIVK --- PQPAAVHOH55S --- S5 --- V5SGHLGALIN-HSPQSLFVPTQ --- V5TKDDDFECN- IWSJLQSGKMOYF- OPTIQQEGAV --- 1259
XRNI-Mm 1182 NQKIL --- TAIIVK --- PQPAAVHOH55S --- S5 --- V5SGHLGALIN-HSPQSLFVPTQ --- V5TKDDDFECN- IWSJLQSGKMOYF- OPTIQQEGAV --- 1259
XRNI-Dr 1181 SHKL --- TAIIVK --- PQPAAVHOH55S --- S5 --- V5SGHLGALIN-HSPQSLFVPTQ --- V5TKDDDFECN- IWSJLQSGKMOYF- OPTIQQEGAV --- 1259
XRNI-Pm 1134 LLGPNVSKLATA --- PQPHI LNDLGRTRKPTNQPLAVLTSAGRLN-HSPRFPFPTQ --- SNKSQLGLN-HSPRFPFPTQ --- TQOQNGROSFLRGDTQGNRSPHAKLNQNR --- OQK --- GS5NKEFSN-VWQSLQNSAMPQK --- PAHWQNNAGSKQ --- 1287
XRNI-Gg 1181 NQKIL --- TAIIVK --- PQPAAVHOH55S --- S5 --- V5SGHLGALIN-HSPQSLFVPTQ --- V5TKDDDFECN- IWSJLQSGKMOYF- OPTIQQEGAV --- 1259
XRNI-Gg 1181 NQKIL --- TAIIVK --- PQPAAVHOH55S --- S5 --- V5SGHLGALIN-HSPQSLFVPTQ --- V5TKDDDFECN- IWSJLQSGKMOYF- OPTIQQEGAV --- 1259
XRNI-Cc 1182 NQKIL --- TAIIVK --- PQPAAVHOH55S --- S5 --- V5SGHLGALIN-HSPQSLFVPTQ --- V5TKDDDFECN- IWSJLQSGKMOYF- OPTIQQEGAV --- 1259
XRNI-Cc 1192 GOKA --- AAILK --- PQAPAPVQYTM --- SPESFV5QKAVHLGLN-HSPRFLVPTQ --- LQAGRQNS LRYENQDGSJHLQKAYLGG --- NOKNANKQNDDEFC- IWSJLQSGKSHHV --- QQN IHKGA --- 1298
XRNI-Cc 1194 GORL --- PPLIK --- PQAPAPVQYTM --- SPESFV5QKAVHLGLN-HSPRFLVPTQ --- LQAGRQNS LRYENQDGSJHLQKAYLGG --- NOKNANKQNDDEFC- IWSJLQSGKSHHV --- QQN IHKGA --- 1298
XRNI-Cc 1194 GORL --- PPLIK --- PQAPAPVQYTM --- SPESFV5QKAVHLGLN-HSPRFLVPTQ --- LQAGRQNS LRYENQDGSJHLQKAYLGG --- NOKNANKQNDDEFC- IWSJLQSGKSHHV --- QQN IHKGA --- 1298
XRNI-Cc 1149 N --- DCELPVRD --- PQNMQADPEVRAEATS --- SRYVTAAGST --- SVPIITMKIQI5DE-FVKTRSDPIALRTE --- KRERAHDNLNKIKK2TKESV5DNK5MG5QK5KPAK --- KVLKRPA --- 1256
XRNI-Sc 1243 --- SKAKSKALEK --- KQSN --- NRNANKTAHKTPSKQSEER --- KRERAHDNLNKIKK2TKESV5DNK5MG5QK5KPAK --- KVLKRPA --- 1256
XRNI-CI 1255 QHKKQVEKALITAYVPMPAQKNSAKN --- EP --- APST55SN5N --- S --- TNKK --- SKKENKQKPTKTEDESPAL TDSLNLKLLKIKP5AEATSGKQV5L --- 1346

Figure supplémentaire 1 suite 1 :

Alignements protéiques de XRN1 dans le règne animal : *Hs* : Homo sapiens, *Mm* : Mus musculus, *Dr* : Danio rerio, *Pm* : Petromyzon marinus, *Gg* : Gallus gallus, *Ac* : Anolis carolinensis, *Cm* : Callorhinchus milii, *Pc* : Phascolarctos cinereus, *Dm* : Drosophila melanogaster, *Sc* : Saccharomyces cerevisiae, *Ci* : Ciona intestinalis, *Ce* : Caenorhabditis elegans. L'alignement a été réalisé à partir du logiciel Clustal Omega, et les résultats visualisés avec Jalview.

IV-Discussion :

Dans cette étude, nous avons mis en évidence un rôle chez l'Homme de la protéine XRN1 dans la régulation des p-bodies comparable à celui de la levure (Sheth and Parker, 2003). En effet, la déplétion de XRN1 conduit à une augmentation de la taille des p-bodies dans les deux cas. Cette augmentation nous interroge néanmoins sur le rôle de XRN1 dans leur régulation. La fonction principale de XRN1 est la dégradation des ARNs dans le cytoplasme. De ce fait, l'explication la plus logique serait que son absence entraîne une augmentation du nombre de transcrits non dégradés dans la cellule et leur accumulation dans les p-bodies. Cependant, la déplétion de XRN1 conduit à une augmentation du nombre de transcrits riches en GC (Courel et al., 2019; Pashler et al., 2021), alors que les ARNm enrichis dans les p-bodies sont riches en AU (Courel et al., 2019; Hubstenberger et al., 2017). Il serait intéressant de voir si l'absence de XRN1 conduit à un recrutement augmenté de transcrits riches en GC dans les p-bodies.

De plus, nos résultats amènent à la conclusion que la protéine XRN1 possède deux zones d'adressage localisées dans la région C-terminale. La protéine XRN1 localisée dans les p-bodies pourrait aussi être impliquée dans leur régulation via son interaction avec d'autres partenaires. Chez l'Homme, la région CIR (C-terminal Interacting Region) : acides aminés 1174 à 1706 de XRN1 interagit avec les protéines EDC4, PATL1 et CNOT7 (Braun et al., 2012; Chang et al., 2019). Cependant, dans les études démontrant ces interactions, la présence de ces protéines dans les p-bodies n'est pas présentée. Ici, nous avons mis en évidence que la zone d'adressage de XRN1 dans les p-bodies se situait dans la région CIR au niveau des acides aminés 1314 à 1706. L'interaction avec EDC4 a lieu au niveau des acides aminés 1650-1706, et correspond à une des zones d'adressages de XRN1 (1694-1706). Ces résultats suggèrent que soit la protéine XRN1 soit la protéine EDC4 pourraient-être responsables de l'adressage de son partenaire dans les p-bodies. Concernant la région d'adressage 1427-1448, elle pourrait permettre son interaction avec les protéines PATL1 et/ou CNOT7. De façon intéressante, en croisant les données de la littérature avec les données de détection de sites putatifs, nous ne retrouvons que des interactions peptides-peptides pour sa localisation. Malgré le fait qu'une région de liaison à l'ARN simple brin soit prédite, celle-ci n'est pas retrouvée dans notre criblage, suggérant que la composante en ARN des p-bodies ne rentre pas directement en compte dans le recrutement de XRN1.

Enfin, l'alignement de la séquence de XRN1 entre les espèces indique que les régions définies d'adressages de XRN1 dans les p-bodies sont conservées chez les vertébrés. Cependant, chez la levure *S. cerevisiae*, la structure C-terminale de la protéine est peu conservée en comparaison à celle de l'Homme, dû à une séquence protéine plus courte (1528 aa chez *S. cerevisiae* contre 1706 chez l'Homme), de ce fait le mécanisme de recrutement des protéines dans les p-bodies doit être différent des vertébrés, et les interactions protéiques également. C'est pour cela qu'il serait intéressant de déterminer quelles sont les protéines interagissant avec les régions d'adressages définies dans cette étude, et leurs rôles dans le recrutement de XRN1 dans les p-bodies.

V-Références

Andrei, M.A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., and Lührmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* *11*, 717–727.

Berchtold, D., Battich, N., and Pelkmans, L. (2018). A Systems-Level Study Reveals Regulators of Membrane-less Organelles in Human Cells. *Molecular Cell* *72*, 1035-1049.e5.

Braun, J.E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.-T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., and Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature Structural & Molecular Biology* *19*, 1324–1331.

de Castro, E., Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., and Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* *34*, W362–W365.

Chang, C.-T., Bercovich, N., Loh, B., Jonas, S., and Izaurralde, E. (2014). The activation of the decapping enzyme DCP2 by DCP1 occurs on the EDC4 scaffold and involves a conserved loop in DCP1. *Nucleic Acids Res* *42*, 5217–5233.

Chang, C.-T., Muthukumar, S., Weber, R., Levdansky, Y., Chen, Y., Bhandari, D., Igreja, C., Wohlbold, L., Valkov, E., and Izaurralde, E. (2019). A low-complexity region in human XRN1 directly recruits deadenylation and decapping factors in 5'-3' messenger RNA decay. *Nucleic Acids Res.* *47*, 9282–9295.

Courel, M., Clément, Y., Bossevain, C., Foretek, D., Vidal Cruchez, O., Yi, Z., Bénard, M., Benassy, M.-N., Kress, M., Vindry, C., et al. (2019). GC content shapes mRNA storage and decay in human cells. *ELife* *8*.

Feillet, C., Krusche, P., Tamanini, F., Janssens, R.C., Downey, M.J., Martin, P., Teboul, M., Saito, S., Lévi, F.A., Bretschneider, T., et al. (2014). Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle. *PNAS* *111*, 9828–9833.

Hardy, S.D., Shinde, A., Wang, W.-H., Wendt, M.K., and Geahlen, R.L. (2017). Regulation of epithelial-mesenchymal transition and metastasis by TGF- β , P-bodies, and autophagy. *Oncotarget* *8*, 103302–103314.

Horvathova, I., Voigt, F., Kotrys, A.V., Zhan, Y., Artus-Revel, C.G., Eglinger, J., Stadler, M.B., Giorgetti, L., and Chao, J.A. (2017). The Dynamics of mRNA Turnover Revealed by Single-Molecule Imaging in Single Cells. *Mol. Cell* *68*, 615-625.e9.

Hubstenberger, A., Courel, M., Bénard, M., Souquere, S., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., Yi, Z., Morlot, J.-B., Munier, A., Fradet, M., et al. (2017). P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Molecular Cell* *68*, 144-157.e5.

Jones, C.I., Zabolotskaya, M.V., and Newbury, S.F. (2012). The 5' \rightarrow 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development: The 5' \rightarrow 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions. *WIREs RNA* *3*, 455–468.

Jones, C.I., Grima, D.P., Waldron, J.A., Jones, S., Parker, H.N., and Newbury, S.F. (2013). The 5'-3' exoribonuclease Pacman (*Xrn1*) regulates expression of the heat shock protein *Hsp67Bc* and the microRNA *miR-277-3p* in *Drosophila* wing imaginal discs. *RNA Biol* *10*, 1345–1355.

- Kim, Y.K., and Maquat, L.E. (2019). UPFront and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond. *RNA* 25, 407–422.
- Langeberg, C.J., Welch, W.R.W., McGuire, J.V., Ashby, A., Jackson, A.D., and Chapman, E.G. (2020). Biochemical Characterization of Yeast Xrn1. *Biochemistry* 59, 1493–1507.
- Parker, R., and Sheth, U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell* 25, 635–646.
- Pashler, A.L., Towler, B.P., Jones, C.I., Haime, H.J., Burgess, T., and Newbury, S.F. (2021). Genome-wide analyses of XRN1-sensitive targets in osteosarcoma cells identifies disease-relevant transcripts containing G-rich motifs. *RNA* rna.078872.121.
- Scheller, N., Resa-Infante, P., de la Luna, S., Galao, R.P., Albrecht, M., Kaestner, L., Lipp, P., Lengauer, T., Meyerhans, A., and Díez, J. (2007). Identification of PatL1, a human homolog to yeast P body component Pat1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773, 1786–1792.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808.
- Tutucci, E., Vera, M., Biswas, J., Garcia, J., Parker, R., and Singer, R.H. (2018). An improved MS2 system for accurate reporting of the mRNA life cycle. *Nat Methods* 15, 81–89.
- Xu, D., Marquis, K., Pei, J., Fu, S.-C., Çağatay, T., Grishin, N.V., and Chook, Y.M. (2015). LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics* 31, 1357–1365.
- Yang, W.-H., Yu, J.H., Gulick, T., Bloch, K.D., and Bloch, D.B. (2006). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA* 12, 547–554.
- Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M.R., Eystathioy, T., Rubin, R.L., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2004). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *Journal of Cell Science* 117, 5567–5578.
- Yu, J.H., YANG, W.-H., GULICK, T., BLOCH, K.D., and BLOCH, D.B. (2005). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* 11, 1795–1802.
- Zangari, J., Ilie, M., Rouaud, F., Signetti, L., Ohanna, M., Didier, R., Roméo, B., Goldoni, D., Nottet, N., Staedel, C., et al. (2017). Rapid decay of engulfed extracellular miRNA by XRN1 exonuclease promotes transient epithelial-mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res* 45, 4131–4141.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., and Shyu, A.-B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* 182, 89–101.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES :

En conclusion, durant ma thèse, j'ai développé en parallèle deux axes portant tous deux sur la régulation des p-bodies. Le premier sur le rôle des p-bodies dans la réponse rapide des cellules au stress dans un contexte cancéreux encore peu étudié, et le second sur le mécanisme de croissance des p-bodies d'un point de vue plus fondamental.

Le premier axe développé a permis de mettre en évidence les p-bodies comme un mécanisme dynamique d'adaptation au stress cellulaire. En effet, lors d'un stress, ici induit par des inhibiteurs de MEK, j'ai observé que la cellule possédait la capacité de moduler l'expression protéique via la traduction d'ARNm stockés et réprimés dans les p-bodies.

Toutefois, afin de pouvoir conclure que l'augmentation de la traduction provient de la relocalisation d'ARNm des p-bodies vers le cytoplasme, il serait nécessaire de réaliser un marquage des ARNm. Pour cela, il existe différentes techniques comme le smiFISH, le système MS2, le RNAscope, ou encore la transfection d'ARNm marqués. L'utilisation d'une de ces techniques permettrait d'observer la relocalisation des ARNm localisés dans les p-bodies vers le cytoplasme lors de leur dissolution.

De façon surprenante, j'ai pu observer au cours de ma thèse qu'un traitement au cisplatine (sel de platine utilisé comme traitement anti-cancéreux lors des chimiothérapies) conduit à l'augmentation du nombre de p-bodies (Fig. Add.1) à la fois dans des cellules sensibles et de façon encore plus marquée dans les résistantes au cisplatine. De ce fait, il semble que la cellule soit capable en fonction du traitement proposé, de modifier son contenu en ARN et/ou en protéine dans les p-bodies par des mécanismes de formation et de dissolution. Il serait donc intéressant de déterminer la composition en ARNs et en protéines enrichis/déplétés dans les p-bodies après traitement au cisplatine. Pour cela, nous pourrions réaliser un tri des p-bodies par FAPS suivi d'un séquençage et/ou d'une analyse protéomique. Ces résultats pourraient alors indiquer comment la cellule remodèle le contenu de ses p-bodies, quels sont les ARNm et les protéines stockés nécessaires pour la tolérance aux traitements.

En effet, bien que des modifications du nombre et de la taille des p-bodies soient observées dans les lignées sensibles et résistantes au MEKi et au cisplatine, il serait intéressant de déterminer si les p-bodies participent à ces résistances. Pour cela, nous pourrions effectuer des pertes d'expression / surexpression des protéines DDX6, LSM14A, 4E-T (protéines indispensables à la formation des p-bodies) dans les lignées résistantes aux inhibiteurs, puis observer l'effet sur différentes caractéristiques tumorales comme l'invasion, la migration, ou encore la prolifération cellulaire.

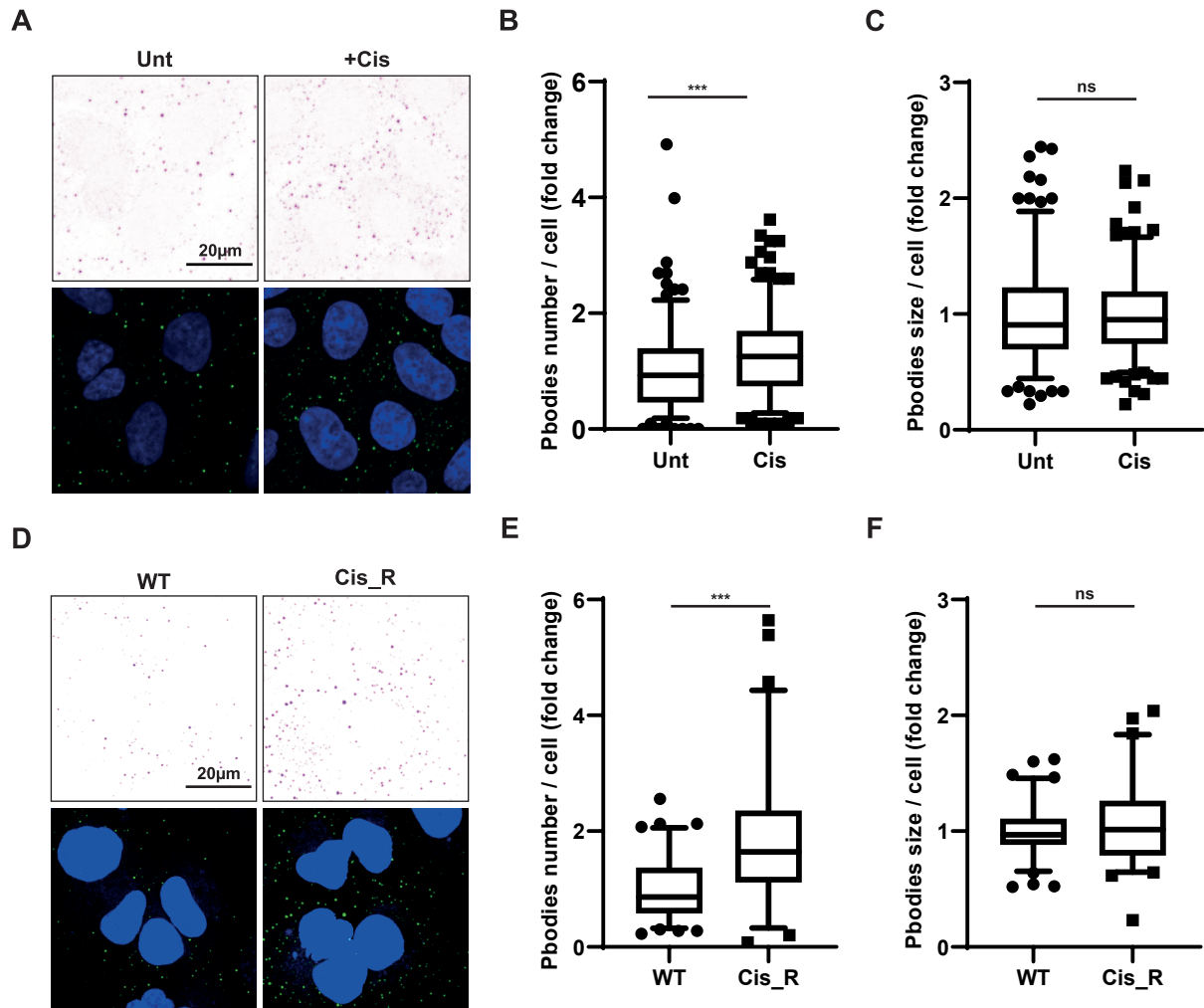


Figure Additionnelle 1 : Le traitement au cisplatine conduit à l'augmentation du nombre de p-bodies.

A-C. Les cellules A549 ont été traitées 24h avec du cisplatine à 15µM. **D-E.** Cellules A549 wild type (WT) et résistantes au cisplatine à 5µM. **A.** Analyse confocale des PBs utilisant un anticorps anti-DDX6 (vert/couleurs inversées) avec un marquage des noyaux au DAPI (bleu). **B.C.E.F.** Quantification du nombre et de la taille des PBs avec ImageJ. Les résultats sont représentatifs d'une expérience avec un minimum de 30 cellules dans chaque condition. Un test de Mann-Whitney a été réalisé pour l'analyse statistique (n.s. : non significatif). La P-value est indiquée par ***<0,005.

Dans le cas où les p-bodies joueraient un rôle dans la résistance cellulaire aux drogues, l'échelle de temps (24h) observée pour la surexpression de KRAS et de NRAS est trop courte pour conclure à un mécanisme de résistance génétique. De ce fait, la résistance observée serait un mécanisme non génétique défini comme la capacité à subir une reprogrammation transcriptionnelle et épigénétique en réponse à des défis environnementaux ou lors d'une thérapie. Dans cette étude, la mise en évidence des p-bodies comme un mécanisme de régulation post-transcriptionnel permettant la traduction d'ARNm stockés et réprimés, s'inscrit parfaitement dans la définition d'un mécanisme de résistance non génétique. Cependant, il existe deux types de résistances non génétiques : transitoire et stable. La différence entre un mécanisme de résistance stable ou transitoire se trouve principalement dans la persistance de la résistance après élimination du traitement. Afin de déterminer quel type de mécanisme de résistance est impliqué, nous pourrions cultiver les cellules résistantes sans traitement durant plusieurs semaines, puis réexposer les cellules au traitement à intervalle régulier de temps pour voir la perte ou le maintien de la résistance. Dans le cas où la même proportion de cellules que lors de la première exposition reste résistante au traitement, alors le mécanisme serait transitoire. Toutefois, si les cellules ont conservé leur phénotype résistant malgré l'absence de nouvelles mutations codantes, alors le mécanisme serait stable. Afin de s'assurer de la présence d'un mécanisme non génétique, nous pourrions rechercher la présence d'altérations génétiques par le séquençage du génome des lignées résistantes (whole-genome sequencing). Dans le cas d'une absence de mutation, il serait tout de même intéressant de rechercher la présence de modifications épigénétiques comme la méthylation de l'ARN (MeDIP-seq : Methylated DNA ImmunoPrecipitation sequencing). La présence d'altérations génétiques et/ou de modifications épigénétiques, permettrait en plus de la caractérisation du mécanisme de résistance d'en apprendre plus sur les gènes impliqués directement ou indirectement dans la régulation des p-bodies.

Pour aller plus loin, et dans le but de trouver des combinaisons thérapeutiques intéressantes, j'ai participé à la mise au point d'un protocole de criblage de drogues en collaboration avec la PCBIS (Plateforme de Chimie Biologique Intégrative de Strasbourg) afin de trouver d'autres molécules ayant un impact sur la régulation des p-bodies. De façon plus précise, le nombre de p-bodies en réponse à environ 1500 drogues approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) est suivi via la protéine DDX6 fusionnée à la GFP par prise de photo toutes les 4h de la phase et de la fluorescence, avec comme contrôle positif d'induction le TGF β (Hardy et al., 2017) et de dissolution les MEKi. A terme, ce criblage permettra à la fois d'en apprendre

plus sur les stress régulant les p-bodies (stress oxydant, agents alkylants ...) mais aussi de trouver des molécules capables de les réguler. Enfin, si les p-bodies participent à la résistance des cellules, les molécules régulant leur formation pourraient avoir un intérêt à être testées en combinaison afin de limiter la mise en place de résistances précoces via un mécanisme dépendant des p-bodies.

Concernant le second axe développé, je me suis intéressée au mécanisme de formation des p-bodies via l'étude de la protéine XRN1. J'ai défini deux régions nécessaires pour l'adressage de la protéine XRN1 dans les p-bodies : 1427-1448 et 1694-1706 situées dans la partie C-terminale et conservées chez les vertébrés.

Toutefois, dans le but de déterminer quel est le mécanisme d'adressage de la protéine XRN1 dans les p-bodies, il serait nécessaire de définir si ses zones d'adressages sont impliquées dans son interaction avec ses partenaires (EDC4, CNOT7/CAF1, PATL1) (Chang et al., 2019). Pour cela, sont mis au point dans le laboratoire des expériences d'immunoprécipitations, afin de déterminer l'effet de la perte des régions d'adressages sur l'interaction de XRN1 avec chacun de ses partenaires. Comme souligné précédemment, les partenaires de XRN1 ont été identifiés comme accumulés dans les p-bodies (Scheller et al., 2007; Yu et al., 2005; Zheng et al., 2008). Cependant, il ne faut pas exclure la possibilité que leurs interactions avec XRN1 aient lieu dans le cytoplasme. Pour cela, l'étude de la perte ou non de ces interactions dans des conditions de dissolution des p-bodies (siDDX6 / traitement MEKi), permettrait de définir si ces interactions ont lieux dans les p-bodies ou non.

Si ces interactions ont lieu dans le cytoplasme, il serait intéressant d'étudier si elles sont responsables du recrutement de XRN1 dans les p-bodies ou à l'inverse si XRN1 est responsable du recrutement de ses partenaires. Nous pourrions alors étudier, l'impact de la perte d'expression de XRN1 ou de ses partenaires (siRNA) sur leur localisation.

En conclusion, les résultats obtenus au cours de ma thèse vont contribuer à une meilleure connaissance sur le mécanisme et les protéines impliqués dans la formation des p-bodies.

REFERENCES :

- Addeo, A., Passaro, A., Malapelle, U., Banna, G.L., Subbiah, V., and Friedlaender, A. (2021). Immunotherapy in non-small cell lung cancer harbouring driver mutations. *Cancer Treatment Reviews* 96.
- Afonin, K.A., Viard, M., Koyfman, A.Y., Martins, A.N., Kasprzak, W.K., Panigaj, M., Desai, R., Santhanam, A., Grabow, W.W., Jaeger, L., et al. (2014). Multifunctional RNA Nanoparticles. *Nano Lett* 14, 5662–5671.
- Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.-W., and Bartel, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife* 4, e05005.
- Ahearn, I.M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., and Philips, M.R. (2011). Regulating the Regulator: Post-Translational Modification of Ras. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 10.1038/nrm3255.
- Ahearn, I.M., Court, H.R., Siddiqui, F., Abankwa, D., and Philips, M.R. (2021). NRAS is unique among RAS proteins in requiring ICMT for trafficking to the plasma membrane. *Life Sci Alliance* 4, e202000972.
- Akiyama, B.M., Laurence, H.M., Massey, A.R., Costantino, D.A., Xie, X., Yang, Y., Shi, P.-Y., Nix, J.C., Beckham, J.D., and Kieft, J.S. (2016). Zika virus produces non-coding RNAs using a multi-pseudoknot structure that confounds a cellular exonuclease. *Science* 354, 1148–1152.
- Alberti, S. (2017). Phase separation in biology. *Current Biology* 27, R1097–R1102.
- Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sitanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J., and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J* 13, 1610–1619.
- Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., and Saltiel, A.R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270, 27489–27494.
- Alexandrov, A., Chernyakov, I., Gu, W., Hiley, S.L., Hughes, T.R., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. (2006). Rapid tRNA Decay Can Result from Lack of Nonessential Modifications. *Molecular Cell* 21, 87–96.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421.
- Alix-Panabières, C., and Pantel, K. (2014). Technologies for detection of circulating tumor cells: facts and vision. *Lab Chip* 14, 57–62.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* 18, 5399–5410.
- Amberg, D.C., Goldstein, A.L., and Cole, C.N. (1992). Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev.* 6, 1173–1189.
- Ambrosini, G., Khanin, R., Carvajal, R.D., and Schwartz, G.K. (2014). Overexpression of DDX43 Mediates MEK Inhibitor Resistance through RAS Upregulation in Uveal Melanoma Cells. *Mol Cancer Ther* 13, 2073–2080.
- An, H., Lee, K.-H., and Kim, J. (2004). Identification of an exoribonuclease homolog, CaKEM1/CaXRN1, in *Candida albicans* and its characterization in filamentous growth. *FEMS Microbiology Letters* 235, 297–303.

- Anderson, P., and Kedersha, N. (2006). RNA granules. *J Cell Biol* 172, 803–808.
- Anderson, P., and Kedersha, N. (2009). Stress granules. *Current Biology* 19, R397–R398.
- Anderson, P., Kedersha, N., and Ivanov, P. (2015). Stress granules, P-bodies and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1849, 861–870.
- Andrei, M.A., Ingelfinger, D., Heintzmann, R., Achsel, T., Rivera-Pomar, R., and Lührmann, R. (2005). A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. *RNA* 11, 717–727.
- Anguera, G., and Majem, M. (2018). BRAF inhibitors in metastatic non-small cell lung cancer. *J Thorac Dis* 10, 589–592.
- Arcila, M.E., Drilon, A., Sylvester, B.E., Lovly, C.M., Borsu, L., Reva, B., Kris, M.G., Solit, D.B., and Ladanyi, M. (2015). MAP2K1 (MEK1) Mutations Define a Distinct Subset of Lung Adenocarcinoma Associated with Smoking. *Clin Cancer Res* 21, 1935–1943.
- Ariumi, Y., Kuroki, M., Kushima, Y., Osugi, K., Hijikata, M., Maki, M., Ikeda, M., and Kato, N. (2011). Hepatitis C Virus Hijacks P-Body and Stress Granule Components around Lipid Droplets. *J Virol* 85, 6882–6892.
- Arteaga, C.L., and Engelman, J.A. (2014). ERBB receptors: From oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell* 25, 282–303.
- Athapattu, U.S., Amarasekara, C.A., Immel, J.R., Bloom, S., Barany, F., Nagel, A.C., and Soper, S.A. (2021). Solid-phase XRN1 reactions for RNA cleavage: application in single-molecule sequencing. *Nucleic Acids Res* 49, e41.
- Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., and Weil, D. (2015). P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Mol Biol Cell* 26, 2579–2595.
- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriantseva, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007). Telomeric Repeat-Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science* 318, 798–801.
- Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2004). Targeted mRNA Degradation by Deadenylation-Independent Decapping. *Molecular Cell* 15, 5–15.
- Balak, C., Benard, M., Schaefer, E., Iqbal, S., Ramsey, K., Ernoult-Lange, M., Mattioli, F., Llací, L., Geoffroy, V., Courel, M., et al. (2019). Rare De Novo Missense Variants in RNA Helicase DDX6 Cause Intellectual Disability and Dysmorphic Features and Lead to P-Body Defects and RNA Dysregulation. *Am J Hum Genet* 105, 509–525.
- Balistreri, G., Bognanni, C., and Mühlemann, O. (2017). Virus Escape and Manipulation of Cellular Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Viruses* 9.
- Banani, S.F., Rice, A.M., Peeples, W.B., Lin, Y., Jain, S., Parker, R., and Rosen, M.K. (2016). Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell* 166, 651–663.
- Banani, S.F., Lee, H.O., Hyman, A.A., and Rosen, M.K. (2017). Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18, 285–298.
- Bang, Y.-J. (2011). The potential for crizotinib in non-small cell lung cancer: a perspective review. *Ther Adv Med Oncol* 3, 279–291.

- Bang, Y.J., Kwon, J.H., Kang, S.H., Kim, J.W., and Yang, Y.C. (1998). Increased MAPK activity and MKP-1 overexpression in human gastric adenocarcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 43–47.
- Barbosa, R., Acevedo, L.A., and Marmorstein, R. (2021). The MEK/ERK Network as a Therapeutic Target in Human Cancer. *Mol Cancer Res* 19, 361–374.
- Barrett, S.D., Bridges, A.J., Dudley, D.T., Saltiel, A.R., Fergus, J.H., Flamme, C.M., Delaney, A.M., Kaufman, M., LePage, S., Leopold, W.R., et al. (2008). The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 18, 6501–6504.
- Bashkirov, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.-M., and Heyer, W.-D. (1997). A Mouse Cytoplasmic Exoribonuclease (mXRN1p) with Preference for G4 Tetraplex Substrates. *J Cell Biol* 136, 761–773.
- Basquin, J., Roudko, V.V., Rode, M., Basquin, C., Séraphin, B., and Conti, E. (2012). Architecture of the Nuclease Module of the Yeast Ccr4-Not Complex: the Not1-Caf1-Ccr4 Interaction. *Molecular Cell* 48, 207–218.
- Baxevasos, P., and Mountzios, G. (2018). Novel chemotherapy regimens for advanced lung cancer: have we reached a plateau? *Ann Transl Med* 6, 139.
- Behrens, A., Sibilía, M., and Wagner, E.F. (1999). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat Genet* 21, 326–329.
- Bélanger, L.-F., Roy, S., Tremblay, M., Brott, B., Steff, A.-M., Mourad, W., Hugo, P., Erikson, R., and Charron, J. (2003). Mek2 Is Dispensable for Mouse Growth and Development. *Mol Cell Biol* 23, 4778–4787.
- Bell, C.C., Fennell, K.A., Chan, Y.-C., Rambow, F., Yeung, M.M., Vassiliadis, D., Lara, L., Yeh, P., Martelotto, L.G., Rogiers, A., et al. (2019). Targeting enhancer switching overcomes non-genetic drug resistance in acute myeloid leukaemia. *Nat Commun* 10, 2723.
- Berchtold, D., Battich, N., and Pelkmans, L. (2018). A Systems-Level Study Reveals Regulators of Membrane-less Organelles in Human Cells. *Molecular Cell* 72, 1035-1049.e5.
- Berezhna, S.Yu., Supekova, L., Sever, M.J., Schultz, P.G., and Deniz, A.A. (2011). Dual regulation of hepatitis C viral RNA by cellular RNAi requires partitioning of Ago2 to lipid droplets and P-bodies. *RNA* 17, 1831–1845.
- Bergo, M.O., Gavino, B.J., Hong, C., Beigneux, A.P., McMahon, M., Casey, P.J., and Young, S.G. (2004). Inactivation of *Icmt* inhibits transformation by oncogenic K-Ras and B-Raf. *J Clin Invest* 113, 539–550.
- Bhartiya, D., and Singh, J. (2015). FSH-FSHR3-stem cells in ovary surface epithelium: basis for adult ovarian biology, failure, aging, and cancer. *Reproduction* 149, R35-48.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* 125, 1111–1124.
- Biegel, J.M., and Pagar, C.T. (2016). Hepatitis C Virus Exploitation of Processing Bodies. *J Virol* 90, 4860–4863.
- Bigger, J.W. (1944). Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin by Intermittent Sterilisation. *Lancet* 497–500.

Billmeier, S.E., Ayanian, J.Z., Zaslavsky, A.M., Nerenz, D.R., Jaklitsch, M.T., and Rogers, S.O. (2011). Predictors and Outcomes of Limited Resection for Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst* 103, 1621–1629.

Boehm, V., Kueckelmann, S., Gerbracht, J.V., Kallabis, S., Britto-Borges, T., Altmüller, J., Krüger, M., Dieterich, C., and Gehring, N.H. (2021). SMG5-SMG7 authorize nonsense-mediated mRNA decay by enabling SMG6 endonucleolytic activity. *Nat Commun* 12, 3965.

Boisvert, F.-M., van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 574–585.

Bono, F., and Gehring, N.H. (2011). Assembly, disassembly and recycling. *RNA Biol* 8, 24–29.

Boshuizen, J., Koopman, L.A., Krijgsman, O., Shahrabi, A., van den Heuvel, E.G., Ligtenberg, M.A., Vredevoogd, D.W., Kemper, K., Kuilman, T., Song, J.-Y., et al. (2018). Cooperative targeting of melanoma heterogeneity with an AXL antibody-drug conjugate and BRAF/MEK inhibitors. *Nat Med* 24, 203–212.

Bossi, P., Resteghini, C., Paielli, N., Licitra, L., Pilotti, S., and Perrone, F. (2016). Prognostic and predictive value of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 7, 74362–74379.

Boumahdi, S., and de Sauvage, F.J. (2020). The great escape: tumour cell plasticity in resistance to targeted therapy. *Nat Rev Drug Discov* 19, 39–56.

Boundedjah, O., Desforges, B., Wu, T.-D., Pioche-Durieu, C., Marco, S., Hamon, L., Curmi, P.A., Guerquin-Kern, J.-L., Piétrement, O., and Pastré, D. (2014). Free mRNA in excess upon polysome dissociation is a scaffold for protein multimerization to form stress granules. *Nucleic Acids Res* 42, 8678–8691.

Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a Regulated Pathway for Nuclear Pre-mRNA Turnover. *Cell* 102, 765–775.

Boyartchuk, V.L., Ashby, M.N., and Rine, J. (1997). Modulation of Ras and a-Factor Function by Carboxyl-Terminal Proteolysis. *Science* 275, 1796–1800.

Boykevich, S., Zhao, C., Sondermann, H., Philippidou, P., Halegoua, S., Kuriyan, J., and Bar-Sagi, D. (2006). Regulation of ras signaling dynamics by Sos-mediated positive feedback. *Curr Biol* 16, 2173–2179.

Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q.M., Hwu, W.-J., Topalian, S.L., Hwu, P., Drake, C.G., Camacho, L.H., Kauh, J., Odunsi, K., et al. (2012). Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med* 366, 2455–2465.

Brangwynne, C.P., Eckmann, C.R., Courson, D.S., Rybarska, A., Hoege, C., Gharakhani, J., Jülicher, F., and Hyman, A.A. (2009). Germline P Granules Are Liquid Droplets That Localize by Controlled Dissolution/Condensation. *Science* 324, 1729–1732.

Brangwynne, C.P., Tompa, P., and Pappu, R.V. (2015). Polymer physics of intracellular phase transitions. *Nature Physics* 11, 899–904.

Braun, J.E., Truffault, V., Boland, A., Huntzinger, E., Chang, C.-T., Haas, G., Weichenrieder, O., Coles, M., and Izaurralde, E. (2012). A direct interaction between DCP1 and XRN1 couples mRNA decapping to 5' exonucleolytic degradation. *Nature Structural & Molecular Biology* 19, 1324–1331.

Bresson, S., and Tollervey, D. (2018). Surveillance-ready transcription: nuclear RNA decay as a default fate. *Open Biol* 8.

- Buchan, J.R. (2014). mRNP granules. *RNA Biol* 11, 1019–1030.
- Buday, L., and Downward, J. (2008). Many faces of Ras activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1786, 178–187.
- Bühler, M., Steiner, S., Mohn, F., Paillusson, A., and Mühlemann, O. (2006). EJC-independent degradation of nonsense immunoglobulin- μ mRNA depends on 3' UTR length. *Nat Struct Mol Biol* 13, 462–464.
- Campbell, J.D., Alexandrov, A., Kim, J., Wala, J., Berger, A.H., Pedamallu, C.S., Shukla, S.A., Guo, G., Brooks, A.N., Murray, B.A., et al. (2016). Distinct patterns of somatic genome alterations in lung adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Nat Genet* 48, 607–616.
- Canon, J., Rex, K., Saiki, A.Y., Mohr, C., Cooke, K., Bagal, D., Gaida, K., Holt, T., Knutson, C.G., Koppada, N., et al. (2019). The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* 575, 217–223.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655–1657.
- Casar, B., Badrock, A.P., Jiménez, I., Arozarena, I., Colón-Bolea, P., Lorenzo-Martín, L.F., Barinaga-Rementería, I., Barriuso, J., Cappitelli, V., Donoghue, D.J., et al. (2018). RAS at the Golgi antagonizes malignant transformation through PTPR κ -mediated inhibition of ERK activation. *Nat Commun* 9, 3595.
- Casey, P.J., Solski, P.A., Der, C.J., and Buss, J.E. (1989). p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 8323–8327.
- Casey, P.J., Thissen, J.A., and Moomaw, J.F. (1991). Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8631–8635.
- Cassier, E., Gallay, N., Bourquard, T., Claeysen, S., Bockaert, J., Crépieux, P., Poupon, A., Reiter, E., Marin, P., and Vandermoere, F. (2017). Phosphorylation of β -arrestin2 at Thr383 by MEK underlies β -arrestin-dependent activation of Erk1/2 by GPCRs. *Elife* 6, e23777.
- Castellano, E., and Downward, J. (2010). Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr Top Microbiol Immunol* 346, 143–169.
- Castellano, E., and Downward, J. (2011). RAS Interaction with PI3K. *Genes Cancer* 2, 261–274.
- de Castro, E., Sigrist, C.J.A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P.S., Gasteiger, E., Bairoch, A., and Hulo, N. (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res* 34, W362–W365.
- Catara, G., Grimaldi, G., Schembri, L., Spano, D., Turacchio, G., Lo Monte, M., Beccari, A.R., Valente, C., and Corda, D. (2017). PARP1-produced poly-ADP-ribose causes the PARP12 translocation to stress granules and impairment of Golgi complex functions. *Sci Rep* 7, 14035.
- Caunt, C.J., Sale, M.J., Smith, P.D., and Cook, S.J. (2015). MEK1 and MEK2 inhibitors and cancer therapy: the long and winding road. *Nat Rev Cancer* 15, 577–592.
- Cerutti, H., and Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet* 50, 81–99.
- Cesena, D., Cassani, C., Rizzo, E., Lisby, M., Bonetti, D., and Longhese, M.P. (2017). Regulation of telomere metabolism by the RNA processing protein Xrn1. *Nucleic Acids Res.* 45, 3860–3874.

- Chahar, H.S., Chen, S., and Manjunath, N. (2013). P-body components LSM1, GW182, DDX3, DDX6 and XRN1 are recruited to WNV replication sites and positively regulate viral replication. *Virology* 436, 1–7.
- Chandradoss, S.D., Schirle, N.T., Szczepaniak, M., MacRae, I.J., and Joo, C. (2015). A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. *Cell* 162, 96–107.
- Chanfreau, G., Rotondo, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998). Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *EMBO J* 17, 3726–3737.
- Chang, C.-T., Bercovich, N., Loh, B., Jonas, S., and Izaurralde, E. (2014). The activation of the decapping enzyme DCP2 by DCP1 occurs on the EDC4 scaffold and involves a conserved loop in DCP1. *Nucleic Acids Res* 42, 5217–5233.
- Chang, C.-T., Muthukumar, S., Weber, R., Levdansky, Y., Chen, Y., Bhandari, D., Igreja, C., Wohlbold, L., Valkov, E., and Izaurralde, E. (2019). A low-complexity region in human XRN1 directly recruits deadenylation and decapping factors in 5′-3′ messenger RNA decay. *Nucleic Acids Res.* 47, 9282–9295.
- Chang, D.C., Hoang, L.T., Mohamed Naim, A.N., Dong, H., Schreiber, M.J., Hibberd, M.L., Tan, M.J.A., and Shi, P.-Y. (2016). Evasion of early innate immune response by 2′-O-methylation of dengue genomic RNA. *Virology* 499, 259–266.
- Chang, J.H., Xiang, S., Xiang, K., Manley, J.L., and Tong, L. (2011). Structural and biochemical studies of the 5′→3′ exoribonuclease Xrn1. *Nat Struct Mol Biol* 18, 270–276.
- Chansky, K., Detterbeck, F.C., Nicholson, A.G., Rusch, V.W., Vallières, E., Groome, P., Kennedy, C., Krasnik, M., Peake, M., Shemanski, L., et al. (2017). The IASLC Lung Cancer Staging Project: External Validation of the Revision of the TNM Stage Groupings in the Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 12, 1109–1121.
- Chapman, E.G., Costantino, D.A., Rabe, J.L., Moon, S.L., Wilusz, J., Nix, J.C., and Kieft, J.S. (2014a). The structural basis of pathogenic subgenomic flavivirus RNA (sRNA) production. *Science* 344, 307–310.
- Chapman, E.G., Moon, S.L., Wilusz, J., and Kieft, J.S. (2014b). RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *ELife* 3.
- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., et al. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 364, 2507–2516.
- Charenton, C., Taverniti, V., Gaudon-Plesse, C., Back, R., Séraphin, B., and Graille, M. (2016). Structure of the active form of Dcp1–Dcp2 decapping enzyme bound to m7GDP and its Edc3 activator. *Nat Struct Mol Biol* 23, 982–986.
- Charenton, C., Gaudon-Plesse, C., Fourati, Z., Taverniti, V., Back, R., Kolesnikova, O., Séraphin, B., and Graille, M. (2017). A unique surface on Pat1 C-terminal domain directly interacts with Dcp2 decapping enzyme and Xrn1 5′–3′ mRNA exonuclease in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E9493–E9501.
- Charley, P.A., Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2018). Identification of phlebovirus and arenavirus RNA sequences that stall and repress the exoribonuclease XRN1. *J Biol Chem* 293, 285–295.
- Chatterjee, S., and Grosshans, H. (2009). Active turnover modulates mature microRNA activity in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 461, 546–549.

- Chawla, R., Redon, S., Raftopoulou, C., Wischnewski, H., Gagos, S., and Azzalin, C.M. (2011). Human UPF1 interacts with TPP1 and telomerase and sustains telomere leading-strand replication. *EMBO J* 30, 4047–4058.
- Chen, C.-Y.A., and Shyu, A.-B. (2011). Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2, 167–183.
- Chen, L., Muhrad, D., Hauryliuk, V., Cheng, Z., Lim, M.K., Shyp, V., Parker, R., and Song, H. (2010). Structure of the Dom34–Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nature Structural & Molecular Biology* 17, 1233–1240.
- Chen, Y., Boland, A., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Bawankar, P., Loh, B., Chang, C.-T., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2014). A DDX6–CNOT1 Complex and W-Binding Pockets in CNOT9 Reveal Direct Links between miRNA Target Recognition and Silencing. *Molecular Cell* 54, 737–750.
- Chernyakov, I., Whipple, J.M., Kotelawala, L., Grayhack, E.J., and Phizicky, E.M. (2008). Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5′–3′ exonucleases Rat1 and Xrn1. *Genes Dev* 22, 1369–1380.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: The exosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 552–560.
- Cho, H., Kim, K.M., and 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.
- Chong, H., and Guan, K.-L. (2003). Regulation of Raf through Phosphorylation and N Terminus–C Terminus Interaction*. *Journal of Biological Chemistry* 278, 36269–36276.
- Chowdhury, A., Mukhopadhyay, J., and Tharun, S. (2007). The decapping activator Lsm1p–7p–Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *RNA* 13, 998–1016.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., and Philips, M.R. (1999). Endomembrane Trafficking of Ras: The CAAX Motif Targets Proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 69–80.
- Coller, J., and Parker, R. (2004). Eukaryotic mRNA Decapping. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 861–890.
- Corbalan-Garcia, S., Yang, S.S., Degenhardt, K.R., and Bar-Sagi, D. (1996). Identification of the mitogen-activated protein kinase phosphorylation sites on human Sos1 that regulate interaction with Grb2. *Mol Cell Biol* 16, 5674–5682.
- Cougot, N., Babajko, S., and Séraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol* 165, 31–40.
- Cougot, N., Cavalier, A., Thomas, D., and Gillet, R. (2012). The Dual Organization of P-bodies Revealed by Immunoelectron Microscopy and Electron Tomography. *Journal of Molecular Biology* 420, 17–28.
- Courel, M., Clément, Y., Bossevain, C., Foretek, D., Vidal Cruchez, O., Yi, Z., Bénard, M., Benassy, M.-N., Kress, M., Vindry, C., et al. (2019). GC content shapes mRNA storage and decay in human cells. *ELife* 8.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., and Marshall, C.J. (1994). Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841–852.

- D'Adamo, D.R., Novick, S., Kahn, J.M., Leonardi, P., and Pellicer, A. (1997). rsc: a novel oncogene with structural and functional homology with the gene family of exchange factors for Ral. *Oncogene* *14*, 1295–1305.
- Dallas, N.A., Xia, L., Fan, F., Gray, M.J., Gaur, P., van Buren, G., Samuel, S., Kim, M.P., Lim, S.J., and Ellis, L.M. (2009). Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition. *Cancer Res* *69*, 1951–1957.
- Damgaard, C.K., and Lykke-Andersen, J. (2011). Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev* *25*, 2057–2068.
- Darling, A.L., Liu, Y., Oldfield, C.J., and Uversky, V.N. (2018). Intrinsically Disordered Proteome of Human Membrane-Less Organelles. *PROTEOMICS* *18*, 1700193.
- Dasari, S., and Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* *740*, 364–378.
- Davidson, L., Kerr, A., and West, S. (2012). Co-transcriptional degradation of aberrant pre-mRNA by Xrn2. *EMBO J* *31*, 2566–2578.
- Davies, B.R., Logie, A., McKay, J.S., Martin, P., Steele, S., Jenkins, R., Cockerill, M., Cartlidge, S., and Smith, P.D. (2007). AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol Cancer Ther* *6*, 2209–2219.
- Decker, C.J., and Parker, R. (2012). P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*, a012286.
- Decker, C.J., Teixeira, D., and Parker, R. (2007). Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* *179*, 437–449.
- Dengl, S., and Cramer, P. (2009). Torpedo Nuclease Rat1 Is Insufficient to Terminate RNA Polymerase II in Vitro. *J Biol Chem* *284*, 21270–21279.
- Deniaud, A., Karuppasamy, M., Bock, T., Masiulis, S., Huard, K., Garzoni, F., Kerschgens, K., Hentze, M.W., Kulozik, A.E., Beck, M., et al. (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.
- Di Segni, G., McConaughy, B.L., Shapiro, R.A., Aldrich, T.L., and Hall, B.D. (1993). TAP1, a yeast gene that activates the expression of a tRNA gene with a defective internal promoter. *Mol Cell Biol* *13*, 3424–3433.
- Didkowska, J., Wojciechowska, U., Mańczuk, M., and Łobaszewski, J. (2016). Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide. *Ann Transl Med* *4*, 150.
- Dignon, G.L., Best, R.B., and Mittal, J. (2020). Biomolecular Phase Separation: From Molecular Driving Forces to Macroscopic Properties. *Annu. Rev. Phys. Chem.* *71*, 53–75.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J* *21*, 6915–6924.
- Dilweg, I.W., Gulyaev, A.P., and Olsthoorn, R.C. (2019). Structural features of an Xrn1-resistant plant virus RNA. *RNA Biol* *16*, 838–845.

- Ding, M., Lin, B., Li, T., Liu, Y., Li, Y., Zhou, X., Miao, M., Gu, J., Pan, H., Yang, F., et al. (2015). A dual yet opposite growth-regulating function of miR-204 and its target XRN1 in prostate adenocarcinoma cells and neuroendocrine-like prostate cancer cells. *Oncotarget* 6, 7686–7700.
- D’Lima, N.G., Ma, J., Winkler, L., Chu, Q., Loh, K.H., Corpuz, E.O., Budnik, B.A., Lykke-Andersen, J., Saghatelian, A., and Slavoff, S.A. (2017). A human microprotein that interacts with the mRNA decapping complex. *Nat Chem Biol* 13, 174–180.
- Dogan, S., Shen, R., Ang, D.C., Johnson, M.L., D’Angelo, S.P., Paik, P.K., Brzostowski, E.B., Riely, G.J., Kris, M.G., Zakowski, M.F., et al. (2012). Molecular Epidemiology of EGFR and KRAS Mutations in 3026 Lung Adenocarcinomas: Higher Susceptibility of Women to Smoking-related KRAS-mutant Cancers. *Clin Cancer Res* 18, 6169–6177.
- Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440, 561–564.
- Dombi, E., Baldwin, A., Marcus, L.J., Fisher, M.J., Weiss, B., Kim, A., Whitcomb, P., Martin, S., Aschbacher-Smith, L.E., Rizvi, T.A., et al. (2016). Activity of Selumetinib in Neurofibromatosis Type 1-Related Plexiform Neurofibromas. *N Engl J Med* 375, 2550–2560.
- Dominski, Z., and Marzluff, W.F. (1999). Formation of the 3’ end of histone mRNA. *Gene* 239, 1–14.
- Dong, Y., Yang, J., Ye, W., Wang, Y., Miao, Y., Ding, T., Xiang, C., Lei, Y., and Xu, Z. (2015). LSM1 binds to the Dengue virus RNA 3’ UTR and is a positive regulator of Dengue virus replication. *International Journal of Molecular Medicine* 35, 1683–1689.
- Dougherty, M.K., Müller, J., Ritt, D.A., Zhou, M., Zhou, X.Z., Copeland, T.D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Lu, K.P., and Morrison, D.K. (2005). Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. *Mol Cell* 17, 215–224.
- Douillard, J.-Y., Rosell, R., Lena, M.D., Carpagnano, F., Ramlau, R., González-Larriba, J.L., Grodzki, T., Pereira, J.R., Groumellec, A.L., Lorusso, V., et al. (2006). Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *The Lancet Oncology* 7, 719–727.
- Drilon, A., Wang, L., Hasanovic, A., Suehara, Y., Lipson, D., Stephens, P., Ross, J., Miller, V., Ginsberg, M., Zakowski, M.F., et al. (2013). Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov* 3, 630–635.
- Drilon, A., Bergagnini, I., Delasos, L., Sabari, J., Woo, K.M., Plodkowski, A., Wang, L., Hellmann, M.D., Joubert, P., Sima, C.S., et al. (2016). Clinical outcomes with pemetrexed-based systemic therapies in RET-rearranged lung cancers. *Ann Oncol* 27, 1286–1291.
- Du, Z., and Lovly, C.M. (2018). Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer. *Mol Cancer* 17, 58.
- Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., Ma, J., and Wu, L. (2016). YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4–NOT deadenylase complex. *Nat Commun* 7.
- Dubnau, J., Chiang, A.-S., Grady, L., Barditch, J., Gossweiler, S., McNeil, J., Smith, P., Buldoc, F., Scott, R., Certa, U., et al. (2003). The staußen/pumilio Pathway Is Involved in *Drosophila* Long-Term Memory. *Current Biology* 13, 286–296.

Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J., and Saltiel, A.R. (1995). A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7686–7689.

Durand, S., Cougot, N., Mahuteau-Betzer, F., Nguyen, C.-H., Grierson, D.S., Bertrand, E., Tazi, J., and Lejeune, F. (2007). Inhibition of nonsense-mediated mRNA decay (NMD) by a new chemical molecule reveals the dynamic of NMD factors in P-bodies. *J Cell Biol* 178, 1145–1160.

Durrant, D.E., and Morrison, D.K. (2018). Targeting the Raf kinases in human cancer: the Raf dimer dilemma. *Br J Cancer* 118, 3–8.

Eberle, A.B., Stalder, L., Mathys, H., Orozco, R.Z., and Mühlemann, O. (2008). Posttranscriptional Gene Regulation by Spatial Rearrangement of the 3' Untranslated Region. *PLoS Biol* 6.

Eisinger-Mathason, T.S.K., Andrade, J., Groehler, A.L., Clark, D.E., Muratore-Schroeder, T.L., Pasic, L., Smith, J.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Macara, I.G., et al. (2008). Co-dependent functions of RSK2 and the apoptosis promoting factor, TIA-1, in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell* 31, 722–736.

El Hage, A., Koper, M., Kufel, J., and Tollervey, D. (2008). Efficient termination of transcription by RNA polymerase I requires the 5' exonuclease Rat1 in yeast. *Genes Dev.* 22, 1069–1081.

Emara, M.M., and Brinton, M.A. (2007). Interaction of TIA-1/TIAR with West Nile and dengue virus products in infected cells interferes with stress granule formation and processing body assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 9041–9046.

Ercan, D., Xu, C., Yanagita, M., Monast, C.S., Pratilas, C.A., Montero, J., Butaney, M., Shimamura, T., Sholl, L., Ivanova, E.V., et al. (2012). Reactivation of ERK Signaling causes resistance to EGFR kinase inhibitors. *Cancer Discov* 2, 934–947.

Erlanson, D.A., Braisted, A.C., Raphael, D.R., Randal, M., Stroud, R.M., Gordon, E.M., and Wells, J.A. (2000). Site-directed ligand discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9367–9372.

Estep, A.L., Palmer, C., McCormick, F., and Rauen, K.A. (2007). Mutation analysis of BRAF, MEK1 and MEK2 in 15 ovarian cancer cell lines: implications for therapy. *PLoS One* 2, e1279.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007a). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 9–22.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., and Izaurralde, E. (2007b). P-Body Formation Is a Consequence, Not the Cause, of RNA-Mediated Gene Silencing. *Mol Cell Biol* 27, 3970–3981.

Eystathioy, T., JAKYMIW, A., CHAN, E.K.L., SÉRAPHIN, B., COUGOT, N., and FRITZLER, M.J. (2003). The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA* 9, 1171–1173.

Fabian, J.R., Vojtek, A.B., Cooper, J.A., and Morrison, D.K. (1994). A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding and alters Raf-1 function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5982–5986.

Falchook, G.S., Ordóñez, N.G., Bastida, C.C., Stephens, P.J., Miller, V.A., Gaido, L., Jackson, T., and Karp, D.D. (2016). Effect of the RET Inhibitor Vandetanib in a Patient With RET Fusion-Positive Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 34, e141-144.

Fallahi-Sichani, M., Becker, V., Izar, B., Baker, G.J., Lin, J., Boswell, S.A., Shah, P., Rotem, A., Garraway, L.A., and Sorger, P.K. (2017). Adaptive resistance of melanoma cells to RAF inhibition via reversible induction of a slowly dividing de-differentiated state. *Mol Syst Biol* 13, 905.

- Fatscher, T., Boehm, V., and Gehring, N.H. (2015). Mechanism, factors, and physiological role of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4523–4544.
- Favata, M.F., Horiuchi, K.Y., Manos, E.J., Daulerio, A.J., Stradley, D.A., Feese, W.S., Van Dyk, D.E., Pitts, W.J., Earl, R.A., Hobbs, F., et al. (1998). Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18623–18632.
- Fedorenko, I.V., Paraiso, K.H.T., and Smalley, K.S.M. (2011). Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem Pharmacol* 82, 201–209.
- Fehrenbacher, N., Bar-Sagi, D., and Philips, M. (2009). Ras/MAPK signaling from endomembranes. *Mol Oncol* 3, 297–307.
- Feillet, C., Krusche, P., Tamanini, F., Janssens, R.C., Downey, M.J., Martin, P., Teboul, M., Saito, S., Lévi, F.A., Bretschneider, T., et al. (2014). Phase locking and multiple oscillating attractors for the coupled mammalian clock and cell cycle. *PNAS* 111, 9828–9833.
- Ferraiuolo, M.A., Basak, S., Dostie, J., Murray, E.L., Schoenberg, D.R., and Sonenberg, N. (2005). A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *J Cell Biol* 170, 913–924.
- Fiorini, F., Bagchi, D., Le Hir, H., and Croquette, V. (2015). Human Upf1 is a highly processive RNA helicase and translocase with RNP remodelling activities. *Nat Commun* 6.
- Fischer, B.M., Mortensen, J., Hansen, H., Vilman, P., Larsen, S.S., Loft, A., Bertelsen, A.K., Ravn, J., Clementsen, P., Høegholm, A., et al. (2011). Multimodality approach to mediastinal staging in non-small cell lung cancer. Faults and benefits of PET-CT: a randomised trial. *Thorax* 66, 294–300.
- Fischmann, T.O., Smith, C.K., Mayhood, T.W., Myers, J.E., Reichert, P., Mannarino, A., Carr, D., Zhu, H., Wong, J., Yang, R.-S., et al. (2009). Crystal structures of MEK1 binary and ternary complexes with nucleotides and inhibitors. *Biochemistry* 48, 2661–2674.
- Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L.V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., et al. (2012a). Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma (Massachusetts Medical Society).
- Flaherty, K.T., Infante, J.R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R.F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., et al. (2012b). Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med* 367, 1694–1703.
- Flock, T., Weatheritt, R.J., Latysheva, N.S., and Babu, M.M. (2014). Controlling entropy to tune the functions of intrinsically disordered regions. *Current Opinion in Structural Biology* 26, 62–72.
- Florea, A.-M., and Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers (Basel)* 3, 1351–1371.
- Flores, K., and Seger, R. (2013). Stimulated nuclear import by β -like importins. *F1000Prime Rep* 5, 41.
- Flusberg, D.A., Roux, J., Spencer, S.L., and Sorger, P.K. (2013). Cells surviving fractional killing by TRAIL exhibit transient but sustainable resistance and inflammatory phenotypes. *Mol Biol Cell* 24, 2186–2200.
- Follwaczny, P., Schieweck, R., Riedemann, T., Demleitner, A., Straub, T., Klemm, A.H., Bilban, M., Sutor, B., Popper, B., and Kiebler, M.A. (2017). Pumilio2-deficient mice show a predisposition for epilepsy. *Dis Model Mech* 10, 1333–1342.

- Fong, C.Y., Gilan, O., Lam, E.Y.N., Rubin, A.F., Ftouni, S., Tyler, D., Stanley, K., Sinha, D., Yeh, P., Morison, J., et al. (2015). BET inhibitor resistance emerges from leukaemia stem cells. *Nature* 525, 538–542.
- Forbes, S.A., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., Ding, M., Bamford, S., Cole, C., Ward, S., et al. (2015). COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res* 43, D805-811.
- Franks, T.M., and Lykke-Andersen, J. (2007). TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev* 21, 719–735.
- Frischmeyer, P.A., Hoof, A. van, O'Donnell, K., Guerrerrio, A.L., Parker, R., and Dietz, H.C. (2002). An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons. *Science* 295, 2258–2261.
- Fromm, S.A., Truffault, V., Kamenz, J., Braun, J.E., Hoffmann, N.A., Izaurralde, E., and Sprangers, R. (2012). The structural basis of Edc3- and Scd6-mediated activation of the Dcp1:Dcp2 mRNA decapping complex. *EMBO J* 31, 279–290.
- Fujimoto, J., and Wistuba, I.I. (2014). Current Concepts on the Molecular Pathology of Non-small Cell Lung Carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 31, 306–313.
- Fukao, A., Tomohiro, T., and Fujiwara, T. (2021). Translation Initiation Regulated by RNA-Binding Protein in Mammals: The Modulation of Translation Initiation Complex by Trans-Acting Factors. *Cells* 10, 1711.
- Funk, A., Truong, K., Nagasaki, T., Torres, S., Floden, N., Balmori Melian, E., Edmonds, J., Dong, H., Shi, P.-Y., and Khromykh, A.A. (2010). RNA Structures Required for Production of Subgenomic Flavivirus RNA. *J Virol* 84, 11407–11417.
- Fusi, A., Metcalf, R., Krebs, M., Dive, C., and Blackhall, F. (2013). Clinical utility of circulating tumour cell detection in non-small-cell lung cancer. *Curr Treat Options Oncol* 14, 610–622.
- Gallois-Montbrun, S., Kramer, B., Swanson, C.M., Byers, H., Lynham, S., Ward, M., and Malim, M.H. (2007). Antiviral Protein APOBEC3G Localizes to Ribonucleoprotein Complexes Found in P Bodies and Stress Granules. *J Virol* 81, 2165–2178.
- Gandhi, L., Rodríguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M.J., Powell, S.F., et al. (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 378, 2078–2092.
- Garcia-Jove Navarro, M., Kashida, S., Chouaib, R., Souquere, S., Pierron, G., Weil, D., and Gueroui, Z. (2019). RNA is a critical element for the sizing and the composition of phase-separated RNA–protein condensates. *Nat Commun* 10, 3230.
- Garneau, N.L., Sokoloski, K.J., Opyrchal, M., Neff, C.P., Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2008). The 3' Untranslated Region of Sindbis Virus Represses Deadenylation of Viral Transcripts in Mosquito and Mammalian Cells. *J Virol* 82, 880–892.
- van Geel, R.M.J.M., van Brummelen, E.M.J., Eskens, F.A.L.M., Huijberts, S.C.F.A., de Vos, F.Y.F.L., Lolkema, M.P.J.K., Devriese, L.A., Opdam, F.L., Marchetti, S., Steeghs, N., et al. (2020). Phase 1 study of the pan-HER inhibitor dacomitinib plus the MEK1/2 inhibitor PD-0325901 in patients with KRAS-mutation-positive colorectal, non-small-cell lung and pancreatic cancer. *Br J Cancer* 122, 1166–1174.
- Gehring, N.H., Lamprinaki, S., Kulozik, A.E., and Hentze, M.W. (2009). Disassembly of Exon Junction Complexes by PYM. *Cell* 137, 536–548.

- Gelabert-Baldrich, M., Soriano-Castell, D., Calvo, M., Lu, A., Viña-Vilaseca, A., Rentero, C., Pol, A., Grinstein, S., Enrich, C., and Tebar, F. (2014). Dynamics of KRas on endosomes: involvement of acidic phospholipids in its association. *FASEB J* 28, 3023–3037.
- Gennarino, V.A., Singh, R.K., White, J.J., De Maio, A., Han, K., Kim, J.-Y., Jafar-Nejad, P., di Ronza, A., Kang, H., Sayegh, L.S., et al. (2015). Pumilio1 Haploinsufficiency Leads to SCA1-like Neurodegeneration by Increasing Wild-Type Ataxin1 Levels. *Cell* 160, 1087–1098.
- Gibney, G.T., Messina, J.L., Fedorenko, I.V., Sondak, V.K., and Smalley, K.S.M. (2013). Paradoxical oncogenesis and the long term consequences of BRAF inhibition in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol* 10, 390–399.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., and Anderson, P. (2004). Stress Granule Assembly Is Mediated by Prion-like Aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15, 5383–5398.
- Gilmartin, A.G., Bleam, M.R., Groy, A., Moss, K.G., Minthorn, E.A., Kulkarni, S.G., Rominger, C.M., Erskine, S., Fisher, K.E., Yang, J., et al. (2011). GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res* 17, 989–1000.
- Girotti, M.R., Lopes, F., Preece, N., Niculescu-Duvaz, D., Zambon, A., Davies, L., Whittaker, S., Saturno, G., Viros, A., Pedersen, M., et al. (2015). Paradox-breaking RAF inhibitors that also target SRC are effective in drug-resistant BRAF mutant melanoma. *Cancer Cell* 27, 85–96.
- Giroux, S., Tremblay, M., Bernard, D., Cardin-Girard, J.-F., Aubry, S., Larouche, L., Rousseau, S., Huot, J., Landry, J., Jeannotte, L., et al. (1999). Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Current Biology* 9, 369–376.
- Goel, N.S., Subba Rao, G., Yčas, M., Bremermann, H.J., and King, L. (1972). A method for calculating codon frequencies in DNA. *Journal of Theoretical Biology* 35, 399–457.
- Gregersen, L.H., Schueler, M., Munschauer, M., Mastrobuoni, G., Chen, W., Kempa, S., Dieterich, C., and Landthaler, M. (2014). MOV10 Is a 5' to 3' RNA Helicase Contributing to UPF1 mRNA Target Degradation by Translocation along 3' UTRs. *Molecular Cell* 54, 573–585.
- Gregory, B.D., O'Malley, R.C., Lister, R., Urich, M.A., Tonti-Filippini, J., Chen, H., Millar, A.H., and Ecker, J.R. (2008). A Link between RNA Metabolism and Silencing Affecting Arabidopsis Development. *Developmental Cell* 14, 854–866.
- Grimaldi, G., Catara, G., Palazzo, L., Corteggio, A., Valente, C., and Corda, D. (2019). PARPs and PAR as novel pharmacological targets for the treatment of stress granule-associated disorders. *Biochemical Pharmacology* 167, 64–75.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27, 91–105.
- Groušl, T., Ivanov, P., Frydlová, I., Vašicová, P., Janda, F., Vojtová, J., Malínská, K., Malcová, I., Nováková, L., Janošková, D., et al. (2009). Robust heat shock induces eIF2 α -phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Science* 122, 2078–2088.
- Grudzien-Nogalska, E., and Kiledjian, M. (2017). New insights into decapping enzymes and selective mRNA decay. *WIREs RNA* 8, e1379.

- Gudipati, R.K., Xu, Z., Lebreton, A., Séraphin, B., Steinmetz, L.M., Jacquier, A., and Libri, D. (2012). Extensive degradation of RNA precursors by the exosome in wild type cells. *Mol Cell* *48*, 409–421.
- Guo, Q., Shi, X., and Wang, X. (2021). RNA and liquid-liquid phase separation. *Noncoding RNA Res* *6*, 92–99.
- Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y., and Hu, L.-L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med* *19*, 1997–2007.
- Gupta, P.B., Fillmore, C.M., Jiang, G., Shapira, S.D., Tao, K., Kuperwasser, C., and Lander, E.S. (2011). Stochastic state transitions give rise to phenotypic equilibrium in populations of cancer cells. *Cell* *146*, 633–644.
- Guydosh, N.R., and Green, R. (2014). Dom34 Rescues Ribosomes in 3' Untranslated Regions. *Cell* *156*, 950–962.
- Guydosh, N.R., and Green, R. (2017). Translation of poly(A) tails leads to precise mRNA cleavage. *RNA* *23*, 749–761.
- Gy, I., Gascioli, V., Laressergues, D., Morel, J.-B., Gombert, J., Proux, F., Proux, C., Vaucheret, H., and Mallory, A.C. (2007). Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 Are Endogenous RNA Silencing Suppressors. *Plant Cell* *19*, 3451–3461.
- Haass, N.K., Sproesser, K., Nguyen, T.K., Contractor, R., Medina, C.A., Nathanson, K.L., Herlyn, M., and Smalley, K.S.M. (2008). The Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase Inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) Induces Growth Arrest in Melanoma Cells and Tumor Regression When Combined with Docetaxel. *Clin Cancer Res* *14*, 230–239.
- Haling, J.R., Sudhamsu, J., Yen, I., Sideris, S., Sandoval, W., Phung, W., Bravo, B.J., Giannetti, A.M., Peck, A., Masselot, A., et al. (2014). Structure of the BRAF-MEK Complex Reveals a Kinase Activity Independent Role for BRAF in MAPK Signaling. *Cancer Cell* *26*, 402–413.
- Hallin, J., Engstrom, L.D., Hargis, L., Calinisan, A., Aranda, R., Briere, D.M., Sudhakar, N., Bowcut, V., Baer, B.R., Ballard, J.A., et al. (2020). The KRASG12C Inhibitor, MRTX849, Provides Insight Toward Therapeutic Susceptibility of KRAS Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer Discov* *10*, 54–71.
- Halstead, J.M., Lionnet, T., Wilbertz, J.H., Wippich, F., Ephrussi, A., Singer, R.H., and Chao, J.A. (2015). An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science* *347*, 1367–1671.
- Han, L., and Colicelli, J. (1995). A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Mol Cell Biol* *15*, 1318–1323.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., and Marshall, C.J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* *57*, 1167–1177.
- Hardy, S.D., Shinde, A., Wang, W.-H., Wendt, M.K., and Geahlen, R.L. (2017). Regulation of epithelial-mesenchymal transition and metastasis by TGF- β , P-bodies, and autophagy. *Oncotarget* *8*, 103302–103314.
- Harigaya, Y., and Parker, R. (2010). No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *WIREs RNA* *1*, 132–141.

- Harvey, C., Klassa, S., Finol, E., Hall, J., and Hill, A.C. (2021). Chimeric Flaviviral RNA-siRNA Molecules Resist Degradation by The Exoribonuclease Xrn1 and Trigger Gene Silencing in Mammalian Cells. *Chembiochem*.
- Hatzivassiliou, G., Song, K., Yen, I., Brandhuber, B.J., Anderson, D.J., Alvarado, R., Ludlam, M.J.C., Stokoe, D., Gloor, S.L., Vigers, G., et al. (2010). RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* *464*, 431–435.
- Haura, E.B., Ricart, A.D., Larson, T.G., Stella, P.J., Bazhenova, L., Miller, V.A., Cohen, R.B., Eisenberg, P.D., Selaru, P., Wilner, K.D., et al. (2010). A Phase II Study of PD-0325901, an Oral MEK Inhibitor, in Previously Treated Patients with Advanced Non–Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* *16*, 2450–2457.
- Hauschild, A., Grob, J.-J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Kaempgen, E., et al. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* *380*, 358–365.
- He, F., and Jacobson, A. (2001). Upf1p, Nmd2p, and Upf3p Regulate the Decapping and Exonucleolytic Degradation of both Nonsense-Containing mRNAs and Wild-Type mRNAs. *Mol Cell Biol* *21*, 1515–1530.
- He, F., and Jacobson, A. (2015). Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. *Annu Rev Genet* *49*, 339–366.
- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* *5*, 522–531.
- Heidorn, S.J., Milagre, C., Whittaker, S., Nourry, A., Niculescu-Duvas, I., Dhomen, N., Hussain, J., Reis-Filho, J.S., Springer, C.J., Pritchard, C., et al. (2010). Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* *140*, 209–221.
- Helmrich, A., Ballarino, M., and Tora, L. (2011). Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes. *Mol Cell* *44*, 966–977.
- Hennig, A., Markwart, R., Esparza-Franco, M.A., Ladds, G., and Rubio, I. (2015a). Ras activation revisited: role of GEF and GAP systems. *Biol Chem* *396*, 831–848.
- Hennig, A., Markwart, R., Wolff, K., Schubert, K., Cui, Y., Prior, I.A., Esparza-Franco, M.A., Ladds, G., and Rubio, I. (2016). Feedback activation of neurofibromin terminates growth factor-induced Ras activation. *Cell Commun Signal* *14*, 5.
- Hennig, S., Kong, G., Mannen, T., Sadowska, A., Kobelke, S., Blythe, A., Knott, G.J., Iyer, K.S., Ho, D., Newcombe, E.A., et al. (2015b). Prion-like domains in RNA binding proteins are essential for building subnuclear paraspeckles. *J Cell Biol* *210*, 529–539.
- Hernandez-Verdun, D. (2006). The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* *126*, 135.
- Ho, A.L., Brana, I., Haddad, R., Bauman, J., Bible, K., Oosting, S., Wong, D.J., Ahn, M.-J., Boni, V., Even, C., et al. (2021). Tipifarnib in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma With HRAS Mutations. *J Clin Oncol* *39*, 1856–1864.
- Hoek, K.S., and Goding, C.R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* *23*, 746–759.

- Hoek, T.A., Khuperkar, D., Lindeboom, R.G.H., Sonneveld, S., Verhagen, B.M.P., Boersma, S., Vermeulen, M., and Tanenbaum, M.E. (2019). Single-Molecule Imaging Uncovers Rules Governing Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Mol Cell* *75*, 324-339.e11.
- Hofer, F., Fields, S., Schneider, C., and Martin, G.S. (1994). Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 11089–11093.
- Hofman, V., Bonnetaud, C., Ilie, M.I., Vielh, P., Vignaud, J.M., Fléjou, J.F., Lantuejoul, S., Piaton, E., Mourad, N., Butori, C., et al. (2011). Preoperative circulating tumor cell detection using the isolation by size of epithelial tumor cell method for patients with lung cancer is a new prognostic biomarker. *Clin Cancer Res* *17*, 827–835.
- Hofman, V., Heeke, S., Marquette, C.-H., Ilié, M., and Hofman, P. (2019). Circulating Tumor Cell Detection in Lung Cancer: But to What End? *Cancers (Basel)* *11*, E262.
- Hogg, J.R. (2016). Viral Evasion and Manipulation of Host RNA Quality Control Pathways. *J Virol* *90*, 7010–7018.
- Holohan, C., Van Schaeybroeck, S., Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2013). Cancer drug resistance: an evolving paradigm. *Nat Rev Cancer* *13*, 714–726.
- Holstein, E.-M., Clark, K.R.M., and Lydall, D. (2014). Interplay between Nonsense-Mediated mRNA Decay and DNA Damage Response Pathways Reveals that Stn1 and Ten1 Are the Key CST Telomere-Cap Components. *Cell Rep* *7*, 1259–1269.
- Hong, D.S., Fakhri, M.G., Strickler, J.H., Desai, J., Durm, G.A., Shapiro, G.I., Falchook, G.S., Price, T.J., Sacher, A., Denlinger, C.S., et al. (2020). KRASG12C Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *N Engl J Med* *383*, 1207–1217.
- Hoof, A. van, Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., and Parker, R. (2002). Exosome-Mediated Recognition and Degradation of mRNAs Lacking a Termination Codon. *Science* *295*, 2262–2264.
- Horvathova, I., Voigt, F., Kotrys, A.V., Zhan, Y., Artus-Revel, C.G., Eglinger, J., Stadler, M.B., Giorgetti, L., and Chao, J.A. (2017). The Dynamics of mRNA Turnover Revealed by Single-Molecule Imaging in Single Cells. *Mol. Cell* *68*, 615-625.e9.
- Houe, H. (2003). Economic impact of BVDV infection in dairies. *Biologicals* *31*, 137–143.
- Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The Many Pathways of RNA Degradation. *Cell* *136*, 763–776.
- Hoyle, N.P., Castelli, L.M., Campbell, S.G., Holmes, L.E.A., and Ashe, M.P. (2007). Stress-dependent relocalization of translationally primed mRNPs to cytoplasmic granules that are kinetically and spatially distinct from P-bodies. *J Cell Biol* *179*, 65–74.
- Hu, J., Stites, E.C., Yu, H., Germino, E., Meharena, H.S., Stork, P.J.S., Kornev, A.P., Taylor, S.S., and Shaw, A.S. (2013). Allosteric Activation of Functionally Asymmetric RAF Kinase Dimers. *Cell* *154*, 10.1016/j.cell.2013.07.046.
- Hubstenberger, A., Courel, M., Bénard, M., Souquere, S., Ernoult-Lange, M., Chouaib, R., Yi, Z., Morlot, J.-B., Munier, A., Fradet, M., et al. (2017). P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons. *Molecular Cell* *68*, 144-157.e5.
- Hug, N., Longman, D., and Cáceres, J.F. (2016). Mechanism and regulation of the nonsense-mediated decay pathway. *Nucleic Acids Res* *44*, 1483–1495.

- Hunter, J.C., Manandhar, A., Carrasco, M.A., Gurbani, D., Gondi, S., and Westover, K.D. (2015). Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Mol Cancer Res* 13, 1325–1335.
- Huynh, H., Soo, K.C., Chow, P.K.H., and Tran, E. (2007). Targeted inhibition of the extracellular signal-regulated kinase pathway with AZD6244 (ARRY-142886) in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther* 6, 138–146.
- Hyde, J.L., and Diamond, M.S. (2015). Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2'-O methylation. *Virology* 479, 66–74.
- Ibrahim, H., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2008). RNA recognition by 3'-to-5' exonucleases: the substrate perspective. *Biochim Biophys Acta* 1779, 256–265.
- Ilie, M., and Hofman, P. (2012). Pitfalls in lung cancer molecular pathology: how to limit them in routine practice? *Curr Med Chem* 19, 2638–2651.
- Ilie, M., Hofman, V., Long-Mira, E., Selva, E., Vignaud, J.-M., Padovani, B., Mouroux, J., Marquette, C.-H., and Hofman, P. (2014). "Sentinel" Circulating Tumor Cells Allow Early Diagnosis of Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *PLoS One* 9, e111597.
- Infante, J.R., Fecher, L.A., Falchook, G.S., Nallapareddy, S., Gordon, M.S., Becerra, C., DeMarini, D.J., Cox, D.S., Xu, Y., Morris, S.R., et al. (2012). Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol* 13, 773–781.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Lührmann, R., and Achsel, T. (2002). The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA* 8, 1489–1501.
- Islami, F., Torre, L.A., and Jemal, A. (2015). Global trends of lung cancer mortality and smoking prevalence. *Transl Lung Cancer Res* 4, 327–338.
- Ivanov, P., Kedersha, N., and Anderson, P. (2019). Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11.
- Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J* 27, 736–747.
- Iwakawa, H., Mizumoto, H., Nagano, H., Imoto, Y., Takigawa, K., Sarawaneeyaruk, S., Kaido, M., Mise, K., and Okuno, T. (2008). A Viral Noncoding RNA Generated by cis-Element-Mediated Protection against 5'→3' RNA Decay Represses both Cap-Independent and Cap-Dependent Translation. *J Virol* 82, 10162–10174.
- Iwasaki, Y.W., Siomi, M.C., and Siomi, H. (2015). PIWI-Interacting RNA: Its Biogenesis and Functions. *Annu Rev Biochem* 84, 405–433.
- Jain, S., Wheeler, J.R., Walters, R.W., Agrawal, A., Barsic, A., and Parker, R. (2016). ATPase-Modulated Stress Granules Contain a Diverse Proteome and Substructure. *Cell* 164, 487–498.
- Janes, M.R., Zhang, J., Li, L.-S., Hansen, R., Peters, U., Guo, X., Chen, Y., Babbar, A., Firdaus, S.J., Darjania, L., et al. (2018). Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* 172, 578-589.e17.

- Jang, H., Abraham, S.J., Chavan, T.S., Hitchinson, B., Khavrutskii, L., Tarasova, N.I., Nussinov, R., and Gaponenko, V. (2015). Mechanisms of membrane binding of small GTPase K-Ras4B farnesylated hypervariable region. *J Biol Chem* *290*, 9465–9477.
- Jangra, R.K., Yi, M., and Lemon, S.M. (2010). Regulation of Hepatitis C Virus Translation and Infectious Virus Production by the MicroRNA miR-122. *J Virol* *84*, 6615–6625.
- Jasinski, D., Haque, F., Binzel, D.W., and Guo, P. (2017). Advancement of the Emerging Field of RNA Nanotechnology. *ACS Nano* *11*, 1142–1164.
- Jimeno-González, S., Haaning, L.L., Malagon, F., and Jensen, T.H. (2010). The Yeast 5'-3' Exonuclease Rat1p Functions during Transcription Elongation by RNA Polymerase II. *Molecular Cell* *37*, 580–587.
- Jinek, M., Coyle, S.M., and Doudna, J.A. (2011). Coupled 5' nucleotide recognition and processivity in Xrn1-mediated mRNA decay. *Mol Cell* *41*, 600–608.
- Jo, C., Cho, S.-J., and Jo, S.A. (2011). Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) stabilizes MyoD through direct phosphorylation at tyrosine 156 during myogenic differentiation. *J Biol Chem* *286*, 18903–18913.
- Johannessen, C.M., Boehm, J.S., Kim, S.Y., Thomas, S.R., Wardwell, L., Johnson, L.A., Emery, C.M., Stransky, N., Cogdill, A.P., Barretina, J., et al. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* *468*, 968–972.
- Johnson, A.W. (1997). Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol Cell Biol* *17*, 6122–6130.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2013). The role of disordered protein regions in the assembly of decapping complexes and RNP granules. *Genes Dev* *27*, 2628–2641.
- Jonas, S., and Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* *16*, 421–433.
- Jonas, S., Christie, M., Peter, D., Bhandari, D., Loh, B., Huntzinger, E., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2014). An asymmetric PAN3 dimer recruits a single PAN2 exonuclease to mediate mRNA deadenylation and decay. *Nature Structural & Molecular Biology* *21*, 599–608.
- Jones, C.I., Zabolotskaya, M.V., and Newbury, S.F. (2012). The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions in cellular processes and development: The 5' → 3' exoribonuclease XRN1/Pacman and its functions. *WIREs RNA* *3*, 455–468.
- Jones, C.I., Grima, D.P., Waldron, J.A., Jones, S., Parker, H.N., and Newbury, S.F. (2013). The 5'-3' exoribonuclease Pacman (Xrn1) regulates expression of the heat shock protein Hsp67Bc and the microRNA miR-277-3p in *Drosophila* wing imaginal discs. *RNA Biol* *10*, 1345–1355.
- Jones, C.I., Pashler, A.L., Towler, B.P., Robinson, S.R., and Newbury, S.F. (2016). RNA-seq reveals post-transcriptional regulation of *Drosophila* insulin-like peptide dilp8 and the neuropeptide-like precursor Nplp2 by the exoribonuclease Pacman/XRN1. *Nucleic Acids Res* *44*, 267–280.
- Kaehler, C., Isensee, J., Hucho, T., Lehrach, H., and Krobitsch, S. (2014). 5-Fluorouracil affects assembly of stress granules based on RNA incorporation. *Nucleic Acids Res* *42*, 6436–6447.
- Kamakura, S., Moriguchi, T., and Nishida, E. (1999). Activation of the Protein Kinase ERK5/BMK1 by Receptor Tyrosine Kinases: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A SIGNALING PATHWAY TO THE NUCLEUS*. *Journal of Biological Chemistry* *274*, 26563–26571.

- Kaneko, S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., and Manley, J.L. (2007). The multifunctional protein p54nrb/PSF recruits the exonuclease XRN2 to facilitate pre-mRNA 3' processing and transcription termination. *Genes Dev* 21, 1779–1789.
- Karoulia, Z., Wu, Y., Ahmed, T.A., Xin, Q., Bollard, J., Krepler, C., Wu, X., Zhang, C., Bollag, G., Herlyn, M., et al. (2016). An Integrated Model of RAF Inhibitor Action Predicts Inhibitor Activity against Oncogenic BRAF Signaling. *Cancer Cell* 30, 501–503.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev* 20, 355–367.
- Kastenmayer, J.P., and Green, P.J. (2000). Novel features of the XRN-family in Arabidopsis: Evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13985–13990.
- Katahira, J., Miki, T., Takano, K., Maruhashi, M., Uchikawa, M., Tachibana, T., and Yoneda, Y. (2008). Nuclear RNA export factor 7 is localized in processing bodies and neuronal RNA granules through interactions with shuttling hnRNPs. *Nucleic Acids Res* 36, 616–628.
- Kawamoto, T., Yoshimoto, R., Taniguchi, I., Kitabatake, M., and Ohno, M. (2021). ISG20 and nuclear exosome promote destabilization of nascent transcripts for spliceosomal U snRNAs and U1 variants. *Genes Cells* 26, 18–30.
- Kawauchi, J., Mischo, H., Braglia, P., Rondon, A., and Proudfoot, N.J. (2008). Budding yeast RNA polymerases I and II employ parallel mechanisms of transcriptional termination. *Genes Dev* 22, 1082–1092.
- Kebaara, B.W., and Atkin, A.L. (2009). Long 3'-UTRs target wild-type mRNAs for nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 37, 2771–2778.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 169, 871–884.
- Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2013). Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem Sci* 38, 10.1016/j.tibs.2013.07.004.
- Kedersha, N., Panas, M.D., Achorn, C.A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., Thomas, M., Lieberman, J., McInerney, G.M., Ivanov, P., et al. (2016). G3BP–Caprin1–USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. *J Cell Biol* 212, 845–860.
- Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999). RNA-Binding Proteins Tia-1 and Tiar Link the Phosphorylation of Eif-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *J Cell Biol* 147, 1431–1442.
- Kemper, K., Goeje, P.L. de, Peeper, D.S., and Amerongen, R. van (2014). Phenotype Switching: Tumor Cell Plasticity as a Resistance Mechanism and Target for Therapy. *Cancer Res* 74, 5937–5941.
- Kenna, M., Stevens, A., McCammon, M., and Douglas, M.G. (1993). An essential yeast gene with homology to the exonuclease-encoding XRN1/KEM1 gene also encodes a protein with exoribonuclease activity. *Mol Cell Biol* 13, 341–350.

- Khullar, O.V., Liu, Y., Gillespie, T., Higgins, K.A., Ramalingam, S., Lipscomb, J., and Fernandez, F.G. (2015). Survival After Sublobar Resection versus Lobectomy for Clinical Stage IA Lung Cancer. *J Thorac Oncol* *10*, 1625–1633.
- Kilchert, C., Wittmann, S., and Vasiljeva, L. (2016). The regulation and functions of the nuclear RNA exosome complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* *17*, 227–239.
- Kim, J., and Kim, J. (2002). KEM1 is involved in filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* *216*, 33–38.
- Kim, Y.K., and Maquat, L.E. (2019). UPFront and center in RNA decay: UPF1 in nonsense-mediated mRNA decay and beyond. *RNA* *25*, 407–422.
- Kim, K., Heo, D., Kim, I., Suh, J.-Y., and Kim, M. (2016). Exosome Cofactors Connect Transcription Termination to RNA Processing by Guiding Terminated Transcripts to the Appropriate Exonuclease within the Nuclear Exosome. *J Biol Chem* *291*, 13229–13242.
- Kim, M., Krogan, N.J., Vasiljeva, L., Rando, O.J., Nedeja, E., Greenblatt, J.F., and Buratowski, S. (2004). The yeast Rat1 exonuclease promotes transcription termination by RNA polymerase II. *Nature* *432*, 517–522.
- Kirkwood, J.M., Bastholt, L., Robert, C., Sosman, J., Larkin, J., Hersey, P., Middleton, M., Cantarini, M., Zazulina, V., Kemsley, K., et al. (2012). Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor selumetinib as monotherapy versus temozolomide in patients with advanced melanoma. *Clin Cancer Res* *18*, 555–567.
- Kjaer, I.M., Bechmann, T., Brandslund, I., and Madsen, J.S. (2018). Prognostic and predictive value of EGFR and EGFR-ligands in blood of breast cancer patients: a systematic review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* *56*, 688–701.
- Klauer, A.A., and van Hoof, A. (2012). Degradation of mRNAs that lack a stop codon: A decade of nonstop progress. *Wiley Interdiscip Rev RNA* *3*, 649–660.
- Kocher, F., Hilbe, W., Seeber, A., Pircher, A., Schmid, T., Greil, R., Auberger, J., Nevinny-Stickel, M., Sterlacci, W., Tzankov, A., et al. (2015). Longitudinal analysis of 2293 NSCLC patients: A comprehensive study from the TYROL registry. *Lung Cancer* *87*, 193–200.
- Kodama, K., Doi, O., Higashiyama, M., and Yokouchi, H. (1997). Intentional limited resection for selected patients with T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer: A single-institution study. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* *114*, 347–353.
- Kodama, K., Higashiyama, M., Okami, J., Tokunaga, T., Imamura, F., Nakayama, T., Inoue, A., and Kuriyama, K. (2016). Oncologic Outcomes of Segmentectomy Versus Lobectomy for Clinical T1a N0 M0 Non-Small Cell Lung Cancer. *The Annals of Thoracic Surgery* *101*, 504–511.
- Kohl, N.E., Omer, C.A., Conner, M.W., Anthony, N.J., Davide, J.P., Desolms, S.J., Giuliani, E.A., Gomez, R.P., Graham, S.L., Hamilton, K., et al. (1995). Inhibition of farnesyltransferase induces regression of mammary and salivary carcinomas in ras transgenic mice. *Nat Med* *1*, 792–797.
- Korzeniecki, C., and Priefer, R. (2021). Targeting KRAS mutant cancers by preventing signaling transduction in the MAPK pathway. *Eur J Med Chem* *211*, 113006.
- Kötting, C., Kallenbach, A., Suveyzdis, Y., Wittinghofer, A., and Gerwert, K. (2008). The GAP arginine finger movement into the catalytic site of Ras increases the activation entropy. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 6260–6265.

- Kowalinski, E., Kögel, A., Ebert, J., Reichelt, P., Stegmann, E., Habermann, B., and Conti, E. (2016). Structure of a Cytoplasmic 11-Subunit RNA Exosome Complex. *Molecular Cell* *63*, 125–134.
- Kuriyama, M., Harada, N., Kuroda, S., Yamamoto, T., Nakafuku, M., Iwamatsu, A., Yamamoto, D., Prasad, R., Croce, C., Canaani, E., et al. (1996). Identification of AF-6 and canoe as putative targets for Ras. *J Biol Chem* *271*, 607–610.
- Lake, D., Corrêa, S.A.L., and Müller, J. (2016). Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell Mol Life Sci* *73*, 4397–4413.
- Lam, W.K., White, N.W., and Chan-Yeung, M.M. (2004). Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* *8*, 1045–1057.
- Lampson, B.L., Pershing, N.L.K., Prinz, J.A., Lacsina, J.R., Marzluff, W.F., Nicchitta, C.V., MacAlpine, D.M., and Counter, C.M. (2013). Rare codons regulate KRas oncogenesis. *Curr Biol* *23*, 70–75.
- Langeberg, C.J., Welch, W.R.W., McGuire, J.V., Ashby, A., Jackson, A.D., and Chapman, E.G. (2020). Biochemical Characterization of Yeast Xrn1. *Biochemistry* *59*, 1493–1507.
- Langlois, W.J., Sasaoka, T., Saltiel, A.R., and Olefsky, J.M. (1995). Negative Feedback Regulation and Desensitization of Insulin- and Epidermal Growth Factor-stimulated p21ras Activation (*). *Journal of Biological Chemistry* *270*, 25320–25323.
- Larimer, F.W., and Stevens, A. (1990). Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'→3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. *Gene* *95*, 85–90.
- Laurence, N., Epelman, M., Markowitz, R.I., Jaimes, C., Jaramillo, D., and Chauvin, N.A. (2012). Osteoid osteomas: a pain in the night diagnosis. *Pediatr Radiol* *42*, 1490–1501.
- Lavut, A., and Raveh, D. (2012). Sequestration of Highly Expressed mRNAs in Cytoplasmic Granules, P-Bodies, and Stress Granules Enhances Cell Viability. *PLoS Genet* *8*, e1002527.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and 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.
- Lee, J.H., Shklovskaya, E., Lim, S.Y., Carlino, M.S., Menzies, A.M., Stewart, A., Pedersen, B., Irvine, M., Alavi, S., Yang, J.Y.H., et al. (2020). Transcriptional downregulation of MHC class I and melanoma de- differentiation in resistance to PD-1 inhibition. *Nat Commun* *11*, 1897.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* *21*, 4663–4670.
- Lejeune, F. (2017). Nonsense-mediated mRNA decay at the crossroads of many cellular pathways. *BMB Rep* *50*, 175–185.
- Lemmon, M.A., and Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* *141*, 1117–1134.
- Leppä, S., and Bohmann, D. (1999). Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis. *Oncogene* *18*, 6158–6162.
- Lerner, E.C., Qian, Y., Blaskovich, M.A., Fossum, R.D., Vogt, A., Sun, J., Cox, A.D., Der, C.J., Hamilton, A.D., and Sefti, S.M. (1995). Ras CAAX Peptidomimetic FTI-277 Selectively Blocks Oncogenic Ras Signaling by Inducing Cytoplasmic Accumulation of Inactive Ras-Raf Complexes (*). *Journal of Biological Chemistry* *270*, 26802–26806.

Levinson, A.D., Oppermann, H., Varmus, H.E., and Bishop, J.M. (1980). The purified product of the transforming gene of avian sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Journal of Biological Chemistry* *255*, 11973–11980.

Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* *115*, 787–798.

Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* *120*, 15–20.

Li, C.-H., Irmer, H., Gudjonsdottir-Planck, D., Freese, S., Salm, H., Haile, S., Estévez, A.M., and Clayton, C. (2006). Roles of a *Trypanosoma brucei* 5'→3' exoribonuclease homolog in mRNA degradation. *RNA* *12*, 2171–2186.

Li, P., Banjade, S., Cheng, H.-C., Kim, S., Chen, B., Guo, L., Llaguno, M., Hollingsworth, J.V., King, D.S., Banani, S.F., et al. (2012). Phase Transitions in the Assembly of Multi-Valent Signaling Proteins. *Nature* *483*, 336–340.

Li, X., Huang, Y., Jiang, J., and Frank, S.J. (2008). ERK-dependent threonine phosphorylation of EGF receptor modulates receptor downregulation and signaling. *Cell Signal* *20*, 2145–2155.

Li, Y., Masaki, T., and Lemon, S.M. (2013). miR-122 and the Hepatitis C RNA genome. *RNA Biol* *10*, 919–923.

Lin, Y., Protter, D.S.W., Rosen, M.K., and Parker, R. (2015). Formation and Maturation of Phase Separated Liquid Droplets by RNA Binding Proteins. *Mol Cell* *60*, 208–219.

Ling, S.H.M., Decker, C.J., Walsh, M.A., She, M., Parker, R., and Song, H. (2008). Crystal structure of human Edc3 and its functional implications. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 5965–5976.

Lito, P., Saborowski, A., Yue, J., Solomon, M., Joseph, E., Gadai, S., Saborowski, M., Kasthuber, E., Fellmann, C., Ohara, K., et al. (2014). Disruption of CRAF-mediated MEK activation is required for effective MEK inhibition in KRAS mutant tumors. *Cancer Cell* *25*, 697–710.

Lito, P., Solomon, M., Li, L.-S., Hansen, R., and Rosen, N. (2016). Allele-specific inhibitors inactivate mutant KRAS G12C by a trapping mechanism. *Science (New York, N.Y.)* *351*, 604.

Liu, H., and Kiledjian, M. (2005). Scavenger Decapping Activity Facilitates 5' to 3' mRNA Decay. *Mol Cell Biol* *25*, 9764–9772.

Liu, D., Ndongwe, T.P., Puray-Chavez, M., Casey, M.C., Izumi, T., Pathak, V.K., Tedbury, P.R., and Sarafianos, S.G. (2020). Effect of P-body component Mov10 on HCV virus production and infectivity. *FASEB J* *34*, 9433–9449.

Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* *7*, 719–723.

Liu, L., Weiss, E., Panas, M.D., Götte, B., Sellberg, S., Thaa, B., and McInerney, G.M.Y. (2019). RNA processing bodies are disassembled during Old World alphavirus infection. *Journal of General Virology* *100*, 1375–1389.

Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome. *Cell* *127*, 1223–1237.

- Liu, S.-W., Rajagopal, V., Patel, S.S., and Kiledjian, M. (2008). Mechanistic and Kinetic Analysis of the DcpS Scavenger Decapping Enzyme. *J Biol Chem* 283, 16427–16436.
- Liu, Y.-C., Mok, B.W.-Y., Wang, P., Kuo, R.-L., Chen, H., and Shih, S.-R. (2021). Cellular 5'-3' mRNA Exoribonuclease XRN1 Inhibits Interferon Beta Activation and Facilitates Influenza A Virus Replication. *MBio* 0, e00945-21.
- Lobell, R.B., Liu, D., Buser, C.A., Davide, J.P., DePuy, E., Hamilton, K., Koblan, K.S., Lee, Y., Mosser, S., Motzel, S.L., et al. (2002). Preclinical and Clinical Pharmacodynamic Assessment of L-778,123, a Dual Inhibitor of Farnesyl:Protein Transferase and Geranylgeranyl:Protein Transferase Type-I. *Mol Cancer Ther* 1, 747–758.
- Long, G.V., Hauschild, A., Santinami, M., Atkinson, V., Mandalà, M., Chiarion-Sileni, V., Larkin, J., Nyakas, M., Dutriaux, C., Haydon, A., et al. (2017). Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med* 377, 1813–1823.
- Longley, D.B., and Johnston, P.G. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology* 205, 275–292.
- LoRusso, P.M., Adjei, A.A., Varterasian, M., Gadgeel, S., Reid, J., Mitchell, D.Y., Hanson, L., DeLuca, P., Bruzek, L., Piens, J., et al. (2005). Phase I and Pharmacodynamic Study of the Oral MEK Inhibitor CI-1040 in Patients With Advanced Malignancies. *JCO* 23, 5281–5293.
- LoRusso, P.M., Krishnamurthi, S.S., Rinehart, J.J., Nabell, L.M., Malburg, L., Chapman, P.B., DePrimo, S.E., Bentivegna, S., Wilner, K.D., Tan, W., et al. (2010). Phase I Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study of the Oral MAPK/ERK Kinase Inhibitor PD-0325901 in Patients with Advanced Cancers. *Clin Cancer Res* 16, 1924–1937.
- Lualdi, M., Pedrini, E., Rea, K., Monti, L., Scaldaferrri, D., Gariboldi, M., Camporeale, A., Ghia, P., Monti, E., Tomassetti, A., et al. (2015). Pleiotropic modes of action in tumor cells of RNASET2, an evolutionary highly conserved extracellular RNase. *Oncotarget* 6, 7851–7865.
- Lucibello, G., Mograbi, B., Milano, G., Hofman, P., and Brest, P. (2021). PD-L1 regulation revisited: impact on immunotherapeutic strategies. *Trends in Molecular Medicine* 27, 868–881.
- Luke, B., Panza, A., Redon, S., Iglesias, N., Li, Z., and Lingner, J. (2008). The Rat1p 5' to 3' Exonuclease Degrades Telomeric Repeat-Containing RNA and Promotes Telomere Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell* 32, 465–477.
- Luo, W., Johnson, A.W., and Bentley, D.L. (2006). The role of Rat1 in coupling mRNA 3'-end processing to transcription termination: implications for a unified allosteric-torpedo model. *Genes Dev* 20, 954–965.
- Lykke-Andersen, J., and Wagner, E. (2005). Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev* 19, 351–361.
- Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G., et al. (2009). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib (Massachusetts Medical Society).
- Mackenzie, I.R., Nicholson, A.M., Sarkar, M., Messing, J., Purice, M.D., Pottier, C., Annu, K., Baker, M., Perkerson, R.B., Kurti, A., et al. (2017). TIA1 mutations in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia promote phase separation and alter stress granule dynamics. *Neuron* 95, 808-816.e9.

- Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., and Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *Eur Respir J* 48, 889–902.
- Maly, V., MALY, O., KOLOSTOVA, K., and BOBEK, V. (2019). Circulating Tumor Cells in Diagnosis and Treatment of Lung Cancer. *In Vivo* 33, 1027–1037.
- Mangus, D.A., Evans, M.C., and Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* 4, 223.
- Mann, J.R., Gleixner, A.M., Mauna, J.C., Gomes, E., DeChellis-Marks, M.R., Needham, P.G., Copley, K.E., Hurtle, B., Portz, B., Pyles, N.J., et al. (2019). RNA Binding Antagonizes Neurotoxic Phase Transitions of TDP-43. *Neuron* 102, 321–338.e8.
- Mansour, S.J., Matten, W.T., Hermann, A.S., Candia, J.M., Rong, S., Fukasawa, K., Woude, G.V., and Ahn, N.G. (1994). Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265, 966–970.
- Marin-Bejar, O., Rogiers, A., Dewaele, M., Femel, J., Karras, P., Pozniak, J., Bervoets, G., Van Raemdonck, N., Pedri, D., Swings, T., et al. (2021). Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell* 39, 1135–1149.e8.
- Marín-Ramos, N.I., Balabasquer, M., Ortega-Nogales, F.J., Torrecillas, I.R., Gil-Ordóñez, A., Marcos-Ramiro, B., Aguilar-Garrido, P., Cushman, I., Romero, A., Medrano, F.J., et al. (2019). A Potent Isoprenylcysteine Carboxylmethyltransferase (ICMT) Inhibitor Improves Survival in Ras-Driven Acute Myeloid Leukemia. *J. Med. Chem.* 62, 6035–6046.
- Markham, A., and Keam, S.J. (2020). Selumetinib: First Approval. *Drugs* 80, 931–937.
- Markmiller, S., Soltanieh, S., Server, K.L., Mak, R., Jin, W., Fang, M.Y., Luo, E.-C., Krach, F., Yang, D., Sen, A., et al. (2018). Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules. *Cell* 172, 590–604.e13.
- Marks, J.L., Gong, Y., Chitale, D., Golas, B., McLellan, M.D., Kasai, Y., Ding, L., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Solit, D., et al. (2008). Novel MEK1 mutation identified by mutational analysis of epidermal growth factor receptor signaling pathway genes in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 68, 5524–5528.
- Marquette, C.-H., Boutros, J., Benzaquen, J., Ferreira, M., Pastre, J., Pison, C., Padovani, B., Bettayeb, F., Fallet, V., Guibert, N., et al. (2020). Circulating tumour cells as a potential biomarker for lung cancer screening: a prospective cohort study. *The Lancet Respiratory Medicine* 8, 709–716.
- Marshall, C.J. (1996). Ras effectors. *Current Opinion in Cell Biology* 8, 197–204.
- Martin, K.C., and Ephrussi, A. (2009). mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension. *Cell* 136, 719.
- Maryati, M., Airhihen, B., and Winkler, G.S. (2015). The enzyme activities of Caf1 and Ccr4 are both required for deadenylation by the human Ccr4–Not nuclease module. *Biochem J* 469, 169–176.
- Marzluff, W.F. (2005). Metazoan replication-dependent histone mRNAs: a distinct set of RNA polymerase II transcripts. *Curr Opin Cell Biol* 17, 274–280.
- Matheny, T., Rao, B.S., and Parker, R. (2019). Transcriptome-Wide Comparison of Stress Granules and P-Bodies Reveals that Translation Plays a Major Role in RNA Partitioning. *Mol Cell Biol* 39, e00313–19.

- Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., Arthur, C.D., White, J.M., Chen, Y.-S., Shea, L.K., et al. (2012). Cancer Exome Analysis Reveals a T Cell Dependent Mechanism of Cancer Immunoediting. *Nature* *482*, 400–404.
- Mazroui, R., Di Marco, S., Kaufman, R.J., and Gallouzi, I.-E. (2007). Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System Induces Stress Granule Formation. *Mol Biol Cell* *18*, 2603–2618.
- McCormick, F. (1989). ras GTPase activating protein: Signal transmitter and signal terminator. *Cell* *56*, 5–8.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta* *1773*, 1263–1284.
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* *15*, 185–197.
- Metze, S., Herzog, V.A., Ruepp, M.-D., and Mühlemann, O. (2013). Comparison of EJC-enhanced and EJC-independent NMD in human cells reveals two partially redundant degradation pathways. *RNA* *19*, 1432–1448.
- Metzen, E., Zhou, J., Jelkmann, W., Fandrey, J., and Brüne, B. (2003). Nitric Oxide Impairs Normoxic Degradation of HIF-1 α by Inhibition of Prolyl Hydroxylases. *Mol Biol Cell* *14*, 3470–3481.
- Meyer, M., Paquet, A., Arguel, M.-J., Peyre, L., Gomes-Pereira, L.C., Lebrigand, K., Mograbi, B., Brest, P., Waldmann, R., Barbry, P., et al. (2020). Profiling the Non-genetic Origins of Cancer Drug Resistance with a Single-Cell Functional Genomics Approach Using Predictive Cell Dynamics. *Cell Systems* *11*, 367-374.e5.
- Michalski, D., Ontiveros, J.G., Russo, J., Charley, P.A., Anderson, J.R., Heck, A.M., Geiss, B.J., and Wilusz, J. (2019). Zika virus noncoding sRNAs sequester multiple host-derived RNA-binding proteins and modulate mRNA decay and splicing during infection. *J. Biol. Chem.* *294*, 16282–16296.
- Miki, T.S., and Großhans, H. (2013). The multifunctional RNase XRN2. *Biochemical Society Transactions* *41*, 825–830.
- Mitsudomi, T., and Yatabe, Y. (2007). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene and related genes as determinants of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors sensitivity in lung cancer. *Cancer Science* *98*, 1817–1824.
- Mittag, T., and Parker, R. (2018). Multiple modes of protein-protein interactions promote RNP granule assembly. *J Mol Biol* *430*, 4636–4649.
- Miyauchi, S., Shien, K., Takeda, T., Araki, K., Nakata, K., Miura, A., Takahashi, Y., Kurihara, E., Ogoshi, Y., Namba, K., et al. (2020). Antitumor Effects of Pan-RAF Inhibitor LY3009120 Against Lung Cancer Cells Harboring Oncogenic BRAF Mutation. *Anticancer Research* *40*, 2667–2673.
- Moghadam, A.R., Patrad, E., Tafsiri, E., Peng, W., Fangman, B., Pluard, T.J., Accurso, A., Salacz, M., Shah, K., Ricke, B., et al. (2017). Ral signaling pathway in health and cancer. *Cancer Med* *6*, 2998–3013.
- Mohammed, I., Hampton, S.E., Ashall, L., Hildebrandt, E.R., Kutlik, R.A., Manandhar, S.P., Floyd, B.J., Smith, H.E., Dozier, J.K., Distefano, M.D., et al. (2016). 8-Hydroxyquinoline-based

inhibitors of the Rce1 protease disrupt Ras membrane localization in human cells. *Bioorg Med Chem* 24, 160–178.

Molleston, J.M., and Cherry, S. (2017). Attacked from All Sides: RNA Decay in Antiviral Defense. *Viruses* 9.

Montagut, C., Sharma, S.V., Shioda, T., McDermott, U., Ulman, M., Ulkus, L.E., Dias-Santagata, D., Stubbs, H., Lee, D.Y., Singh, A., et al. (2008). Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res* 68, 4853–4861.

Moon, S.L., and Wilusz, J. (2013). Cytoplasmic Viruses: Rage against the (Cellular RNA Decay) Machine. *PLoS Pathog* 9.

Moon, S.L., Anderson, J.R., Kumagai, Y., Wilusz, C.J., Akira, S., Khromykh, A.A., and Wilusz, J. (2012). A noncoding RNA produced by arthropod-borne flaviviruses inhibits the cellular exoribonuclease XRN1 and alters host mRNA stability. *RNA* 18, 2029–2040.

Moon, S.L., Blackinton, J.G., Anderson, J.R., Dozier, M.K., Dodd, B.J.T., Keene, J.D., Wilusz, C.J., Bradrick, S.S., and Wilusz, J. (2015). XRN1 Stalling in the 5' UTR of Hepatitis C Virus and Bovine Viral Diarrhea Virus Is Associated with Dysregulated Host mRNA Stability. *PLoS Pathog* 11.

Moon, S.L., Morisaki, T., Khong, A., Lyon, K., Parker, R., and Stasevich, T.J. (2019). Multicolor single-molecule tracking of mRNA interactions with RNP granules. *Nat Cell Biol* 21, 162–168.

Moore, A.R., and Malek, S. (2021). The promise and peril of KRAS G12C inhibitors. *Cancer Cell* 39, 1059–1061.

Morales, J.C., Richard, P., Patidar, P.L., Motea, E.A., Dang, T.T., Manley, J.L., and Boothman, D.A. (2016). XRN2 Links Transcription Termination to DNA Damage and Replication Stress. *PLoS Genet* 12, e1006107.

Mugridge, J.S., Collier, J., and Gross, J.D. (2018). Structural and molecular mechanisms for the control of eukaryotic 5'–3' mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* 25, 1077–1085.

Muhammad, I., Fengshan, W., Muhammad, S., Wenjie, J., Abdel, H.F., and Effat, U.N. (2017). The Role of Grb2 in Cancer and Peptides as Grb2 Antagonists. *Protein & Peptide Letters* 24, 1084–1095.

Muhlrad, D., and Parker, R. (2005). The yeast EDC1 mRNA undergoes deadenylation-independent decapping stimulated by Not2p, Not4p, and Not5p. *EMBO J* 24, 1033–1045.

Muhlrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* 8, 855–866.

Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J.P., Raijmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S., and Wilusz, J. (2002). The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J* 21, 165–174.

Müller, J., and Morrison, D.K. (2002). Assay of Raf-1 activity. *Methods Enzymol* 345, 490–498.

Nagarajan, V.K., Jones, C.I., Newbury, S.F., and Green, P.J. (2013). XRN 5'→3' exoribonucleases: Structure, mechanisms and functions. *Biochim Biophys Acta* 1829, 590–603.

Nagasaka, M., and Gadgeel, S.M. (2018). Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 18, 63–70.

Nazarian, R., Shi, H., Wang, Q., Kong, X., Koya, R.C., Lee, H., Chen, Z., Lee, M.-K., Attar, N., Sazegar, H., et al. (2010). Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* *468*, 973–977.

Newbury, S., and Woollard, A. (2004). The 5′–3′ exoribonuclease *xrn-1* is essential for ventral epithelial enclosure during *C. elegans* embryogenesis. *RNA* *10*, 59–65.

Ng, C.S., Kato, H., and Fujita, T. (2019). Fueling Type I Interferonopathies: Regulation and Function of Type I Interferon Antiviral Responses. *Journal of Interferon & Cytokine Research* *39*, 383–392.

Ng, C.S., Kasumba, D.M., Fujita, T., and Luo, H. (2020). Spatio-temporal characterization of the antiviral activity of the XRN1-DCP1/2 aggregation against cytoplasmic RNA viruses to prevent cell death. *Cell Death & Differentiation* 1–20.

Nichols, R.J., Clegg, J., Schulze, C.J., Wang, Z., Yang, K., Jiang, J., Whalen, D.M., Hansen, R., Garrenton, L.S., Bermingham, A., et al. (2021). Abstract 1261: A next generation tri-complex KRASG12C(ON) inhibitor directly targets the active, GTP-bound state of mutant RAS and may overcome resistance to KRASG12C(OFF) inhibition. *Cancer Res* *81*, 1261–1261.

Nicholson, R.I., Gee, J.M.W., and Harper, M.E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer* *37*, 9–15.

Nishimura, T., Padamsi, Z., Fakim, H., Milette, S., Dunham, W.H., Gingras, A.-C., and Fabian, M.R. (2015). The eIF4E-Binding Protein 4E-T Is a Component of the mRNA Decay Machinery that Bridges the 5′ and 3′ Termini of Target mRNAs. *Cell Reports* *11*, 1425–1436.

Nissan, M.H., Pratilas, C.A., Jones, A.M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A.J., Yao, Z., et al. (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Res* *74*, 2340–2350.

Nissan, T., Rajyaguru, P., She, M., Song, H., and Parker, R. (2010). Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Mol Cell* *39*, 773–783.

Noronha, V., Patil, V.M., Joshi, A., Menon, N., Chougule, A., Mahajan, A., Janu, A., Purandare, N., Kumar, R., More, S., et al. (2020). Gefitinib Versus Gefitinib Plus Pemetrexed and Carboplatin Chemotherapy in EGFR-Mutated Lung Cancer. *J Clin Oncol* *38*, 124–136.

Nott, T.J., Petsalaki, E., Farber, P., Jervis, D., Fussner, E., Plochowietz, A., Craggs, T.D., Bazett-Jones, D.P., Pawson, T., Forman-Kay, J.D., et al. (2015). Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Mol. Cell* *57*, 936–947.

NSCLC Meta-analysis Collaborative Group (2014). Preoperative chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Lancet* *383*, 1561–1571.

Nussinov, R., Zhang, M., Maloney, R., and Jang, H. (2021). Ras isoform-specific expression, chromatin accessibility, and signaling. *Biophys Rev* *13*, 489–505.

Ohren, J.F., Chen, H., Pavlovsky, A., Whitehead, C., Zhang, E., Kuffa, P., Yan, C., McConnell, P., Spessard, C., Banotai, C., et al. (2004). Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat Struct Mol Biol* *11*, 1192–1197.

Okimoto, R.A., Lin, L., Olivas, V., Chan, E., Markegard, E., Rymar, A., Neel, D., Chen, X., Hemmati, G., Bollag, G., et al. (2016). Preclinical efficacy of a RAF inhibitor that evades paradoxical MAPK pathway activation in protein kinase BRAF-mutant lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 13456–13461.

Onomoto, K., Jogi, M., Yoo, J.-S., Narita, R., Morimoto, S., Takemura, A., Sambhara, S., Kawaguchi, A., Osari, S., Nagata, K., et al. (2012). Critical Role of an Antiviral Stress Granule Containing RIG-I and PKR in Viral Detection and Innate Immunity. *PLoS One* 7, e43031.

Ostrem, J.M., Peters, U., Sos, M.L., Wells, J.A., and Shokat, K.M. (2013). K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 503, 548–551.

Paez, J.G., Jänne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J., et al. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497–1500.

Page, A.M., Davis, K., Molineux, C., Kolodner, R.D., and Johnson, A.W. (1998). Mutational analysis of exoribonuclease I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 26, 3707–3716.

Pager, C.T., Schütz, S., Abraham, T.M., Luo, G., and Sarnow, P. (2013). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance and virus release by dispersion of processing bodies and enrichment of stress granules. *Virology* 435, 472–484.

Panas, M.D., Ivanov, P., and Anderson, P. (2016). Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics. *J Cell Biol* 215, 313–323.

Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., et al. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13306–13311.

Parker, R., and Sheth, U. (2007). P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell* 25, 635–646.

Pashler, A.L., Towler, B.P., Jones, C.I., Haime, H.J., Burgess, T., and Newbury, S.F. (2021). Genome-wide analyses of XRN1-sensitive targets in osteosarcoma cells identifies disease-relevant transcripts containing G-rich motifs. *RNA* rna.078872.121.

Patel, A., Lee, H.O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnel, M., Hein, M.Y., Stoynov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T.M., et al. (2015). A Liquid-to-Solid Phase Transition of the ALS Protein FUS Accelerated by Disease Mutation. *Cell* 162, 1066–1077.

Patricelli, M.P., Janes, M.R., Li, L.-S., Hansen, R., Peters, U., Kessler, L.V., Chen, Y., Kucharski, J.M., Feng, J., Ely, T., et al. (2016). Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. *Cancer Discov* 6, 316–329.

Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., and Sturgill, T.W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J* 10, 885–892.

Pederson, T. (2011). The Nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a000638.

Peltier, C., Klein, E., Hleibieh, K., D’Alonzo, M., Hammann, P., Bouzoubaa, S., Ratti, C., and Gilmer, D. (2012). Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J. Gen. Virol.* 93, 1093–1102.

Peng, S.-B., Henry, J.R., Kaufman, M.D., Lu, W.-P., Smith, B.D., Vogeti, S., Rutkoski, T.J., Wise, S., Chun, L., Zhang, Y., et al. (2015). Inhibition of RAF Isoforms and Active Dimers by LY3009120 Leads to Anti-tumor Activities in RAS or BRAF Mutant Cancers. *Cancer Cell* 28, 384–398.

- Peran, I., and Mittag, T. (2020). Molecular structure in biomolecular condensates. *Curr Opin Struct Biol* 60, 17–26.
- Pérez-Vilaró, G., Scheller, N., Saludes, V., and Díez, J. (2012). Hepatitis C Virus Infection Alters P-Body Composition but Is Independent of P-Body Granules. *J Virol* 86, 8740–8749.
- Pérez-Vilaró, G., Fernández-Carrillo, C., Mensa, L., Miquel, R., Sanjuan, X., Forns, X., Pérez-del-Pulgar, S., and Díez, J. (2015). Hepatitis C virus infection inhibits P-body granule formation in human livers. *Journal of Hepatology* 62, 785–790.
- Pershing, N.L.K., Lampson, B.L., Belsky, J.A., Kaltenbrun, E., MacAlpine, D.M., and Counter, C.M. (2015). Rare codons capacitate Kras-driven de novo tumorigenesis. *J Clin Invest* 125, 222–233.
- Peters, S., Michielin, O., and Zimmermann, S. (2013). Dramatic response induced by vemurafenib in a BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 31, e341-344.
- Petfalski, E., Dandekar, T., Henry, Y., and Tollervey, D. (1998). Processing of the Precursors to Small Nucleolar RNAs and rRNAs Requires Common Components. *Mol Cell Biol* 18, 1181–1189.
- Pignon, J.-P., Tribodet, H., Scagliotti, G.V., Douillard, J.-Y., Shepherd, F.A., Stephens, R.J., Dunant, A., Torri, V., Rosell, R., Seymour, L., et al. (2008). Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol* 26, 3552–3559.
- Pijlman, G.P. (2014). Flavivirus RNAi suppression: decoding non-coding RNA. *Current Opinion in Virology* 7, 55–60.
- Pijlman, G.P., Funk, A., Kondratieva, N., Leung, J., Torres, S., van der Aa, L., Liu, W.J., Palmenberg, A.C., Shi, P.-Y., Hall, R.A., et al. (2008). A Highly Structured, Nuclease-Resistant, Noncoding RNA Produced by Flaviviruses Is Required for Pathogenicity. *Cell Host & Microbe* 4, 579–591.
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., and Filipowicz, W. (2005). Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science* 309, 1573–1576.
- Pinnelli, M., and Trusolino, L. (2021). The gRASs Is Greener: Potential New Therapies in Lung Cancer with Acquired Resistance to KRASG12C Inhibitors. *Cancer Discov* 11, 1874–1876.
- Pirozzi, G., Tirino, V., Camerlingo, R., Franco, R., La Rocca, A., Liguori, E., Martucci, N., Paino, F., Normanno, N., and Rocco, G. (2011). Epithelial to mesenchymal transition by TGFβ-1 induction increases stemness characteristics in primary non small cell lung cancer cell line. *PLoS One* 6, e21548.
- Pitchiaya, S., Mourao, M.D.A., Jalihal, A., Xiao, L., Jiang, X., Chinnaiyan, A.M., Schnell, S., and Walter, N.G. (2019). Dynamic recruitment of single RNAs to processing bodies depends on RNA functionality. *Mol Cell* 74, 521-533.e6.
- Planchard, D., Besse, B., Groen, H.J.M., Souquet, P.-J., Quoix, E., Baik, C.S., Barlesi, F., Kim, T.M., Mazieres, J., Novello, S., et al. (2016). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* 17, 984–993.
- Planchard, D., Smit, E.F., Groen, H.J.M., Mazieres, J., Besse, B., Helland, Å., Giannone, V., D’Amelio, A.M., Zhang, P., Mookerjee, B., et al. (2017). Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 18, 1307–1316.

Planchard, D., Popat, S., Kerr, K., Novello, S., Smit, E.F., Faivre-Finn, C., Mok, T.S., Reck, M., Van Schil, P.E., Hellmann, M.D., et al. (2018). Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 29, iv192–iv237.

Prahallad, A., Sun, C., Huang, S., Di Nicolantonio, F., Salazar, R., Zecchin, D., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., and Bernards, R. (2012). Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature* 483, 100–103.

Prior, I.A., Hood, F.E., and Hartley, J.L. (2020). The frequency of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 80, 2969–2974.

Protter, D.S.W., Rao, B.S., Van Treeck, B., Lin, Y., Mizoue, L., Rosen, M.K., and Parker, R. (2018). Intrinsically Disordered Regions Can Contribute Promiscuous Interactions to RNP Granule Assembly. *Cell Rep* 22, 1401–1412.

Pujol, J.-L., Barlesi, F., and Daurès, J.-P. (2006). Should chemotherapy combinations for advanced non-small cell lung cancer be platinum-based? A meta-analysis of phase III randomized trials. *Lung Cancer* 51, 335–345.

Qu, L.-H., Henras, A., Lu, Y.-J., Zhou, H., Zhou, W., Zhu, Y.-Q., Zhao, J., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M., and Bachellerie, J.-P. (1999). Seven Novel Methylation Guide Small Nucleolar RNAs Are Processed from a Common Polycistronic Transcript by Rat1p and RNase III in Yeast. *Mol Cell Biol* 19, 1144–1158.

Rajasekharan, S., and Raman, T. (2013). Ras and Ras mutations in cancer. *Open Life Sciences* 8, 609–624.

Ramalingam, S., and Belani, C. (2008). Systemic chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: recent advances and future directions. *Oncologist* 13 Suppl 1, 5–13.

Rambow, F., Rogiers, A., Marin-Bejar, O., Aibar, S., Femel, J., Dewaele, M., Karras, P., Brown, D., Chang, Y.H., Debiec-Rychter, M., et al. (2018). Toward Minimal Residual Disease-Directed Therapy in Melanoma. *Cell* 174, 843-855.e19.

Rao, A., and Herr, D.R. (2017). G protein-coupled receptor GPR19 regulates E-cadherin expression and invasion of breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864, 1318–1327.

Räsch, F., Weber, R., Izaurralde, E., and Igreja, C. (2020). 4E-T-bound mRNAs are stored in a silenced and deadenylated form. *Genes Dev* 34, 847–860.

Reijns, M.A.M., Alexander, R.D., Spiller, M.P., and Beggs, J.D. (2008). A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *Journal of Cell Science* 121, 2463–2472.

Riback, J.A., Katanski, C.D., Kear-Scott, J.L., Pilipenko, E.V., Rojek, A.E., Sosnick, T.R., and Drummond, D.A. (2017). Stress-triggered phase separation is an adaptive, evolutionarily tuned response. *Cell* 168, 1028-1040.e19.

Rinehart, J., Adjei, A.A., LoRusso, P.M., Waterhouse, D., Hecht, J.R., Natale, R.B., Hamid, O., Varterasian, M., Asbury, P., Kaldjian, E.P., et al. (2004). Multicenter Phase II Study of the Oral MEK Inhibitor, CI-1040, in Patients With Advanced Non-Small-Cell Lung, Breast, Colon, and Pancreatic Cancer. *JCO* 22, 4456–4462.

Ritt, D.A., Monson, D.M., Specht, S.I., and Morrison, D.K. (2010). Impact of feedback phosphorylation and Raf heterodimerization on normal and mutant B-Raf signaling. *Mol Cell Biol* 30, 806–819.

- Robert, C., Karaszewska, B., Schachter, J., Rutkowski, P., Mackiewicz, A., Stroiakovski, D., Lichinitser, M., Dummer, R., Grange, F., Mortier, L., et al. (2014). Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib (Massachusetts Medical Society).
- Robinson, S.D., O'Shaughnessy, J.A., Cowey, C.L., and Konduri, K. (2014). BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma with metastases to the brain responding to treatment with vemurafenib. *Lung Cancer* 85, 326–330.
- Rocks, O., Gerauer, M., Vartak, N., Koch, S., Huang, Z.-P., Pechlivanis, M., Kuhlmann, J., Brunsveld, L., Chandra, A., Ellinger, B., et al. (2010). The Palmitoylation Machinery Is a Spatially Organizing System for Peripheral Membrane Proteins. *Cell* 141, 458–471.
- Roskoski, R. (2019). Targeting ERK1/2 protein-serine/threonine kinases in human cancers. *Pharmacological Research* 142, 151–168.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *J Cell Biol* 196, 801–810.
- Rubinfeld, H., Hanoch, T., and Seger, R. (1999). Identification of a Cytoplasmic-Retention Sequence in ERK2*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 30349–30352.
- Rude Voldborg, B., Damstrup, L., Spang-Thomsen, M., and Skovgaard Poulsen, H. (1997). Epidermal growth factor receptor (EGFR) and EGFR mutations, function and possible role in clinical trials. *Annals of Oncology* 8, 1197–1206.
- Ruff, K.M., Roberts, S., Chilkoti, A., and Pappu, R.V. (2018). Advances in Understanding Stimulus-Responsive Phase Behavior of Intrinsically Disordered Protein Polymers. *J. Mol. Biol.* 430, 4619–4635.
- de Ruiter, N.D., Wolthuis, R.M., van Dam, H., Burgering, B.M., and Bos, J.L. (2000). Ras-dependent regulation of c-Jun phosphorylation is mediated by the Ral guanine nucleotide exchange factor-Ral pathway. *Mol Cell Biol* 20, 8480–8488.
- Rymarquis, L.A., Souret, F.F., and Green, P.J. (2011). Evidence that XRN4, an Arabidopsis homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories. *RNA* 17, 501–511.
- Sabbah, D., Hajjo, R., and Sweidan, K. (2020). Review on Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Structure, Signaling Pathways, Interactions, and Recent Updates of EGFR Inhibitors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 20.
- Saettele, T.M., and Ost, D.E. (2014). Multimodality systematic approach to mediastinal lymph node staging in non-small cell lung cancer. *Respirology* 19, 800–808.
- Saha, M., Carriere, A., Cheerathodi, M., Zhang, X., Lavoie, G., Rush, J., Roux, P.P., and Ballif, B.A. (2012). RSK phosphorylates SOS1 creating 14-3-3-docking sites and negatively regulating MAPK activation. *Biochem J* 447, 159–166.
- Saito, K., Kondo, E., and Matsushita, M. (2011). MicroRNA 130 family regulates the hypoxia response signal through the P-body protein DDX6. *Nucleic Acids Res* 39, 6086–6099.
- Salazar, M.C., Rosen, J.E., Wang, Z., Arnold, B.N., Thomas, D.C., Herbst, R.S., Kim, A.W., Detterbeck, F.C., Blasberg, J.D., and Boffa, D.J. (2017). Association of Delayed Adjuvant Chemotherapy With Survival After Lung Cancer Surgery. *JAMA Oncol* 3, 610–619.

- Salomon, W.E., Jolly, S.M., Moore, M.J., Zamore, P.D., and Serebrov, V. (2015). Single-Molecule Imaging Reveals That Argonaute Reshapes the Binding Properties of Its Nucleic Acid Guides. *Cell* *162*, 84–95.
- Sanders, D.W., Kedersha, N., Lee, D.S.W., Strom, A.R., Drake, V., Riback, J.A., Bracha, D., Eeftens, J.M., Iwanicki, A., Wang, A., et al. (2020). Competing Protein-RNA Interaction Networks Control Multiphase Intracellular Organization. *Cell* *181*, 306-324.e28.
- Sato, K., Shin, M.-S., Sakimura, A., Zhou, Y., Tanaka, T., Kawanishi, M., Kawasaki, Y., Yokoyama, S., Koizumi, K., Saiki, I., et al. (2013). Inverse correlation between Thr-669 and constitutive tyrosine phosphorylation in the asymmetric epidermal growth factor receptor dimer conformation. *Cancer Sci* *104*, 1315–1322.
- Scheller, N., Resa-Infante, P., de la Luna, S., Galao, R.P., Albrecht, M., Kaestner, L., Lipp, P., Lengauer, T., Meyerhans, A., and Díez, J. (2007). Identification of PatL1, a human homolog to yeast P body component Pat1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1773*, 1786–1792.
- Schieweck, R., Ninkovic, J., and Kiebler, M.A. (2021). RNA-binding proteins balance brain function in health and disease. *Physiol Rev* *101*, 1309–1370.
- Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J., and MacRae, I.J. (2014). Structural Basis for microRNA Targeting. *Science* *346*, 608–613.
- Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J., Chandradoss, S.D., Joo, C., and MacRae, I.J. (2015). Water-mediated recognition of t1-adenosine anchors Argonaute2 to microRNA targets. *ELife* *4*, e07646.
- Schmick, M., Vartak, N., Papke, B., Kovacevic, M., Truxius, D.C., Rossmannek, L., and Bastiaens, P.I.H. (2014). KRas Localizes to the Plasma Membrane by Spatial Cycles of Solubilization, Trapping and Vesicular Transport. *Cell* *157*, 459–471.
- Schmid, S., Li, J.J.N., and Leighl, N.B. (2020). Mechanisms of osimertinib resistance and emerging treatment options. *Lung Cancer* *147*, 123–129.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., and Tollervey, D. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res* *37*, 1127–1140.
- Schnettler, E., Sterken, M.G., Leung, J.Y., Metz, S.W., Geertsema, C., Goldbach, R.W., Vlak, J.M., Kohl, A., Khromykh, A.A., and Pijlman, G.P. (2012). Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells. *J Virol* *86*, 13486–13500.
- Schuessler, A., Funk, A., Lazear, H.M., Cooper, D.A., Torres, S., Daffis, S., Jha, B.K., Kumagai, Y., Takeuchi, O., Hertzog, P., et al. (2012). West Nile Virus Noncoding Subgenomic RNA Contributes to Viral Evasion of the Type I Interferon-Mediated Antiviral Response. *Journal of Virology* *86*, 5708–5718.
- Schuster, B.S., Reed, E.H., Parthasarathy, R., Jahnke, C.N., Caldwell, R.M., Bermudez, J.G., Ramage, H., Good, M.C., and Hammer, D.A. (2018). Controllable protein phase separation and modular recruitment to form responsive membraneless organelles. *Nat Commun* *9*, 2985.
- Schütz, S., Nöldeke, E.R., and Sprangers, R. (2017). A synergistic network of interactions promotes the formation of in vitro processing bodies and protects mRNA against decapping. *Nucleic Acids Res* *45*, 6911–6922.

Sebolt-Leopold, J.S., Dudley, D.T., Herrera, R., Becelaere, K.V., Wiland, A., Gowan, R.C., Tecle, H., Barrett, S.D., Bridges, A., Przybranowski, S., et al. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat Med* 5, 810–816.

Sebti, S.M., and Hamilton, A.D. (2000). Farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase I inhibitors and cancer therapy: Lessons from mechanism and bench-to bedside translational studies. *Oncogene* 19, 6584–6593.

Seger, R., Ahn, N.G., Posada, J., Munar, E.S., Jensen, A.M., Cooper, J.A., Cobb, M.H., and Krebs, E.G. (1992). Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J Biol Chem* 267, 14373–14381.

Sen, G.L., and Blau, H.M. (2005). Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7, 633–636.

Serman, A., Le Roy, F., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2007). GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Res* 35, 4715–4727.

Shaffer, S.M., Dunagin, M.C., Torborg, S.R., Torre, E.A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P.A., Xiao, M., et al. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 546, 431–435.

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

Sharma, S.V., Lee, D.Y., Li, B., Quinlan, M.P., Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., Azizian, N., Zou, L., Fischbach, M.A., et al. (2010). A Chromatin-Mediated Reversible Drug-Tolerant State in Cancer Cell Subpopulations. *Cell* 141, 69–80.

Shaw, A.T., Bauer, T.M., de Marinis, F., Felip, E., Goto, Y., Liu, G., Mazieres, J., Kim, D.-W., Mok, T., Polli, A., et al. (2020). First-Line Lorlatinib or Crizotinib in Advanced ALK-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 383, 2018–2029.

She, M., Decker, C.J., Svergun, D.I., Round, A., Chen, N., Muhrad, D., Parker, R., and Song, H. (2008). Structural basis of dcp2 recognition and activation by dcp1. *Mol Cell* 29, 337–349.

Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* 300, 805–808.

Shibatohge, M., Kariya, K. i, Liao, Y., Hu, C.D., Watari, Y., Goshima, M., Shima, F., and Kataoka, T. (1998). Identification of PLC210, a *Caenorhabditis elegans* phospholipase C, as a putative effector of Ras. *J Biol Chem* 273, 6218–6222.

Shimakami, T., Yamane, D., Jangra, R.K., Kempf, B.J., Spaniel, C., Barton, D.J., and Lemon, S.M. (2012). Stabilization of hepatitis C virus RNA by an Ago2–miR-122 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 941–946.

Shlush, L.I., Mitchell, A., Heisler, L., Abelson, S., Ng, S.W.K., Trotman-Grant, A., Medeiros, J.J.F., Rao-Bhatia, A., Jaciw-Zurakowsky, I., Marke, R., et al. (2017). Tracing the origins of relapse in acute myeloid leukaemia to stem cells. *Nature* 547, 104–108.

Shobuike, T., Tatebayashi, K., Tani, T., Sugano, S., and Ikeda, H. (2001). The *dhp1+* gene, encoding a putative nuclear 5'→3' exoribonuclease, is required for proper chromosome segregation in fission yeast. *Nucleic Acids Res* 29, 1326–1333.

- Shoemaker, C.J., Eyler, D.E., and Green, R. (2010). Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop off to initiate no-go decay. *Science* 330, 369–372.
- Shu, D., Shu, Y., Haque, F., Abdelmawla, S., and Guo, P. (2011). Thermodynamically Stable RNA three-way junctions as platform for constructing multi-functional nanoparticles for delivery of therapeutics. *Nat Nanotechnol* 6, 658–667.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68, 7–30.
- Sigismund, S., Avanzato, D., and Lanzetti, L. (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* 12, 3–20.
- Silva, P.A.G.C., Pereira, C.F., Dalebout, T.J., Spaan, W.J.M., and Bredenbeek, P.J. (2010). An RNA Pseudoknot Is Required for Production of Yellow Fever Virus Subgenomic RNA by the Host Nuclease XRN1. *J Virol* 84, 11395–11406.
- Simms, C.L., Thomas, E.N., and Zaher, H.S. (2017). Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8.
- Singh, P., Saha, U., Paira, S., and Das, B. (2018). Nuclear mRNA Surveillance Mechanisms: Function and Links to Human Disease. *Journal of Molecular Biology* 430, 1993–2013.
- Sinturel, F., Bréchemier-Baey, D., Kiledjian, M., Condon, C., and Bénard, L. (2012). Activation of 5′-3′ exoribonuclease Xrn1 by cofactor Dcs1 is essential for mitochondrial function in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8264–8269.
- Skeparnias, I., Anastasakis, D., Shaukat, A.-N., Grafanaki, K., and Stathopoulos, C. (2017). Expanding the repertoire of deadenylases. *RNA Biol* 14, 1320–1325.
- Skoulidis, F., Li, B.T., Dy, G.K., Price, T.J., Falchook, G.S., Wolf, J., Italiano, A., Schuler, M., Borghaei, H., Barlesi, F., et al. (2021). Sotorasib for Lung Cancers with KRAS p.G12C Mutation. *New England Journal of Medicine*.
- Skourti-Stathaki, K., Proudfoot, N.J., and Gromak, N. (2011). Human senataxin resolves RNA/DNA hybrids formed at transcriptional pause sites to promote Xrn2-dependent termination. *Mol Cell* 42, 794–805.
- Snijders Blok, L., Madsen, E., Juusola, J., Gilissen, C., Baralle, D., Reijnders, M.R.F., Venselaar, H., Helsmoortel, C., Cho, M.T., Hoischen, A., et al. (2015). Mutations in DDX3X Are a Common Cause of Unexplained Intellectual Disability with Gender-Specific Effects on Wnt Signaling. *Am J Hum Genet* 97, 343–352.
- Soda, M., Choi, Y.L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., et al. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448, 561–566.
- Soh, J., Okumura, N., Lockwood, W.W., Yamamoto, H., Shigematsu, H., Zhang, W., Chari, R., Shames, D.S., Tang, X., MacAulay, C., et al. (2009). Oncogene Mutations, Copy Number Gains and Mutant Allele Specific Imbalance (MASI) Frequently Occur Together in Tumor Cells. *PLoS One* 4, e7464.
- Solinger, J.A., Pascolini, D., and Heyer, W.-D. (1999). Active-Site Mutations in the Xrn1p Exoribonuclease of *Saccharomyces cerevisiae* Reveal a Specific Role in Meiosis. *Mol Cell Biol* 19, 5930–5942.

Solit, D.B., Garraway, L.A., Pratilas, C.A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J.M., She, Y., Osman, I., et al. (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* *439*, 358–362.

Solomon, B.J., Kim, D.-W., Wu, Y.-L., Nakagawa, K., Mekhail, T., Felip, E., Cappuzzo, F., Paolini, J., Usari, T., Tang, Y., et al. (2018). Final Overall Survival Analysis From a Study Comparing First-Line Crizotinib Versus Chemotherapy in ALK-Mutation-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *JCO* *36*, 2251–2258.

Sołtys, K., Wycisk, K., and Ożyhar, A. (2021). Liquid-liquid phase separation of the intrinsically disordered AB region of hRXR γ is driven by hydrophobic interactions. *International Journal of Biological Macromolecules* *183*, 936–949.

Sordella, R., Bell, D.W., Haber, D.A., and Settleman, J. (2004). Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science* *305*, 1163–1167.

Standart, N., and Weil, D. (2018). P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage. *Trends in Genetics* *34*, 612–626.

Steckelberg, A.-L., Akiyama, B.M., Costantino, D.A., Sit, T.L., Nix, J.C., and Kieft, J.S. (2018). A folded viral noncoding RNA blocks host cell exoribonucleases through a conformationally dynamic RNA structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, 6404–6409.

Stevens, A. (1980). Purification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* exoribonuclease which yields 5'-mononucleotides by a 5' leads to 3' mode of hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* *255*, 3080–3085.

Stevens, A., and Poole, T.L. (1995). 5'-Exonuclease-2 of *Saccharomyces cerevisiae* PURIFICATION AND FEATURES OF RIBONUCLEASE ACTIVITY WITH COMPARISON TO 5'-EXONUCLEASE-1. *J. Biol. Chem.* *270*, 16063–16069.

Stowell, J.A.W., Webster, M.W., Kögel, A., Wolf, J., Shelley, K.L., and Passmore, L.A. (2016). Reconstitution of Targeted Deadenylation by the Ccr4-Not Complex and the YTH Domain Protein Mmi1. *Cell Rep* *17*, 1978–1989.

Su, F., Viros, A., Milagre, C., Trunzer, K., Bollag, G., Spleiss, O., Reis-Filho, J.S., Kong, X., Koya, R.C., Flaherty, K.T., et al. (2012). RAS mutations in cutaneous squamous-cell carcinomas in patients treated with BRAF inhibitors. *N Engl J Med* *366*, 207–215.

Su, Y., Wei, W., Robert, L., Xue, M., Tsoi, J., Garcia-Diaz, A., Homet Moreno, B., Kim, J., Ng, R.H., Lee, J.W., et al. (2017). Single-cell analysis resolves the cell state transition and signaling dynamics associated with melanoma drug-induced resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* *114*, 13679–13684.

Sun, L., Chen, H., Ming, X., Bo, Z., Shin, H.-J., Jung, Y.-S., and Qian, Y. (2021). Porcine Epidemic Diarrhea Virus Infection Induces Caspase-8-Mediated G3BP1 Cleavage and Subverts Stress Granules To Promote Viral Replication. *J Virol* *95*.

Sun, Y., Alberta, J.A., Pilarz, C., Calligaris, D., Chadwick, E.J., Ramkissoon, S.H., Ramkissoon, L.A., Garcia, V.M., Mazzola, E., Goumnerova, L., et al. (2017). A brain-penetrant RAF dimer antagonist for the noncanonical BRAF oncoprotein of pediatric low-grade astrocytomas. *Neuro Oncol* *19*, 774–785.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* *71*, 209–249.

- Swanton, C. (2012). Intratumour Heterogeneity: Evolution through Space and Time. *Cancer Res* 72, 4875–4882.
- Szádeczky-Kardoss, I., Gál, L., Auber, A., Taller, J., and Silhavy, D. (2018). The No-go decay system degrades plant mRNAs that contain a long A-stretch in the coding region. *Plant Science* 275, 19–27.
- Takahara, T., and Maeda, T. (2012). Transient sequestration of TORC1 into stress granules during heat stress. *Mol Cell* 47, 242–252.
- Takahashi, M., Higuchi, M., Matsuki, H., Yoshita, M., Ohsawa, T., Oie, M., and Fujii, M. (2013). Stress Granules Inhibit Apoptosis by Reducing Reactive Oxygen Species Production. *Mol Cell Biol* 33, 815–829.
- Takaoka, S., Yanagiya, A., Mohamed, H.M.A., Higa, R., Abe, T., Inoue, K., Takahashi, A., Stoney, P., and Yamamoto, T. (2021). Neuronal XRN1 is required for maintenance of whole-body metabolic homeostasis. *IScience* 24, 103151.
- Takeda, M., Sakai, K., Takahama, T., Fukuoka, K., Nakagawa, K., and Nishio, K. (2019). New Era for Next-Generation Sequencing in Japan. *Cancers (Basel)* 11, 742.
- Takishima, K., Griswold-Prenner, I., Ingebritsen, T., and Rosner, M.R. (1991). Epidermal growth factor (EGF) receptor T669 peptide kinase from 3T3-L1 cells is an EGF-stimulated “MAP” kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 2520–2524.
- Tanaka, N., Lin, J.J., Li, C., Ryan, M.B., Zhang, J., Kiedrowski, L.A., Michel, A.G., Syed, M.U., Fella, K.A., Sakhi, M., et al. (2021). Clinical Acquired Resistance to KRASG12C Inhibition through a Novel KRAS Switch-II Pocket Mutation and Polyclonal Alterations Converging on RAS–MAPK Reactivation. *Cancer Discov* 11, 1913–1922.
- Tang, Q., Wu, J., Zheng, F., Hann, S.S., and Chen, Y. (2017). Emodin Increases Expression of Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 through Activation of MEK/ERK/AMPK α and Interaction of PPAR γ and Sp1 in Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem* 41, 339–357.
- Tauber, D., Tauber, G., Khong, A., Van Treeck, B., Pelletier, J., and Parker, R. (2020). Modulation of RNA Condensation by the DEAD-Box Protein eIF4A. *Cell* 180, 411–426.e16.
- Taylor, S.S., and Kornev, A.P. (2011). Protein Kinases: Evolution of Dynamic Regulatory Proteins. *Trends Biochem Sci* 36, 65–77.
- Teixeira, D., and Parker, R. (2007). Analysis of P-Body Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18, 2274–2287.
- Teixeira, D., SHETH, U., VALENCIA-SANCHEZ, M.A., BRENGUES, M., and PARKER, R. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* 11, 371–382.
- Terrell, E.M., and Morrison, D.K. (2019). Ras-Mediated Activation of the Raf Family Kinases. *Cold Spring Harb Perspect Med* 9, a033746.
- Terrell, E.M., Durrant, D.E., Ritt, D.A., Sealover, N.E., Sheffels, E., Spencer-Smith, R., Esposito, D., Zhou, Y., Hancock, J.F., Kortum, R.L., et al. (2019). Distinct Binding Preferences between Ras and Raf Family Members and the Impact on Oncogenic Ras Signaling. *Mol Cell* 76, 872–884.e5.
- Tesina, P., Heckel, E., Cheng, J., Fromont-Racine, M., Buschauer, R., Kater, L., Beatrix, B., Berninghausen, O., Jacquier, A., Becker, T., et al. (2019). Structure of the 80S ribosome–Xrn1 nuclease complex. *Nature Structural & Molecular Biology* 26, 275–280.

- Tharun, S. (2009). Lsm1-7-Pat1 complex: a link between 3' and 5'-ends in mRNA decay? *RNA Biol* 6, 228–232.
- Thedieck, K., Holzwarth, B., Prentzell, M.T., Boehlke, C., Kläsener, K., Ruf, S., Sonntag, A.G., Maerz, L., Grellscheid, S.-N., Kremmer, E., et al. (2013). Inhibition of mTORC1 by Astrin and Stress Granules Prevents Apoptosis in Cancer Cells. *Cell* 154, 859–874.
- Thibault, P.A., Huys, A., Amador-Cañizares, Y., Gailius, J.E., Pinel, D.E., and Wilson, J.A. (2015). Regulation of Hepatitis C Virus Genome Replication by Xrn1 and MicroRNA-122 Binding to Individual Sites in the 5' Untranslated Region. *J Virol* 89, 6294–6311.
- Tomecki, R., Kristiansen, M.S., Lykke-Andersen, S., Chlebowski, A., Larsen, K.M., Szczesny, R.J., Drazkowska, K., Pastula, A., Andersen, J.S., Stepien, P.P., et al. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J* 29, 2342–2357.
- Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B., et al. (2012). Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 366, 2443–2454.
- Tourrière, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J.M., Bertrand, E., and Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol* 160, 823–831.
- Towler, B.P., and Newbury, S.F. (2018). Regulation of cytoplasmic RNA stability: Lessons from *Drosophila*. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 9, e1499.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A.G., Geisinger, K., Yatabe, Y., Ishikawa, Y., Wistuba, I., Flieder, D.B., Franklin, W., et al. (2012). Diagnosis of Lung Adenocarcinoma in Resected Specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society Classification. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 137, 685–705.
- Travis, W.D., Brambilla, E., and Riely, G.J. (2013). New Pathologic Classification of Lung Cancer: Relevance for Clinical Practice and Clinical Trials. *JCO* 31, 992–1001.
- Travis, W.D., Asamura, H., Bankier, A.A., Beasley, M.B., Detterbeck, F., Flieder, D.B., Goo, J.M., MacMahon, H., Naidich, D., Nicholson, A.G., et al. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Coding T Categories for Subsolid Nodules and Assessment of Tumor Size in Part-Solid Tumors in the Forthcoming Eighth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 11, 1204–1223.
- Treack, B.V., Protter, D.S.W., Matheny, T., Khong, A., Link, C.D., and Parker, R. (2018). RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, 2734.
- Trenker, R., and Jura, N. (2020). Receptor Tyrosine Kinase activation: from the ligand perspective. *Curr Opin Cell Biol* 63, 174–185.
- Tritschler, F., Eulalio, A., Truffault, V., Hartmann, M.D., Helms, S., Schmidt, S., Coles, M., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2007). A Divergent Sm Fold in EDC3 Proteins Mediates DCP1 Binding and P-Body Targeting. *Mol Cell Biol* 27, 8600–8611.
- Tsai, N.-P., and Wei, L.-N. (2010). RhoA/ROCK1 signaling regulates stress granules formation and apoptosis. *Cell Signal* 22, 668.

- Tsao, M.-S., Sakurada, A., Cutz, J.-C., Zhu, C.-Q., Kamel-Reid, S., Squire, J., Lorimer, I., Zhang, T., Liu, N., Daneshmand, M., et al. (2009). Erlotinib in Lung Cancer — Molecular and Clinical Predictors of Outcome (Massachusetts Medical Society).
- Tsoi, J., Robert, L., Paraiso, K., Galvan, C., Sheu, K.M., Lay, J., Wong, D.J.L., Atefi, M., Shirazi, R., Wang, X., et al. (2018). Multi-stage differentiation defines melanoma subtypes with differential vulnerability to drug-induced iron-dependent oxidative stress. *Cancer Cell* 33, 890–904.e5.
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., and Inada, T. (2012). Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality-Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3' End of Aberrant mRNA. *Molecular Cell* 46, 518–529.
- Turski, M.L., Vidwans, S.J., Janku, F., Garrido-Laguna, I., Munoz, J., Schwab, R., Subbiah, V., Rodon, J., and Kurzrock, R. (2016). Genomically Driven Tumors and Actionability across Histologies: BRAF-Mutant Cancers as a Paradigm. *Mol Cancer Ther* 15, 533–547.
- Tutucci, E., Vera, M., Biswas, J., Garcia, J., Parker, R., and Singer, R.H. (2018). An improved MS2 system for accurate reporting of the mRNA life cycle. *Nat Methods* 15, 81–89.
- Ueki, K., Matsuda, S., Tobe, K., Gotoh, Y., Tamemoto, H., Yachi, M., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Nishida, E., and Kadowaki, T. (1994). Feedback regulation of mitogen-activated protein kinase kinase activity of c-Raf-1 by insulin and phorbol ester stimulation. *Journal of Biological Chemistry* 269, 15756–15761.
- Ünal, E.B., Uhlitz, F., and Blüthgen, N. (2017). A compendium of ERK targets. *FEBS Letters* 591, 2607–2615.
- Ungar, L., Yosef, N., Sela, Y., Sharan, R., Ruppin, E., and Kupiec, M. (2009). A genome-wide screen for essential yeast genes that affect telomere length maintenance. *Nucleic Acids Res* 37, 3840–3849.
- Unterholzner, L., and Izaurralde, E. (2004). SMG7 Acts as a Molecular Link between mRNA Surveillance and mRNA Decay. *Molecular Cell* 16, 587–596.
- Uversky, V.N., Kuznetsova, I.M., Turoverov, K.K., and Zaslavsky, B. (2015). Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates. *FEBS Letters* 589, 15–22.
- Vakana, E., Pratt, S., Blosser, W., Dowless, M., Simpson, N., Yuan, X.-J., Jaken, S., Manro, J., Stephens, J., Zhang, Y., et al. (2017). LY3009120, a panRAF inhibitor, has significant anti-tumor activity in BRAF and KRAS mutant preclinical models of colorectal cancer. *Oncotarget* 8, 9251–9266.
- Valkov, E., Jonas, S., and Weichenrieder, O. (2017). Mille viae in eukaryotic mRNA decapping. *Current Opinion in Structural Biology* 47, 40–51.
- Van Treeck, B., and Parker, R. (2018). Emerging roles for intermolecular RNA-RNA interactions in RNP assemblies. *Cell* 174, 791–802.
- Vavvas, D., Li, X., Avruch, J., and Zhang, X.F. (1998). Identification of Nore1 as a potential Ras effector. *J Biol Chem* 273, 5439–5442.
- Velu, T.J., Beguinot, L., Vass, W.C., Willingham, M.C., Merlino, G.T., Pastan, I., and Lowy, D.R. (1987). Epidermal-growth-factor-dependent transformation by a human EGF receptor proto-oncogene. *Science* 238, 1408–1410.

- Villanueva, J., Vultur, A., Lee, J.T., Somasundaram, R., Fukunaga-Kalabis, M., Cipolla, A.K., Wubbenhorst, B., Xu, X., Gimotty, P.A., Kee, D., et al. (2010). Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* 18, 683–695.
- Vindry, C., Marnef, A., Broomhead, H., Twyffels, L., Ozgur, S., Stoecklin, G., Llorian, M., Smith, C.W., Mata, J., Weil, D., et al. (2017). Dual RNA Processing Roles of Pat1b via Cytoplasmic Lsm1-7 and Nuclear Lsm2-8 Complexes. *Cell Rep* 20, 1187–1200.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 489–501.
- Voigt, F., Gerbracht, J.V., Boehm, V., Horvathova, I., Eglinger, J., Chao, J.A., and Gehring, N.H. (2019). Detection and quantification of RNA decay intermediates using XRN1-resistant reporter transcripts. *Nat Protoc* 14, 1603–1633.
- Waldron, J.A., Jones, C.I., Towler, B.P., Pashler, A.L., Grima, D.P., Hebbes, S., Crossman, S.H., Zabolotskaya, M.V., and Newbury, S.F. (2015). Xrn1/Pacman affects apoptosis and regulates expression of hid and reaper. *Biol Open* 4, 649–660.
- Wang, Z. (2017). ErbB Receptors and Cancer. In *ErbB Receptor Signaling: Methods and Protocols*, Z. Wang, ed. (New York, NY: Springer), pp. 3–35.
- Wang, M., and Pestov, D.G. (2011). 5'-end surveillance by Xrn2 acts as a shared mechanism for mammalian pre-rRNA maturation and decay. *Nucleic Acids Res* 39, 1811–1822.
- Wang, C., Schmich, F., Srivatsa, S., Weidner, J., Beerenwinkel, N., and Spang, A. (2018). Context-dependent deposition and regulation of mRNAs in P-bodies. *ELife* 7, e29815.
- Wang, J., Gudikote, J.P., Olivas, O.R., and Wilkinson, M.F. (2002). Boundary-independent polar nonsense-mediated decay. *EMBO Rep* 3, 274–279.
- Wang, W., Fang, G., and Rudolph, J. (2012). Ras inhibition via direct Ras binding—is there a path forward? *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22, 5766–5776.
- Wang, Y., Van Becelaere, K., Jiang, P., Przybranowski, S., Omer, C., and Sebolt-Leopold, J. (2005). A Role for K-ras in Conferring Resistance to the MEK Inhibitor, CI-1040. *Neoplasia* 7, 336–347.
- Wartmann, M., Hofer, P., Turowski, P., Saltiel, A.R., and Hynes, N.E. (1997). Negative modulation of membrane localization of the Raf-1 protein kinase by hyperphosphorylation. *J Biol Chem* 272, 3915–3923.
- Wauson, E.M., Guerra, M.L., Barylko, B., Albanesi, J.P., and Cobb, M.H. (2013). Off-target effects of MEK inhibitors. *Biochemistry* 52, 10.1021/bi4007644.
- Wei, M.-T., Elbaum-Garfinkle, S., Holehouse, A.S., Chen, C.C.-H., Feric, M., Arnold, C.B., Priestley, R.D., Pappu, R.V., and Brangwynne, C.P. (2017). Phase behaviour of disordered proteins underlying low density and high permeability of liquid organelles. *Nature Chem* 9, 1118–1125.
- Weiss, R.H., Maga, E.A., and Ramirez, A. (1998). MEK inhibition augments Raf activity, but has variable effects on mitogenesis, in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 274, C1521–C1529.
- Wellbrock, C., Karasarides, M., and Marais, R. (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 875–885.

- Weng, M., Feng, Y., He, Y., Yang, W., Li, J., Zhu, Y., Wang, T., Wang, C., Zhang, X., Qiao, Y., et al. (2021). Hypoxia-Induced LIN28A mRNA Promotes the Metastasis of Colon Cancer in a Protein-Coding-Independent Manner. *Front. Cell Dev. Biol.* 9.
- West, S., Gromak, N., and Proudfoot, N.J. (2004). Human 5' → 3' exonuclease Xrn2 promotes transcription termination at co-transcriptional cleavage sites. *Nature* 432, 522–525.
- Whyte, D.B., Kirschmeier, P., Hockenberry, T.N., Nunez-Oliva, I., James, L., Catino, J.J., Bishop, W.R., and Pai, J.K. (1997). K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *J Biol Chem* 272, 14459–14464.
- Wilczynska, A., Aigueperse, C., Kress, M., Dautry, F., and Weil, D. (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci* 118, 981–992.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11, 228–234.
- Winter-Vann, A.M., Kamen, B.A., Bergo, M.O., Young, S.G., Melnyk, S., James, S.J., and Casey, P.J. (2003). Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: An unexpected property of methotrexate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 6529–6534.
- Winton, T., Livingston, R., Johnson, D., Rigas, J., Johnston, M., Butts, C., Cormier, Y., Goss, G., Inculet, R., Vallieres, E., et al. (2005). Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 352, 2589–2597.
- Wippich, F., Bodenmiller, B., Trajkovska, M.G., Wanka, S., Aebersold, R., and Pelkmans, L. (2013). Dual specificity kinase DYRK3 couples stress granule condensation/dissolution to mTORC1 signaling. *Cell* 152, 791–805.
- Wolf, J., and Passmore, L.A. (2014). mRNA Deadenylation by Pan2/Pan3. *Biochem Soc Trans* 42, 184–187.
- Wong, D.W.-S., Leung, E.L.-H., So, K.K.-T., Tam, I.Y.-S., Sihoe, A.D.-L., Cheng, L.-C., Ho, K.-K., Au, J.S.-K., Chung, L.-P., Pik Wong, M., et al. (2009). The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer* 115, 1723–1733.
- Wright, L.P., and Philips, M.R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res* 47, 883–891.
- Wu, P.-K., and Park, J.-I. (2015). MEK1/2 Inhibitors: Molecular Activity and Resistance Mechanisms. *Semin Oncol* 42, 849–862.
- Wu, K., He, J., Pu, W., and Peng, Y. (2018). The Role of Exportin-5 in MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 16, 120–126.
- Wu, X.-L., Huang, H., Huang, Y.-Y., Yuan, J.-X., Zhou, X., and Chen, Y.-M. (2015). Reduced Pumilio-2 expression in patients with temporal lobe epilepsy and in the lithium–pilocarpine induced epilepsy rat model. *Epilepsy & Behavior* 50, 31–39.
- Wurm, J.P., Holdermann, I., Overbeck, J.H., Mayer, P.H.O., and Sprangers, R. (2017). Changes in conformational equilibria regulate the activity of the Dcp2 decapping enzyme. *PNAS* 114, 6034–6039.
- Xiang, S., Cooper-Morgan, A., Jiao, X., Kiledjian, M., Manley, J.L., and Tong, L. (2009a). Structure and function of the 5'→3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. *Nature* 458, 784–788.

- Xie, M., Xu, X., and Fan, Y. (2021). KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: An Emerging Promisingly Treatable Subgroup. *Front Oncol* *11*, 672612.
- Xing, W., Muhlrad, D., Parker, R., and Rosen, M.K. (2020). A quantitative inventory of yeast P body proteins reveals principles of composition and specificity. *ELife* *9*.
- Xu, D., Marquis, K., Pei, J., Fu, S.-C., Çağatay, T., Grishin, N.V., and Chook, Y.M. (2015). LocNES: a computational tool for locating classical NESs in CRM1 cargo proteins. *Bioinformatics* *31*, 1357–1365.
- Xue, Y., Bai, X., Lee, I., Kallstrom, G., Ho, J., Brown, J., Stevens, A., and Johnson, A.W. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* RAI1 (YGL246c) Is Homologous to Human DOM3Z and Encodes a Protein That Binds the Nuclear Exoribonuclease Rat1p. *Mol Cell Biol* *20*, 4006–4015.
- Xue, Z., Yan, H., Li, J., Liang, S., Cai, X., Chen, X., Wu, Q., Gao, L., Wu, K., Nie, Y., et al. (2012). Identification of cancer stem cells in vincristine preconditioned SGC7901 gastric cancer cell line. *J Cell Biochem* *113*, 302–312.
- Yaktapour, N., Meiss, F., Mastroianni, J., Zenz, T., Andrlova, H., Mathew, N.R., Claus, R., Hutter, B., Fröhling, S., Brors, B., et al. (2014). BRAF inhibitor-associated ERK activation drives development of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* *124*, 5074–5084.
- Yamaguchi, T., Kakefuda, R., Tajima, N., Sowa, Y., and Sakai, T. (2011). Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *International Journal of Oncology* *39*, 23–31.
- Yang, J.X., Rastetter, R.H., and Wilhelm, D. (2016). Non-coding RNAs: An Introduction. In *Non-Coding RNA and the Reproductive System*, D. Wilhelm, and P. Bernard, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 13–32.
- Yang, W., Lee, J.Y., and Nowotny, M. (2006a). Making and Breaking Nucleic Acids: Two-Mg²⁺-Ion Catalysis and Substrate Specificity. *Molecular Cell* *22*, 5–13.
- Yang, W.-H., Yu, J.H., Gulick, T., Bloch, K.D., and Bloch, D.B. (2006b). RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules. *RNA* *12*, 547–554.
- Yang, Z., Jakymiw, A., Wood, M.R., Eystathioy, T., Rubin, R.L., Fritzler, M.J., and Chan, E.K.L. (2004b). GW182 is critical for the stability of GW bodies expressed during the cell cycle and cell proliferation. *Journal of Cell Science* *117*, 5567–5578.
- Yao, Z., Torres, N.M., Tao, A., Gao, Y., Luo, L., Li, Q., de Stanchina, E., Abdel-Wahab, O., Solit, D.B., Poulidakos, P.I., et al. (2015). BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition. *Cancer Cell* *28*, 370–383.
- Yao, Z., Gao, Y., Su, W., Yaeger, R., Tao, J., Na, N., Zhang, Y., Zhang, C., Rymar, A., Tao, A., et al. (2019). RAF inhibitor PLX8394 selectively disrupts BRAF dimers and RAS-independent BRAF-mutant-driven signaling. *Nat Med* *25*, 284–291.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer: signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer* *37*, 3–8.
- Yeh, T.C., Marsh, V., Bernat, B.A., Ballard, J., Colwell, H., Evans, R.J., Parry, J., Smith, D., Brandhuber, B.J., Gross, S., et al. (2007). Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin Cancer Res* *13*, 1576–1583.

- Yi, H., Park, J., Ha, M., Lim, J., Chang, H., and Kim, V.N. (2018). PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay. *Mol Cell* **70**, 1081-1088.e5.
- Yoshino, S., Matsui, Y., Fukui, Y., Seki, M., Yamaguchi, K., Kanamori, A., Saitoh, Y., Shimamura, T., Suzuki, Y., Furukawa, Y., et al. (2020). EXOSC9 depletion attenuates P-body formation, stress resistance, and tumorigenicity of cancer cells. *Sci Rep* **10**.
- Youn, J.-Y., Dunham, W.H., Hong, S.J., Knight, J.D.R., Bashkurov, M., Chen, G.I., Bagci, H., Rathod, B., MacLeod, G., Eng, S.W.M., et al. (2018). High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies. *Molecular Cell* **69**, 517-532.e11.
- Yu, C., Shen, B., You, K., Huang, Q., Shi, M., Wu, C., Chen, Y., Zhang, C., and Li, T. (2021). Proteome-scale analysis of phase-separated proteins in immunofluorescence images. *Briefings in Bioinformatics* **22**.
- Yu, J.H., YANG, W.-H., GULICK, T., BLOCH, K.D., and BLOCH, D.B. (2005). Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body. *RNA* **11**, 1795–1802.
- Zakrevsky, P., Kasprzak, W.K., Heinz, W.F., Wu, W., Khant, H., Bindewald, E., Dorjsuren, N., Fields, E.A., Val, N. de, Jaeger, L., et al. (2020). Truncated tetrahedral RNA nanostructures exhibit enhanced features for delivery of RNAi substrates. *Nanoscale* **12**, 2555–2568.
- Zakrzewska-Placzek, M., Souret, F.F., Sobczyk, G.J., Green, P.J., and Kufel, J. (2010). *Arabidopsis thaliana* XRN2 is required for primary cleavage in the pre-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* **38**, 4487–4502.
- Zangari, J., Ilie, M., Rouaud, F., Signetti, L., Ohanna, M., Didier, R., Roméo, B., Goldoni, D., Nottet, N., Staedel, C., et al. (2017). Rapid decay of engulfed extracellular miRNA by XRN1 exonuclease promotes transient epithelial-mesenchymal transition. *Nucleic Acids Res* **45**, 4131–4141.
- Zayat, V., Balcerak, A., Korczynski, J., Trebinska, A., Wysocki, J., Sarnowska, E., Chmielarczyk, M., Macech, E., Konopiński, R., Dziembowska, M., et al. (2015). HAX-1: A Novel P-Body Protein. *DNA Cell Biol* **34**, 43–54.
- Zhang, C., Spevak, W., Zhang, Y., Burton, E.A., Ma, Y., Habets, G., Zhang, J., Lin, J., Ewing, T., Matusow, B., et al. (2015). RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. *Nature* **526**, 583–586.
- Zhang, H., Lu, Y., Chen, E., Li, X., Lv, B., Vikis, H.G., and Liu, P. (2017). XRN2 promotes EMT and metastasis through regulating maturation of miR-10a. *Oncogene* **36**, 3925–3933.
- Zhang, K., Dion, N., Fuchs, B., Damron, T., Gitelis, S., Irwin, R., O'Connor, M., Schwartz, H., Scully, S.P., Rock, M.G., et al. (2002). The human homolog of yeast SEP1 is a novel candidate tumor suppressor gene in osteogenic sarcoma. *Gene* **298**, 121–127.
- Zhang, Q.-Y., Li, X.-F., Niu, X., Li, N., Wang, H.-J., Deng, C.-L., Ye, H.-Q., Huang, X.-Y., Chen, Q., Xu, Y.-P., et al. (2020a). Short Direct Repeats in the 3' Untranslated Region Are Involved in Subgenomic Flaviviral RNA Production. *Journal of Virology* **94**.
- Zhang, Z., Gao, R., Hu, Q., Peacock, H., Peacock, D.M., Dai, S., Shokat, K.M., and Suga, H. (2020b). GTP-State-Selective Cyclic Peptide Ligands of K-Ras(G12D) Block Its Interaction with Raf. *ACS Cent Sci* **6**, 1753–1761.

Zhao, X., Li, X., Zhang, P., Li, C., Feng, W., Zhu, X., and Wei, D. (2020). Effects of 5'-3' Exonuclease Xrn1 on Cell Size, Proliferation and Division, and mRNA Levels of Periodic Genes in *Cryptococcus neoformans*. *Genes* *11*, 430.

Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.-Y.A., Zhu, W., He, X., and Shyu, A.-B. (2008). Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J Cell Biol* *182*, 89–101.

Zhou, H., Huang, C., and Xia, X.G. (2008). A tightly regulated Pol III promoter for synthesis of miRNA genes in tandem. *Biochim Biophys Acta* *1779*, 773–779.

Zhou, M., Bail, S., Plasterer, H.L., Rusche, J., and Kiledjian, M. (2015). DcpS is a transcript-specific modulator of RNA in mammalian cells. *RNA* *21*, 1306–1312.

Zinder, J.C., and Lima, C.D. (2017). Targeting RNA for processing or destruction by the eukaryotic RNA exosome and its cofactors. *Genes Dev* *31*, 88–100.

Zünd, D., Gruber, A.R., Zavolan, M., and Mühlemann, O. (2013). Translation-dependent displacement of UPF1 from coding sequences causes its enrichment in 3' UTRs. *Nature Structural & Molecular Biology* *20*, 936–943.

ANNEXES :

Forum

New technologies for improved relevance in miRNA research

Karine Jacquet ^{1,2,6}
 Olivia Vidal-Cruchez ^{1,2,6}
 Roger Rezzonico ^{2,3}
 Victoria J. Nicolini ^{1,2}
 Baharia Mograbi ^{1,2}
 Paul Hofman ^{1,2,4}
 Georges Vassaux ^{2,3,6}
 Bernard Mari ^{2,5,6,*} and
 Patrick Brest ^{1,2,6,*}

After a number of years of research in the field of miRNA, the robustness and biological relevance of many published articles is increasingly being questioned. We propose the use of new RNA-seq approaches, genome editing technologies, and updated public databases to improve the quality, reliability, and relevance of published data.

miRNA expression level and cellular source: 'join together'

Is your **microRNA** (miRNA; see [Glossary](#)) of interest expressed in relevant cell types? This point may sound obvious, but in many cases, this is an open question. It is common to find models in which a selected miRNA is overexpressed in cells different from its 'normally associated' cell type, leading to a misinterpretation of the data. This postulate is particularly true for blood-specific miRNAs (such as myeloid lineage-specific miR-223 or the erythrocyte-specific miR-451 and miR-144) [1]. Small changes in neutrophils or red blood cell content during tissue collection lead to incorrect conclusions. Similarly, the accumulation of miRNA-enriched extracellular vesicles within a tissue [2] may also be due to small hemorrhages. We propose the following recommendations: (i) check

in public databases, such as the **Cancer Cell Line Encyclopedia** [3] and the **human cellular microRNAome** [1] (accessible as a National Center for Biotechnology Information BioProject database with the University of California, Santa Cruz Genome Browser), for the tissue selectivity of the miRNA, preferably in pure cell populations, (ii) perform small RNA sequencing or absolute RT-qPCR quantification to address the expression level in combination with (iii) single or multiplexed fluorescence *in situ* hybridization (FISH) experiments to validate the localization in a specific cell type.

Altogether, these recommendations should help provide genuine models for investigating miRNA function in the proper cell type.

Mimic transfection: like a bull in a china shop?

Another point of concern is the extent to which a slight variation in miRNA expression may contribute to a specific cellular phenotypic change. This response depends on the ratio between the number of miRNAs and the number of targets, as well as their respective affinities. Thus, one can propose that to observe an effect, a minimal expression level should be achieved for miRNAs with a low level of expression, regardless of their induction level. In contrast, modest changes in highly expressed miRNAs may have consequences primarily on low-affinity targets. Although this aspect may appear trivial, it is largely overlooked and poorly studied.

If functional gain-of-function experiments addressing the physiological relevance of an miRNA are required, these experiments should go beyond current methods. For example, transient transfection or viral transduction leads to an over-representation of miRNA species that breaks the subtle miRNA equilibrium in the cell with the replacement of natural miRNA in the RNA-induced silencing complex (RISC) complex and may lead to RISC complex saturation.

Glossary

Antisense oligonucleotides (ASOs): synthetic RNAs that target various RNA families, including miRNAs, lncRNAs, and mRNAs, to alter RNA function through a variety of mechanisms, including direct steric blockage (most miRNA inhibitors), ribonuclease H-mediated decay of the precursor (pre-mRNA, pre-lncRNAs, pre-miRNAs), and exon content modulation through splicing site binding on pre-mRNAs. Antisense therapies have been accepted for different treatments worldwide.

Cancer Cell Line Encyclopedia: the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) project aims to conduct a detailed genetic, epigenetic, transcriptomic, and proteomic characterization of a large panel of human cancer cell lines. The CCLE provides public access to data, visualization, and analysis for over 1100 cancer cell lines.

Extracellular RNA Communication Consortium: portal that is a central access point for exRNA resources, including protocols, data, reagents, software, and data standards. It provides a catalog of exRNA molecules found in human biofluids such as plasma, saliva, and urine (>50 000 samples from >2000 donors, including >1000 exRNA profiles from healthy volunteers).

Human cellular microRNAome: a concept of McCall *et al.* [1], it consists of the systematic identification of miRNA expression in different cell subtypes to define tissue-specific miRNA.

MicroRNA: a small (~22 nucleotides), single-stranded, noncoding RNA molecule that induces mRNA silencing via base pairing with complementary sequences mainly located on the mRNA 3'-UTR, called MREs.

miRNA-responsive elements (MREs): nucleotide sequences that are considered a regulatory element on the mRNA. This sequence is recognized via base pairing to the miRNA associated with RISC machinery components.

RISC machinery: the RNA-induced silencing complex, or RISC, is a multiprotein complex (PACT, TRBP, Dicer, TNRC6A, and AGO proteins) that functions in gene silencing via a variety of pathways at the transcriptional and translational levels.

SNPs: germline substitutions of a single nucleotide at a specific position in the genome.

We advocate that genome editing technologies ([Box 1](#)) such as CRISPRa represent alternative strategies, providing more moderate and homogeneous changes (without disturbing the entire **RISC machinery** due to mimic overload) ([Table 1](#)). For loss-of-function analysis *in vivo* or *in vitro*, regular genome editing strategies [4] or CRISPRi could also be used. Of note, the phenotype of an miRNA deletion may not be obvious unless the conditions (e.g., tissue-specific,

Box 1. Genome editing technologies for miRNA research

Gain-of-function methods: CRISPRa is a variant of CRISPR in which a catalytically dead (d) Cas9 is fused with a transcriptional effector to activate downstream gene expression. This method is useful to increase expression of an miRNA having its own promoter or alternatively mRNA targeted by miRNA.

Loss-of-function methods: For genomic gene deletion, CRISPR/cas9, followed or not by recombination, helps to analyze the effect of an miRNA KO on the phenotype [13]. For transcriptional gene inhibition, as for CRISPRa, CRISPRi comprises a dead (d) Cas9 fused with a repressor to decrease downstream gene expression [14]. This method induces decreased expression of an miRNA having its own promoter, or alternatively mRNA targeted by miRNA, to determine the relationship between the miRNA targeting and the cellular phenotype.

Nucleotide editing methods: Instead of traditional Cas9, this method uses Cas9 nickase (single-strand breaks) fused to a reverse transcriptase [15]. This method can perform targeted small insertions, deletions, and base swapping in a precise way. This method could then be used for MRE-targeted modifications directly within the genome in the gene of interest in order to prove miRNA effects and to avoid luciferase-reporting technology bias.

stress, aging) are found, so these models need to be both wisely and widely challenged. These approaches may help in the analysis of effects on targets and phenotypic changes in a more physiologically relevant manner.

One target to rule them all?

A basic bioinformatic analysis will provide hundreds of predicted target genes for a given miRNA, based on the presence of **miRNA-responsive elements (MREs)** in the mRNA. A combination of transcriptomic

and/or biochemical pull-down approaches with miRNA target tools, combining prediction and validation, is helpful to define a list of potential targets. However, a central question in the field remains whether many target genes or rather one or a few essential target genes contribute to a given miRNA-controlled phenotype [5]. Unsupervised CRISPR-based screens using miRNA knockout (KO) models can be adapted to help in identifying functional target genes for which in-activation corrects miRNA-KO-associated phenotypes.

The validation of functional MREs in an identified target gene can also be problematic. Functional MREs are usually determined using methods such as luciferase assays in cells expressing the miRNA of interest. This methodology consists of cloning a partial or full-length reference (database-based) 3'-untranslated region (UTR) of the target gene downstream of an expression cassette encoding the luciferase coding sequence. However, the MRE sequences of target gene mRNAs can contain **SNPs**, mutations, or be shortened by recombination or proximal poly(A) termination, leading to loss of MREs [6]. Predicted MRE(s) may therefore be highly effective in the luciferase assay but may be absent from the target gene in a specific pathophysiological context.

To avoid this bias, we propose to check systematically the presence of the putative MRE(s) within the 3'-UTR of interest. In this context, the 'long-read' sequencing technologies are particularly adapted because they will identify the most common mRNA isoform expressed in the cell and thus define the number and location of MREs. Finally, an edition of MREs obtained by using genome editing technologies (Box 1) would offer the perfect approach to validate the MRE binding in unbiased conditions (Table 1). From a clinical point of view, such approaches will be instrumental in identifying critical miRNA interactions to design highly

Table 1. miRNA studies checklist

miRNA expression
Check in public databases for cell-type expression
Perform small RNA-seq or absolute RT-qPCR
Localization staining via single or multiplexed FISH
Expression model
Loss-of-function analyses: CRISPR/Cas9 or CRISPRi
Gain-of-function experiments: CRISPRa
Target validation
Unsupervised CRISPR-based screens
Long-read sequencing
Target modification: prime editing or CRISPR/cas9 recombination
Sponge/ceRNA validation
Stoichiometric analysis: absolute RT-qPCR
Colocalization of the ceRNA and miRNA: FISH
Biochemical evidence of interaction: RNA pull-down experiments
Target modification: prime editing or CRISPR/cas9 recombination
Competition with Target Site Blocker ASOs targeting the MRE(s) located on the ceRNA candidate
Circulating miRNAs
Larger cohort and well-defined group of patients
Replicates and multicenter studies
Standardized methods and normalization

Abbreviations: ASO, antisense oligonucleotide; ceRNA, competing endogenous RNA; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; MRE, microRNA-responsive element.

specific **antisense oligonucleotides (ASOs)** with therapeutic potential.

miRNAs and long noncoding RNAs (lncRNAs): the 'miR sponge' tsunami

Because individual miRNAs can potentially bind hundreds of transcripts, some RNAs carrying MREs may act as competing endogenous RNAs (ceRNAs), behaving as a 'sponge' for miRNAs [7]. Although this model may play a role in regulating miRNA activity at the global transcriptomic level, quantitative studies indicate that the abundance of intracellular target sites far exceeds that of the miRNAs. As a result, changes in a single ceRNA are typically too weak to influence miRNA-mediated repression [8]. Over the last decade, this 'sponging' paradigm has been used (and abused?) in articles describing the sponging of miRNAs by lncRNAs. These 'sponge-based regulations' are mainly predictions based on sequence homology alone, which does not adequately reflect the cellular environment in which lncRNA-miRNA pairs interact. In this context, simple experiments using overexpression of lncRNA constructs seem not to be adequate to fulfill the global cellular context. As previously emphasized [9], there is an urgent need to tighten the criteria required to consider a lncRNA-miRNA interaction as a true sponging mechanism. Thus, we propose the inclusion of (i) quantitative aspects regarding stoichiometry between the two RNAs, (ii) colocalization of the lncRNA and miRNA candidates in the same subcellular compartment, (iii) biochemical evidence of their interaction, and (iv) functional evidence using specific ASOs able to block the interaction (Target Site Blocker) or genome editing approaches (Box 1, Table 1). Altogether, the improvement of the multimodal description of the interaction between lncRNAs and miRNAs will bring a better value of the real implications of sponge RNA in controlling miRNA function.

miRNAs as circulating biomarkers: future medical use for daily practice or a scientific utopia?

Because miRNAs play a central role in diverse diseases, many studies have tested their potential as biomarkers. Circulating miRNAs are remarkably stable and may represent a noninvasive diagnostic and/or prognostic tool. However, despite numerous studies in the field, circulating miRNA-based tests have failed so far to meet the criteria required to achieve clinically approved standards [10,11]. The reasons are multiple and include a lack of disease-specific miRNAs and a lack of reproducibility in independent experiments. These biases may be due to the limited numbers of patients included in tests, the interindividual heterogeneity of the expression, and the lack of a standardized methodology, including clinical protocols. Progress in this field will require more extensive, well-controlled systematic validation studies with standardization of the methodology (extraction methods for total or exosome-associated miRNAs, normalization methods, and statistics) combined with artificial intelligence approaches and will need to involve multi-center consortia (Table 1). Initiatives such as the **Extracellular RNA Communication Consortium** [12] could provide a solid platform to rationalize this field. Altogether, the establishment of large consortia, as it was set up for genome-wide association studies, covering thousands of patients and multiple samples per patient may drastically improve the relevance of the use of miRNAs as biomarkers in daily clinical practice.

Concluding remarks

miRNA discovery has been associated with a profound change in the vision of the post-transcriptional regulation of gene expression. First-generation methodologies have been developed to characterize miRNA-target interaction. Although useful, these methods have progressively led to many 'easy-to-publish stories' with limited

to no pathophysiological relevance. Here, we propose to complement these methods with new technologies and approaches that will deliver more reliable interpretations of experimental data and will describe more adequately the functions of miRNAs.

Acknowledgments

Funding is acknowledged from the French government [Agence Nationale de Recherche (ANR)] through the 'Investments for the Future' LABEX SIGNALIFE (ANR-11-LABX-0028-01 and IDEX UCAJedi ANR-15-IDEX-01), ANR FibromiR no. ANR-18-CE92-0009-01; 'Association pour la Recherche contre le Cancer' (Canc'air GENExposomics and PJA-20191209562), Canceropole PACA; DREAL PACA, ARS PACA, Région Sud, Institut National du Cancer, INSERM Cancer; and Plan Cancer 2014-2019 (14APS001MCSR, 18CN045, and 20CR040-00).

Declaration of interests

The authors declare no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work over the previous three years and no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

Author contributions

All authors participated in writing the article and preparation of the table. All authors read and approved the final manuscript.

¹Université Côte d'Azur, Institute of Research on Cancer and Ageing of Nice (IRCAN), Centre Antoine Lacassagne, CNRS, INSERM, Nice, France

²FHU-OncoAge, Nice, France

³Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), INSERM, CNRS, 06560 Sophia Antipolis, France

⁴Université Côte d'Azur, CHU-Nice, Pasteur Hospital, Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, Hospital-Integrated Biobank (BB-0033-00025), Nice, France

⁵Université Côte d'Azur, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), CNRS, 06560 Sophia Antipolis, France

⁶These authors contributed equally to this work

*Correspondence:

bernard.mari@univ-cotedazur.fr (B. Mari) and patrick.brest@univ-cotedazur.fr (P. Brest).

<https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.08.006>

© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

References

- McCall, M.N. *et al.* (2017) Toward the human cellular microRNAome. *Genome Res.* 27, 1769–1781
- Cheng, L. *et al.* (2014) Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J. Extracell. Vesicles* 3, 23743

3. Barretina, J. *et al.* (2012) The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603–607
4. Bartel, D.P. (2018) Metazoan microRNAs. *Cell* 173, 20–51
5. Mocky, S. and Seitz, H. (2019) Inconsistencies and limitations of current microRNA target identification methods. *Methods Mol. Biol.* 1970, 291–314
6. Mayr, C. and Bartel, D.P. (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138, 673–684
7. Salmena, L. *et al.* (2011) A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* 146, 353–358
8. Denzler, R. *et al.* (2014) Assessing the ceRNA hypothesis with quantitative measurements of miRNA and target abundance. *Mol. Cell* 54, 766–776
9. Marshall, E.A. *et al.* (2019) Beyond sequence homology: cellular biology limits the potential of XIST to act as a miRNA sponge. *PLoS One* 14, e0221371
10. Jarry, J. *et al.* (2014) The validity of circulating microRNAs in oncology: five years of challenges and contradictions. *Mol. Oncol.* 8, 819–829
11. Jenike, A.E. and Halushka, M.K. (2021) miR-21: a non-specific biomarker of all maladies. *Biomark. Res.* 9, 18
12. Das, S. *et al.* (2019) The Extracellular RNA Communication Consortium: establishing foundational knowledge and technologies for extracellular RNA research. *Cell* 177, 231–242
13. Yang, B. and McJunkin, K. (2020) CRISPR screening strategies for microRNA target identification. *FEBS J.* 287, 2914–2922
14. Qi, L.S. *et al.* (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell* 152, 1173–1183
15. Anzalone, A.V. *et al.* (2019) Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157

GC content shapes mRNA storage and decay in human cells

Maïté Courel¹, Yves Clément², Clémentine Bossevain¹, Dominika Foretek³, Olivia Vidal Cruchez⁴, Zhou Yi⁵, Marianne Bénard¹, Marie-Noëlle Benassy¹, Michel Kress¹, Caroline Vindry⁶, Michèle Ernoult-Lange¹, Christophe Antoniewski⁷, Antonin Morillon³, Patrick Brest⁴, Arnaud Hubstenberger⁵, Hugues Roest Crollius², Nancy Standart⁶, Dominique Weil^{1*}

¹Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), Laboratoire de Biologie du Développement, Paris, France; ²Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, Paris, France; ³ncRNA, Epigenetic and Genome Fluidity, Institut Curie, PSL Research University, CNRS UMR 3244, Sorbonne Université, Paris, France; ⁴Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, IRCAN, FHU-OncoAge, Nice, France; ⁵Université Côte d'Azur, CNRS, INSERM, iBV, Nice, France; ⁶Department of Biochemistry, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; ⁷Sorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), ARTbio Bioinformatics Analysis Facility, Paris, France

Abstract mRNA translation and decay appear often intimately linked although the rules of this interplay are poorly understood. In this study, we combined our recent P-body transcriptome with transcriptomes obtained following silencing of broadly acting mRNA decay and repression factors, and with available CLIP and related data. This revealed the central role of GC content in mRNA fate, in terms of P-body localization, mRNA translation and mRNA stability: P-bodies contain mostly AU-rich mRNAs, which have a particular codon usage associated with a low protein yield; AU-rich and GC-rich transcripts tend to follow distinct decay pathways; and the targets of sequence-specific RBPs and miRNAs are also biased in terms of GC content. Altogether, these results suggest an integrated view of post-transcriptional control in human cells where most translation regulation is dedicated to inefficiently translated AU-rich mRNAs, whereas control at the level of 5' decay applies to optimally translated GC-rich mRNAs.

*For correspondence:
dominique.weil@upmc.fr

Competing interests: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 26

Received: 26 June 2019

Accepted: 18 December 2019

Published: 19 December 2019

Reviewing editor: Karsten Weis, ETH Zurich, Switzerland

© Copyright Courel et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

Introduction

Translation, storage, localization and decay of mRNAs in the cytoplasm are closely coupled processes, which are governed by a large number of RNA-binding proteins (RBPs) (*Hentze et al., 2018*). These RBPs have to act in a coordinated manner to give rise to a proteome both coherent with cellular physiology and responsive to new cellular needs. mRNA fate is also intimately linked with their localization in membrane-less organelles, such as P-bodies (PBs). We recently identified the transcriptome and proteome of PBs purified from human cells. Their analysis showed that human PBs are broadly involved in mRNA storage rather than decay (*Hubstenberger et al., 2017; Standart and Weil, 2018*), as also observed using fluorescent decay reporters (*Horvathova et al., 2017*). However, the mechanism underlying the large but specific targeting of mRNAs to PBs is still unknown, though it clearly results in the co-recruitment of particular RBPs (*Hubstenberger et al., 2017*).

In mammalian cells, the RNA helicase DDX6, known for its involvement in mRNA decay and translation repression, is a key factor in PB assembly (Minshall et al., 2009). Patients with neurodevelopmental delay caused by heterozygous DDX6 missense mutations were recently identified, and their skin fibroblasts show a PB defect (Balak et al., 2019). Human DDX6 interacts with both translational repressors, and the decapping enzyme DCP1/2 and its activators (Ayache et al., 2015; Bish et al., 2015). Its yeast homologue Dhh1 is a cofactor of DCP2, as well as a translational repressor (Coller and Parker, 2005). The RBP PAT1B has also been defined as an enhancer of decapping, as it interacts with DDX6, the LSM1-7 heptamer ring and the decapping complex in mammalian cells (Vindry et al., 2017), while in yeast Pat1p activates Dcp2 directly (Nissan et al., 2010) and its deletion results in deadenylated but capped intact mRNA (Bonnerot et al., 2000; Bouveret et al., 2000). DDX6 and PAT1B interact with the CCR4-NOT deadenylase complex and the DDX6-CNOT1 interaction is required for miRNA silencing (Vindry et al., 2017; Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014; Ozgur et al., 2015). DDX6 also binds the RBP 4E-T, another key factor in PB assembly, which in turn interacts with the cap-binding factor eIF4E and inhibits translation initiation, including that of miRNA target mRNAs (Kamenska et al., 2016). Altogether, DDX6 and PAT1B have been proposed to link deadenylation/translational repression with decapping. Finally, the 5'–3' exonuclease XRN1 decays RNAs following decapping by DCP1/2, a step triggered by deadenylation mediated by PAN2/3 and CCR4-NOT or by exosome activity (Labno et al., 2016).

A number of RBPs also control mRNA fate in a sequence-specific manner, some of them localizing in PBs as well. For instance, the CPEB complex, best described in *Xenopus* oocytes (Minshall et al., 2007), binds the CPE motif in the 3' untranslated region (UTR) of maternal transcripts through CPEB1, thus controlling their storage and their translational activation upon hormone stimulation (Standart and Minshall, 2008). Additional examples include the proteins which bind 3'UTR AU-rich elements (ARE), such as HuR and TTP, to control translation and decay, and play key roles in inflammation, apoptosis and cancer (Wells et al., 2017). Protein-binding motifs are generally not unique and rather defined as consensus sequence elements. In the case of RISC, binding specificity is given by a guide miRNA, which also hybridizes with some flexibility with complementary mRNA sequences. A variety of techniques have therefore been developed to identify the effective RNA targets of such factors, ranging from affinity purification (such as RIP or CLIP) to transcriptome and polysome profiling after RBP silencing, providing the groundwork to address systematic questions about post-transcriptional regulation.

In this study, we searched for broad determinants of mRNA storage and decay in unstressed human cell lines, using our transcriptome of purified PBs and several transcriptomic analyses performed after silencing of general translation and decay regulatory factors, including DDX6, PAT1B and XRN1. We also used datasets available from the literature, including a transcriptomic analysis after DDX6 silencing, a DDX6-CLIP experiment and various lists of RBP and miRNA targets. Their combined analysis revealed the central role of mRNA GC content which, by impacting codon usage, PB targeting and RBP binding, influences mRNA fate and contributes to the coordination between two opposite processes: decay and storage. Reporter mRNAs varying in their GC content confirmed that AU-rich mRNAs have a lower protein yield than GC-rich ones, that they preferentially localize to PBs, and that they have an enhanced capacity to form RNP granules in vitro.

Results

PBs mostly accumulate AU-rich mRNAs

We have previously shown that PBs store one third of the coding transcriptome in human epithelial HEK293 cells (Hubstenberger et al., 2017). Such a large transcript number led us to search for general distinctive sequence features that could be involved in PB targeting. We first analyzed transcript length, as it was reported to be key for mRNA accumulation in stress granules (Khong et al., 2017). When mRNAs were subdivided into six classes ranging from <1.5 kb to >10 kb, longer mRNAs appeared more enriched in PBs than shorter ones, with a moderate correlation between length and PB enrichment (Spearman $r (r_s) = 0.39$, $p < 0.0001$) (Figure 1A, Figure 1—figure supplement 1A,B). However, their increased length in PBs was less striking than previously observed for stress granule mRNAs (Khong et al., 2017) (Figure 1—figure supplement 1C).

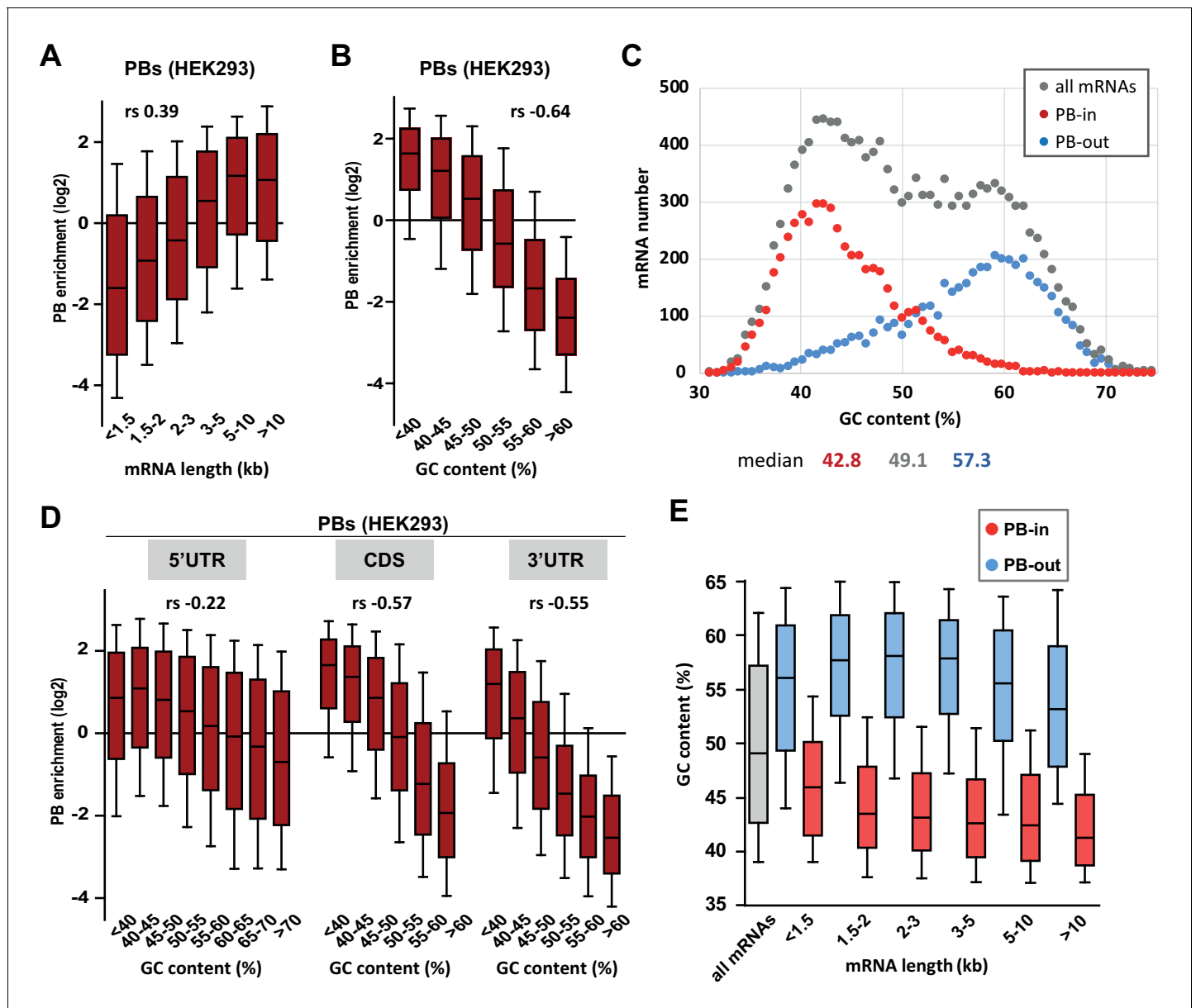


Figure 1. PB mRNAs are AU-rich and longer than average. (A) Long mRNAs are particularly enriched in PBs. Transcripts were subdivided into six classes depending on their length (from <1.5 kb to >10 kb). The boxplots represent the distribution of their respective enrichment in PBs. The boxes represent the 25–75 percentiles and the whiskers the 10–90 percentiles. rs, Spearman correlation coefficient. (B) AU-rich mRNAs are particularly enriched in PBs. Transcripts were subdivided into six classes depending on their GC content (from <40 to >60%) and analyzed as in (A). (C) PBs mostly contain the AU-rich fraction of the transcriptome. The human transcriptome was binned depending on its GC content (0.7% GC increments). The graph represents the number of PB-enriched (PB-in, $p < 0.05$, $n = 5200$) and PB-excluded (PB-out, $p < 0.05$, $n = 4669$) transcripts in each bin. The distribution of all transcripts is shown for comparison ($n = 14443$). The median GC value is indicated below for each group. (D) mRNA localization in PBs mostly depends on the GC content of their CDS and 3'UTR. The analysis was repeated as in (B) using the GC content of the 5'UTR, CDS or 3'UTR, as indicated. For 5'UTRs, the >60% class was subdivided into three classes to take into account their higher GC content compared to CDSs and 3'UTRs. -0.57 and -0.55 are not significantly different ($p = 0.17$), while -0.22 and -0.55 are ($p < 0.0001$) (E) GC content is lower in PB-enriched (PB-in, $p < 0.05$) and PB-excluded (PB-out, $p < 0.05$) mRNAs was analyzed as in (B).

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 1:

Figure supplement 1. PB-enriched mRNAs tend to be long and AU-rich.

Most remarkably, mRNA accumulation in PBs was dependent on their global nucleotide composition, with a strong correlation between GC content and PB localization ($r_s = -0.64$, $p < 0.0001$). When transcripts were subdivided into six classes ranging from <40% to >60% GC, PB enrichment was predominant for those <45% GC (**Figure 1B**, **Figure 1—figure supplement 1D,E**). While reminiscent of the low GC content reported for stress granule mRNAs in HEK293 cells (*Khong et al., 2017*), our reanalysis of the published dataset indicated that stress granule localization correlated weakly with the gene GC content ($r_s = -0.12$, $p < 0.0001$) and almost not at all with the mRNA GC content ($r_s = -0.06$, $p < 0.0001$). Indeed, comparing the GC content distribution of the transcripts that are enriched or excluded from PBs with all HEK293 cell transcripts, revealed that mRNA storage in PBs is confined to the AU-rich fraction of the transcriptome (**Figure 1C**).

As these transcripts also correspond to AU-rich genes (**Figure 1—figure supplement 1F**), it raised the possibility that the impact of GC content on PB enrichment resulted indirectly from the genomic context of the genes. To address this issue, we looked at the link between PB enrichment and meiotic recombination, which can influence GC content through GC-biased gene conversion (*Duret and Galtier, 2009*). The correlation between PB enrichment and meiotic recombination was much weaker than between PB enrichment and mRNA GC content ($r_s = -0.16$ vs -0.64 , $p < 0.0001$ for both, significantly different from each other, $p < 0.0001$). Moreover, the latter was almost unchanged when controlling for meiotic recombination ($r_s = -0.65$ vs -0.64 , $p < 0.0001$). Finally, it was still significant when controlling for intronic or flanking GC content ($r_s = -0.33$ and -0.45 respectively, all $p < 0.0001$), showing that mRNA base composition and PB enrichment are associated independently of meiotic recombination or the genomic context. We also computed partial correlations to verify that the correlation between PB enrichment and GC content was not secondary to the correlation that exists between GC content and expression level, or between GC content and gene conservation (**Figure 1—figure supplement 1G**).

To refine the link between mRNA accumulation in PBs and their GC content, we analyzed separately the influence of their CDS and UTRs. Interestingly, mRNA accumulation in PBs correlated strongly with the GC content of both their CDS and 3'UTR ($r_s = -0.57$ and -0.55 , respectively, $p < 0.0001$ for both), and weakly with the one of their 5'UTR ($r_s = -0.22$, $p < 0.0001$) (**Figure 1D**, **Figure 1—figure supplement 1E**). Moreover, the lower GC content of PB-enriched mRNAs compared to PB-excluded ones was a feature independent of their length, since it was observed in all length ranges (**Figure 1E**, **Figure 1—figure supplement 1B**). Conversely, the longer length of PB mRNAs was a feature independent of their GC content (**Figure 1—figure supplement 1E,H**).

In conclusion, while PB mRNAs tend to be longer than average, their most striking feature is that they correspond to an AU-rich subset of the transcriptome.

GC bias in PBs impacts codon usage and protein yield

The strong GC bias in the CDS of PB mRNAs prompted us to compare the coding properties of PB-stored and PB-excluded mRNAs. Consistently, we found that the frequency of amino acids encoded by GC-rich codons (Ala, Gly, Pro) was lower in PB-stored than in PB-excluded mRNAs, while the frequency of those encoded by AU-rich codons (Lys, Asn) was higher (**Figure 2A**). The difference could be striking, as illustrated by Lys, whose median frequency in PB-excluded mRNAs was 32% lower than in PB-enriched mRNAs, thus ranging within the lower 17th centile of their distribution (**Figure 2—figure supplement 1A**). In addition to different amino acid usage, we observed dramatic variation in codon usage between the two mRNA subsets. For all amino acids encoded by synonymous codons, the relative codon usage in PBs versus out of PBs was systematically biased towards AU-rich codons (\log_2 of the ratio > 0 , **Figure 2B**). For example, among the six Leu codons, AAU was used 4-fold more frequently in PB-enriched than in PB-excluded mRNAs, whereas CUG was used 2-fold less frequently. This systematic trend also applied to Stop codons. Some additional codon bias independent of base composition (NNA/U or NNG/C) was also observed for 4 and 6-fold degenerated codons (**Figure 2—figure supplement 1B,C**). For instance, Leu was encoded twice more often by CUU than CUA in PB-enriched mRNAs, whereas the use of both codons was low in PB-excluded mRNAs. Similarly, Gly was encoded more often by GGG than GGC in PB mRNAs, whereas the use of both codons was similar in PB-excluded mRNAs (**Figure 2C**).

In human, 22 out of the 29 synonymous codons that are less frequently used (normalized relative usage < 1) end with an A or U, and were therefore overrepresented in PB mRNAs (**Figure 2—figure supplement 1D**). Considering for each amino acid the codon with the lowest usage (called low

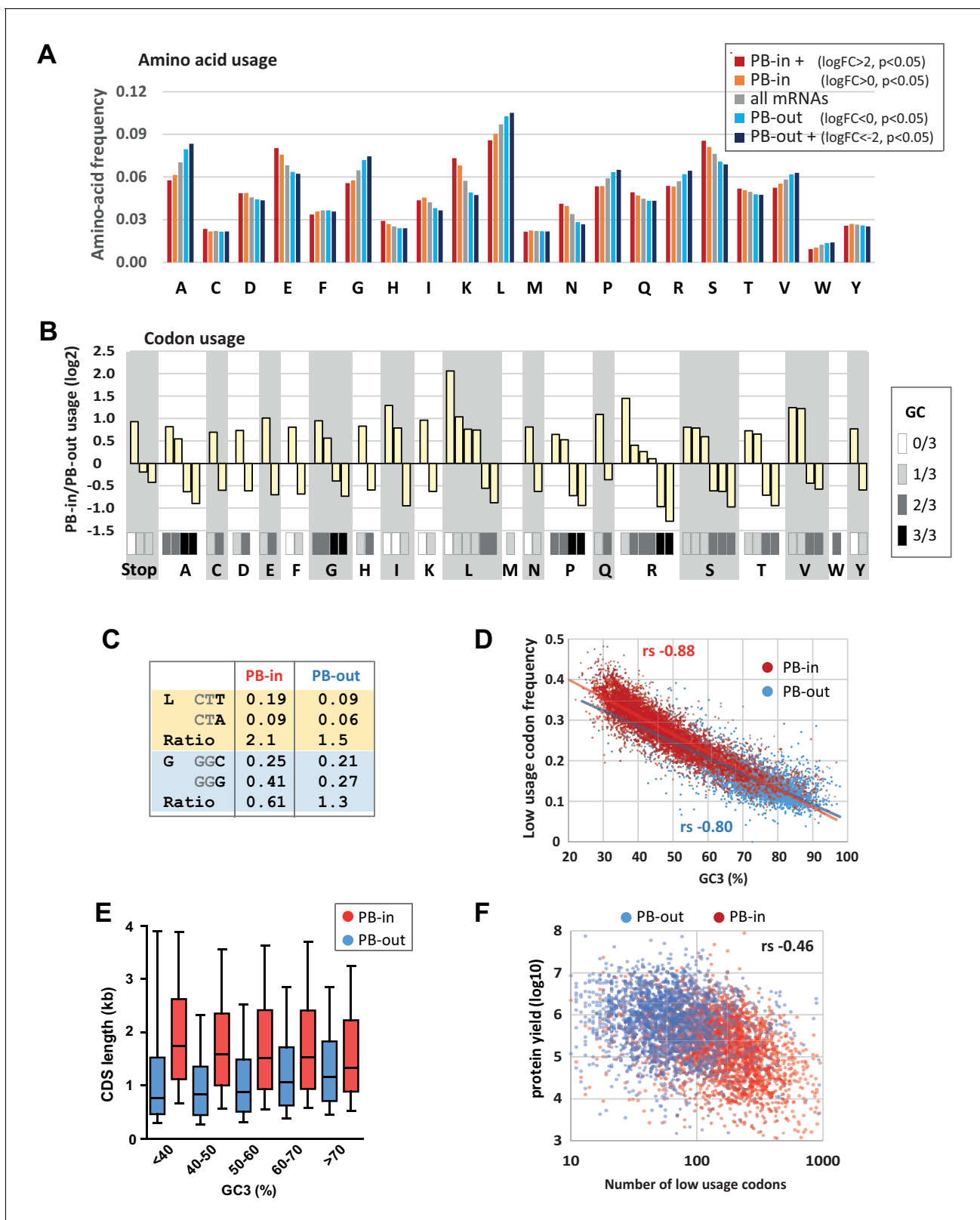


Figure 2. Codon usage is strongly biased in PBs. (A) PB mRNAs and PB-excluded mRNAs encode proteins with different amino acid usage. The graph represents the frequency of each amino acid in the proteins encoded by mRNAs enriched or excluded from PBs, using the indicated PB enrichment thresholds. (B) Codon usage bias in and out of PBs follows their GC content. The relative codon usage for each amino acid was calculated in PB-enriched (PB-in) and PB-excluded (PB-out) mRNAs, using a PB enrichment threshold of +/- 1 (in log2). The graph represents the log2 of their ratio (PB-in/PB-out). (C) Relative codon usage for leucine (L) and glycine (G) in PB-in and PB-out mRNAs. (D) Correlation between low usage codon frequency and GC3 content for PB-in (red) and PB-out (blue) mRNAs. (E) Correlation between CDS length and GC3 content for PB-in (red) and PB-out (blue) mRNAs. (F) Correlation between protein yield and the number of low usage codons for PB-in (red) and PB-out (blue) mRNAs. *Figure 2 continued on next page*

Figure 2 continued

in/PB-out) and was ranked by decreasing values for each amino acid. The GC content of each codon is gray-coded below, using the scale indicated on the right. (C) The usage of some codons is biased independently of their GC content. Two examples are shown encoding Leucine (L) and Glycine (G). (D) The frequency of low usage codons strongly correlates with the GC content of the CDS, independently of their PB localization. The frequency of low usage codons was calculated for mRNAs excluded (PB-out) and enriched (PB-in) in PBs using a PB enrichment threshold of ± 1 (in log₂). It was expressed as a function of the CDS GC content at position 3 (GC3). Note that the slopes of the tendency curves are similar for PB-enriched and PB-excluded transcripts. The difference between the Spearman correlation coefficients (r_s) are nevertheless statistically significant ($p < 0.0001$). (E) PB mRNAs have longer CDS than PB-excluded mRNAs. The analysis was performed as in **Figure 1E**. (F) The number of low usage codons per CDS is a good determinant of both protein yield and PB localization. The protein yield was expressed as a function of the number of low usage codons for PB-enriched (PB-in) and PB-excluded (PB-out) mRNAs. r_s , Spearman correlation coefficient. The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 2:

Figure supplement 1. Amino acid usage and codon usage biases in PBs.

Figure supplement 2. Codon usage biases and abundance of amino-acylated tRNA.

usage codon thereafter), 14 out of 18 are NNA or NNU, with the exception of Thr, Ser, Pro, Ala. We calculated the frequency of low usage codons for each CDS, and plotted it as a function of the GC content at the third position (GC3) to avoid any confounding effects of the amino acid bias. As expected, the frequency of low usage codons correlated strongly and negatively with GC3, with AU-rich CDS having a higher frequency of low usage codons than GC-rich CDS (**Figure 2D**). According to their distinct GC content, PB mRNAs had a higher frequency of low usage codons than PB-excluded mRNAs. However, the correlation coefficient between frequency of low usage codons and GC3 was very close for both mRNA subsets ($r_s = -0.88$ for PB-enriched; -0.80 for PB-excluded mRNAs, $p < 0.0001$ for both), meaning that their different frequency of low usage codons could be largely explained by their GC bias alone.

We previously reported that protein yield, defined as the ratio between protein and mRNA abundance in HEK293 cells, was 20-times lower for PB-enriched than PB-excluded mRNAs. This was not due to translational repression within PBs, as the proportion of a given mRNA in PBs hardly exceeded 15%, but rather to some intrinsic mRNA property (**Hubstenberger et al., 2017**). In this respect, the frequency of low usage codons correlated more with PB localization ($r_s = 0.59$, $p < 0.0001$) than with protein yield ($r_s = -0.21$, $p < 0.0001$, significantly different from 0.59, $p < 0.0001$) (**Figure 2—figure supplement 1E**). Conversely, the CDS length correlated more with protein yield ($r_s = -0.43$, $p < 0.0001$) than with PB localization ($r_s = 0.26$, $p < 0.0001$, significantly different from -0.43 , $p < 0.0001$). Nevertheless, the length of the CDS and its GC content contributed independently to PB localization (**Figure 2E**). Finally, combining the frequency of low usage codons with the CDS length, that is, considering the absolute number of low usage codons per CDS, was a shared parameter of both protein yield ($r_s = -0.46$, $p < 0.0001$, **Figure 2F**) and PB localization ($r_s = 0.49$, $p < 0.0001$). Strikingly, CDS with more than 100 low usage codons were particularly enriched in PBs, while those under 100 were mostly excluded (**Figure 2F**). One of the mechanisms linking codon usage to translation yield could be the abundance of cognate tRNAs (**Novoa and Ribas de Paula, 2012**). However, codon usage in PB-excluded mRNAs was not more adapted to the abundance of amino-acylated tRNAs (**Evans et al., 2017**) than codon usage in PB-enriched mRNAs (**Figure 2—figure supplement 2**). In conclusion, the strong GC bias in PB mRNAs results in both a biased amino acid usage in encoded proteins and a biased codon usage. Furthermore, the high number of low usage codons in PB mRNAs is a likely determinant of their low protein yield.

The PB assembly factor DDX6 has opposite effects on mRNA stability and translation rate depending on their GC content

In human, the DDX6 RNA helicase is key for PB assembly (**Minshall et al., 2009**). It associates with a variety of proteins involved in mRNA translation repression and decapping (**Ayache et al., 2015**; **Bish et al., 2015**), suggesting that it plays a role in both processes. To investigate how DDX6 activity is affected by mRNA GC content, we conducted a polysome profiling experiment in HEK293 cells transfected with DDX6 or control β -globin siRNAs for 48 hr. In these conditions, DDX6 expression decreased by 90% compared to control cells (**Figure 3—figure supplement 1A**). The polysome profile was largely unaffected by DDX6 silencing, implying that DDX6 depletion did not grossly disturb global translation (**Figure 3—figure supplement 1B**). Polysomal RNA isolated from the sucrose

gradient fractions (**Figure 3—figure supplement 1B**) and total RNA were used to generate libraries using random hexamers to allow for poly(A) tail-independent amplification. As expected, both total and polysomal DDX6 mRNA was markedly decreased (by 72%) following DDX6 silencing (**Figure 3—figure supplement 1C–E; Supplementary file 1, sheet1**). Since DDX6 is cytoplasmic (**Ernault-Lange et al., 2009**) and has a role in mRNA decay, we assumed that changes in total mRNA accumulation generally reflected an increased stability of the transcripts, though we cannot exclude altered transcription levels for some of them. As polysomal accumulation can result from both regulated translation and a change in total RNA without altered translation, we then used the polysomal to total mRNA ratio as a proxy measurement of translation rate. Nevertheless, for few transcripts, polysomal enrichment may reflect an elongation block rather than an increased rate of initiation. Analysis of the whole transcriptome showed a link between mRNA fate following DDX6 depletion and their GC content, but, intriguingly, the correlation was positive for changes in total RNA ($r_s = 0.45$, $p < 0.0001$; **Figure 3—figure supplement 1F**) and negative for changes in polysomal RNA ($r_s = -0.32$, $p < 0.0001$; **Figure 3—figure supplement 1G**). Therefore, DDX6 depletion affected different mRNA subsets in total and polysomal RNA.

The extent of mRNA stabilization steadily increased with the GC content and became predominant for transcripts with >50% GC (**Figure 3A, left panel, Figure 3—figure supplement 2A**). This analysis was repeated on an independent dataset available from the ENCODE project (**ENCODE Project Consortium, 2012**), obtained in a human erythroid cell line, K562, following induction of a stably transfected DDX6 shRNA, and using an oligo(dT)-primed library. Despite the differences in cell type, depletion procedure and sequencing methods, again, mRNA stabilization preferentially concerned those with high GC content ($r_s = 0.59$, $p < 0.0001$; **Figure 3A, right panel, Figure 3—figure supplement 2A; Supplementary file 1, sheet2**). In contrast, following DDX6 silencing in HEK293 cells, the translation rate predominantly increased for transcripts with less than 45% GC ($r_s = -0.53$, $p < 0.0001$; **Figure 3B, Figure 3—figure supplement 2A**). As a result, mRNAs with the most upregulated translation rate were the least stabilized, and conversely (**Figure 3—figure supplement 2B**).

To investigate how DDX6 activity was related to its binding to RNA, we used the CLIP dataset of K562 cells, also available from the ENCODE project. In both HEK293 and K562 cells, the mRNAs clipped to DDX6 were particularly stabilized after DDX6 knockdown, as compared to all mRNAs

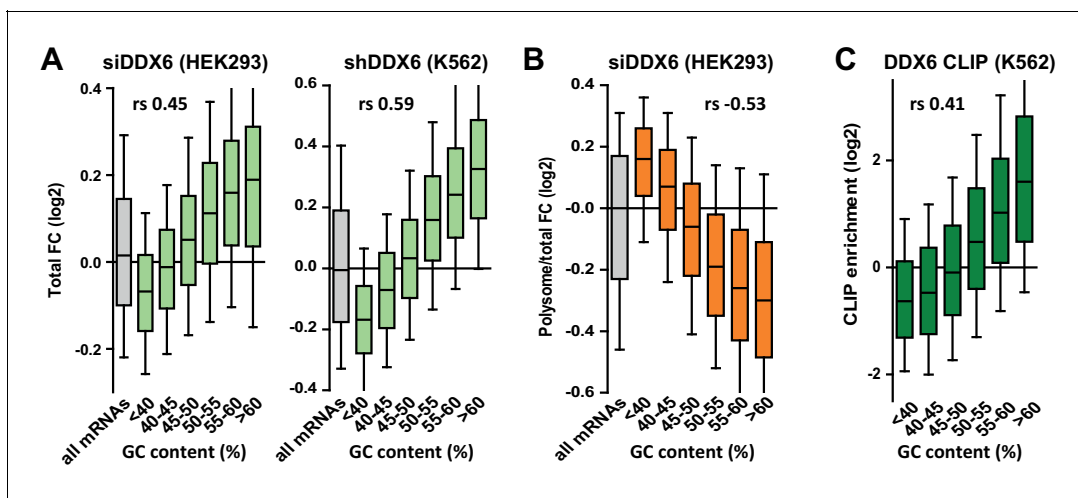


Figure 3. DDX6 silencing has opposite effects on mRNA fate depending on their GC content. (A) mRNA stabilization after DDX6 silencing in HEK293 and K562 cells applies to GC-rich mRNAs. The fold-changes (FC) in mRNA accumulation were analyzed as in **Figure 1B**. (B) mRNA translation derepression after DDX6 silencing in HEK293 cells applies to AU-rich mRNAs. The fold-changes in translation rate (polysomal/total mRNA ratio) were analyzed as in (A). (C) GC-rich mRNAs are particularly enriched in the DDX6 CLIP experiment.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 3:

Figure supplement 1. Polysome profiling following DDX6 silencing.

Figure supplement 2. Impact of DDX6 binding and mRNA length on DDX6 dependency.

Figure supplement 3. Impact of the GC content on DDX6-dependency.

(Figure 3—figure supplement 2C; Supplementary file 1, sheet3), while they were not translationally derepressed in HEK293 cells (Figure 3—figure supplement 2D). In agreement, mRNAs with a high GC content were preferentially enriched in the DDX6 CLIP experiment ($r_s = 0.41$, $p < 0.0001$; Figure 3C, Figure 3—figure supplement 2A). Then, as we previously showed that DDX6 can oligomerize along repressed transcripts (Ernoul-Lange et al., 2012), we also considered mRNA length. While DDX6-dependent decay had a marginal preference for short transcripts ($r_s = -0.09$, $p < 0.0001$), as a combined effect of CDS and 3'UTR length (Figure 3—figure supplement 2E,F), DDX6-dependent translation repression was independent of the CDS length but higher on mRNAs with long 3'UTRs ($r_s = 0.16$, $p < 0.0001$; Figure 3—figure supplement 2E,G). Interestingly, the GC content of the CDS and the 3'UTR were similarly predictive of DDX6 sensitivity, whether for mRNA stability ($r_s = 0.42$ and 0.40 for CDS and 3'UTR, respectively, $p < 0.0001$ for both) or for translation repression ($r_s = -0.53$ and -0.52 , respectively, $p < 0.0001$ for both), while the 5'UTR was less significant ($r_s = 0.18$ and -0.15 for stability and translation repression, respectively, $p < 0.0001$ for both; Figure 3—figure supplement 3A–C).

Altogether, we showed that DDX6 knockdown affected differentially the mRNAs depending on the GC content of both their CDS and 3'UTR, with the most GC-rich mRNAs being preferentially regulated at the level of stability and the most AU-rich mRNAs at the level of translation.

DDX6/XRN1 and PAT1B decrease the stability of separate sub-classes of mRNAs with distinct GC content

DDX6 acts as an enhancer of decapping to stimulate mRNA decay, upstream of RNA degradation by the XRN1 5'–3' exonuclease. To investigate whether XRN1 targets are similarly GC-rich, we performed XRN1 silencing experiments in two cell lines. HeLa cells were transfected with XRN1 siRNA (Figure 4—figure supplement 1A; Supplementary file 1, sheet4), while HCT116 cells stably transfected with an inducible XRN1 shRNA were induced with doxycyclin (Figure 4—figure supplement 1B; Supplementary file 1, sheet5), both for 48 hr. In both cell lines, XRN1-dependent decay preferentially acted on mRNAs which were GC-rich ($r_s = 0.41$ for HeLa and 0.49 for HCT116, $p < 0.0001$ for both; Figure 4A, Figure 4—figure supplement 1A) and localized out of PBs ($r_s = -0.35$, $p < 0.0001$; Figure 4—figure supplement 1C), as observed for DDX6.

PAT1B is a well-characterized direct DDX6 partner known for its involvement in mRNA decay (Vindry et al., 2017; Braun et al., 2010; Ozgur et al., 2010; Vindry et al., 2019). As for DDX6, we assume that changes in steady-state mRNAs following PAT1B silencing generally reflect their increased stability (though, again, we cannot exclude some changes at the transcription level). However, using our previous PAT1B silencing experiment in HEK293 cells (Vindry et al., 2017), we surprisingly found a negative correlation between mRNA stabilization after PAT1B and after DDX6 silencing ($r_s = -0.31$, $p < 0.0001$; Figure 4—figure supplement 1D; Supplementary file 1, sheet6), suggesting that they largely target separate sets of mRNAs. Unexpectedly, the correlation was however positive with translational derepression after DDX6 silencing ($r_s = 0.45$, $p < 0.0001$; Figure 4—figure supplement 1E), indicating that PAT1B preferentially targets mRNAs that are translationally repressed by DDX6. Accordingly, these transcripts are prone to PB storage ($r_s = 0.49$, $p < 0.0001$; Figure 4—figure supplement 1F), as reported previously (Vindry et al., 2017). Indeed, in contrast to DDX6 and XRN1 decay targets, PAT1B targets tended to be AU-rich ($r_s = -0.50$, $p < 0.0001$; Figure 4B, Figure 4—figure supplement 1A). To gain insight into the mechanism of regulation by PAT1B, we analyzed the read coverage in the PAT1B silencing experiment (Figure 4C) and found it to be unchanged over the whole transcriptome. In contrast, following XRN1 silencing, the 5' coverage was higher, confirming that such an analysis can reveal 5' decay (Figure 4D). Of note, in control cells PAT1B target mRNAs had a higher 5' coverage than average (Figure 4C), while XRN1 targets had a lower 5' coverage than average (Figure 4D). These results suggest that mRNA accumulation in the absence of PAT1B does not result from their 5' end protection.

In conclusion, DDX6 and PAT1B decrease the stability of distinct mRNA subsets, which strongly differ in their GC content. The results suggest that DDX6 is a cofactor of XRN1 5'–3' exonuclease, whereas PAT1B affects 3' to 5' degradation.

To obtain a global visualization of the results we conducted a clustering analysis of the various datasets (Figure 4E). Note that to avoid clustering interdependent datasets, we included the changes in polysomal RNA after DDX6 silencing rather than in the polysomal/total RNA ratio. Altogether, the heatmap shows that GC-rich mRNAs are excluded from PBs and tend to be decayed by

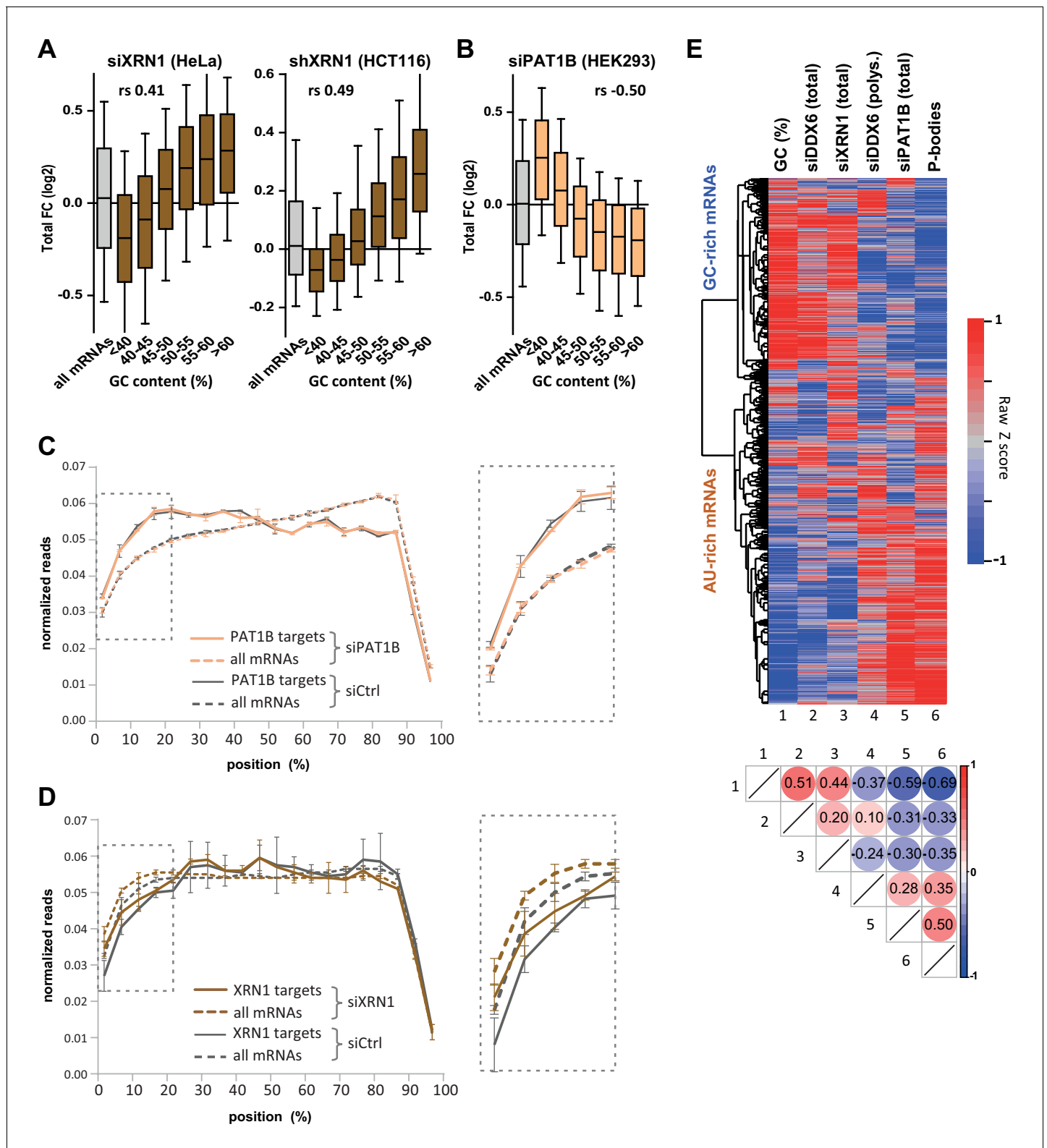


Figure 4. XRN1 and PAT1B targets have distinct GC content. (A) mRNA stabilization after XRN1 silencing in HeLa and HCT116 cells applies to GC-rich mRNAs. The analysis was performed as in **Figure 1B**. The GC content distribution for all mRNAs is presented for comparison (in gray). (B) mRNA stabilization after PAT1B silencing in HEK293 cells applies to AU-rich mRNAs. The analysis was performed as in (A). (C) Read coverage of PAT1B targets (FC > 0.7, n = 330, solid lines) and all mRNAs (n = 16000, dashed lines) in the siPAT1B dataset. The read coverage was analyzed in each duplicate experiment and normalized as described in Materials and methods. The average value in control cells (gray lines) and after PAT1B silencing (peach lines) is shown. (D) Read coverage of XRN1 targets (FC > 0.7, n = 330, solid lines) and all mRNAs (n = 16000, dashed lines) in the siXRN1 dataset. The read coverage was analyzed in each duplicate experiment and normalized as described in Materials and methods. The average value in control cells (gray lines) and after XRN1 silencing (peach lines) is shown. (E) Heatmap of Raw Z score for GC-rich mRNAs (top) and AU-rich mRNAs (bottom) across six conditions: GC (%), siDDX6 (total), siXRN1 (total), siDDX6 (polys.), siPAT1B (total), and P-bodies. The correlation matrix below the heatmap shows the pairwise correlations between these conditions.

Figure 4 continued on next page

Figure 4 continued

lines) was plotted, with the bars representing the duplicate values. An expanded view of the dashed box is presented on the right panel. (D) Read coverage of XRN1 targets (FC >0.8, n = 199, solid lines) and all mRNAs (n = 13760, dashed lines) in the siXRN1 dataset. The data were analyzed as in (C). (E) Clustering analysis of mRNAs depending on their GC content, their differential expression after silencing DDX6, XRN1 or PAT1B, and their enrichment in PBs. Raw GC content and log₂ transformed ratio of the other datasets were used for the clustering of both transcripts (lines) and datasets (columns). The values were color-coded as indicated on the right scale, and the Spearman correlation matrix is presented below (all p < 10⁻⁴⁸). The heatmap highlights the distinct fate of GC-rich and AU-rich mRNAs.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 4:

Figure supplement 1. Transcriptome analysis following XRN1 and PAT1B silencing.

a mechanism involving DDX6 and XRN1, while AU-rich mRNAs are recruited in PBs, they undergo DDX6-dependent translation repression and their stability depends on PAT1B.

Specific mRNA decay factors and translation regulators target mRNAs with distinct GC content

Having shown that GC content is a distinctive feature of DDX6 and XRN1 versus PAT1B targets, we investigated the link between this global sequence determinant and a variety of sequence-specific post-transcriptional regulators for which relevant genome-wide datasets are available (**Figure 5—figure supplement 1A**).

On the mRNA decay side (group I lists), we considered the Nonsense Mediated Decay (NMD) pathway, taking as targets the mRNAs cleaved by SMG6 (**Schmidt et al., 2015**), and the m⁶A-associated decay pathways, using the targets of the YTHDF2 reader defined by CLIP (**Wang et al., 2014; Yang et al., 2015**). We also analyzed mRNAs with a 5'UTR-located G4 motif, which have been shown to be preferential substrates of murine XRN1 in vitro (**Bashkirov et al., 1997**). On the translation regulation side (group II lists), we analyzed the TOP mRNAs, whose translation is controlled by a TOP motif at the 5' extremity (**Thoreen et al., 2012**), and targets of various PB proteins and/or DDX6 partners (**Hubstenberger et al., 2017; Ayache et al., 2015**): FXR1-2, FMR1, PUM1-2, IGF2BP1-3, the helicase MOV10, ATXN2, 4E-T, ARE-containing mRNAs and the targets of the two ARE-binding proteins HuR and TTP. We also included mRNAs with a CPE motif, since DDX6 is a component of the CPEB complex that binds CPEs (**Minshall et al., 2007**). Of note, among the group II factors, some are known to also affect mRNA half-life, as exemplified by the ARE-binding proteins (**Wells et al., 2017**). G4, ARE and CPE motifs have been defined in silico, while the targets of the various factors originate from RIP and CLIP approaches in human cells or mouse studies in the case of TOP mRNAs (see Materials and methods).

Intriguingly, compared to all mRNAs, group I list mRNAs were GC-rich, as well as TOP mRNAs and ATXN2 targets, whereas all other group II lists were AU-rich (**Figure 5A**). Furthermore, they shared common behavior in the various experiments. This is summarized in **Figure 5B** in a heatmap representing their median value in each dataset, while **Figure 5—figure supplements 1** and **2** provide detailed analysis, as described below.

Group I list mRNAs tended to be dependent on DDX6 and XRN1 but not on PAT1B for stability (**Figure 5—figure supplement 1B–D**), with nevertheless some variation between cell lines, as only SMG6 targets were sensitive to XRN1 depletion in HeLa cells (**Figure 5—figure supplement 1C**, upper panel). They did not accumulate in PBs and their translation rate was independent of DDX6 (**Figure 5—figure supplement 2A,B**). These results were consistent with their high GC content and our global analysis above. However, surprisingly, within PB-excluded mRNAs, there was little or no additional effect of being a SMG6 target, an YTHDF2 target or containing a G4 motif, neither for DDX6- nor for XRN1-dependent decay (**Figure 5—figure supplement 2C,D**).

Group II list mRNAs, except TOP mRNAs, ATXN2 and 4E-T targets, had the exact mirror fate compared to group I lists: they were stabilized following PAT1B silencing (**Figure 5—figure supplement 1D**), as previously reported for ARE-containing mRNAs and the targets of the ARE-BPs HuR and TTP (**Vindry et al., 2017**), but not following DDX6 or XRN1 silencing (**Figure 5—figure supplement 1B,C**); they were enriched in PBs and translationally more active after DDX6 silencing (**Figure 5—figure supplement 2A,B**), which is consistent with the reported presence of most of these regulatory proteins in PBs (**Hubstenberger et al., 2017; Franks and Lykke-Andersen, 2007**).

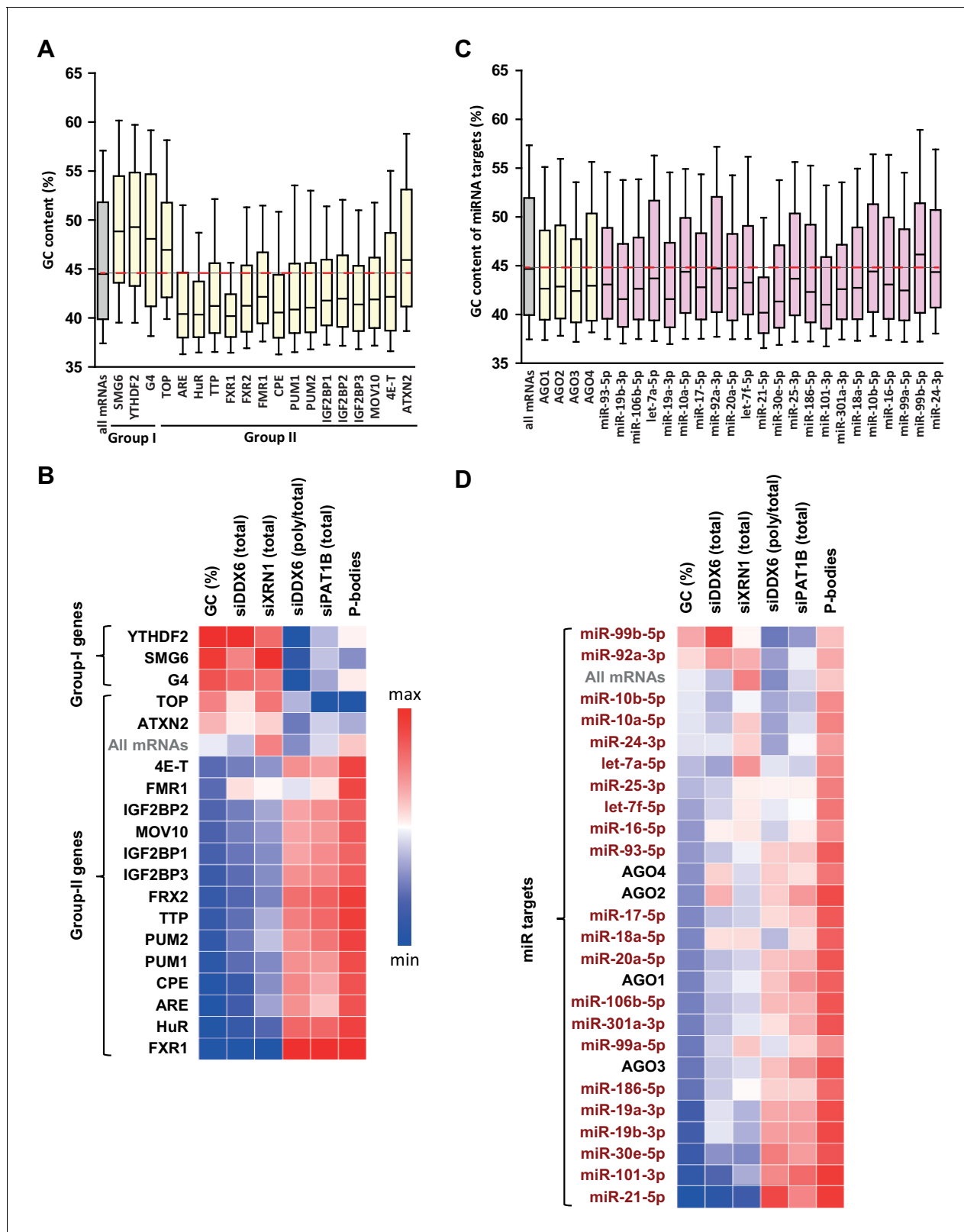


Figure 5. GC biases in the targets of various RNA decay factors, translation regulators and miRNAs. (A) GC content biases in the targets of various RBPs. The targets of the indicated factors were defined using CLIP experiments or motif analysis (see Materials and methods). The boxplots represent the distribution of the GC content of their gene. The distribution for all mRNAs is presented for comparison (in gray) and the red dashed line indicates its median value. (B) Heatmap representation of the different factors depending on the behavior of their mRNA targets in the different datasets. The Figure 5 continued on next page

Figure 5 continued

lines were ordered by increasing GC content, and the columns as in **Figure 4E**. (C) GC content biases in the targets of various AGO proteins and miRNAs. The AGO targets (in yellow) were defined using CLIP experiments and the miRNAs targets (in violet) using miRTarbase. The data are represented as in (A). (D) Heatmap representation of AGO and miRNAs depending on the behavior of their mRNA targets in the different datasets. The data were represented as in (B), using the same color code.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 5:

Figure supplement 1. Targets of group I and II regulators (part I).

Figure supplement 2. Targets of group I and II regulators (part II).

Figure supplement 3. Targets of the miRNA pathway.

Figure supplement 4. Targets of the group I and II regulators behave like mRNAs of similar GC content.

Figure supplement 5. miRNA targets behave like mRNAs of similar GC content.

Among the three group II outsiders, ATXN2 targets and TOP mRNAs behaved like group I lists, except that they were not dependent on DDX6 for stability. ATXN2 is a major DDX6 partner, but one which is excluded from PBs (*Ayache et al., 2015; Nonhoff et al., 2007*), consistent with its targets also being excluded from PBs (**Figure 5—figure supplement 2A**). However, these mRNAs were only weakly or not stabilized following DDX6 or XRN1 silencing (**Figure 5—figure supplement 1B,C**), leaving unresolved the function of the ATXN2/DDX6 interaction in the cytosol. TOP mRNAs are special within group II lists, in that their translational control relies on a cap-adjacent motif rather than on 3'UTR binding. 4E-T is a major DDX6 partner required for PB assembly (*Ayache et al., 2015; Kamenska et al., 2016*). Its targets were markedly enriched in PBs (**Figure 5—figure supplement 2A**), though, intriguingly, poorly affected by PAT1B silencing in terms of stability (**Figure 5—figure supplement 1D**), or by DDX6 silencing in terms of translation (**Figure 5—figure supplement 2B**). This dissociation between PB localization and mRNA fate indicated that PB recruitment is not sufficient for an mRNA to have a PAT1B-dependent stability and DDX6-dependent translation repression. It also pointed to a particular role of 4E-T in PB targeting or scaffolding.

Our analysis is also informative on the link between DDX6-dependent decay and codon usage. Previous yeast studies have debated whether suboptimal codons could enhance DDX6 recruitment to trigger mRNA decay (*Radhakrishnan et al., 2016*) or not (*Chan et al., 2018; He et al., 2018*). We showed above that GC-rich mRNAs, which tend to be decayed by DDX6 and to bind DDX6 (**Figure 3A,C**), are enriched for optimal rather than suboptimal codons (**Figure 2D**). Furthermore, the correlation between polysomal retention (defined as the fraction of total mRNA present in polyosomes) and DDX6-dependent decay was weak ($r_s = 0.10$, $p < 0.0001$; **Figure 5—figure supplement 2E**). Thus, in HEK293 cells, this mechanism seemed to account for a minor part of DDX6-dependent decay, if any, as also found in mouse stem cells (*Freimer et al., 2018*).

In conclusion, we observed that mRNA decay regulators preferentially target GC-rich mRNAs, which undergo DDX6- and XRN1-dependant decay, whereas most translation regulators preferentially target AU-rich mRNAs, which are subjected to storage in PBs and have a PAT1B-dependent stability.

Targets of the miRNA pathway have a biased GC content

The miRNA pathway, which leads to translation repression and mRNA decay, has been previously associated with DDX6 activity and PB localization (*Bhattacharyya et al., 2006; Chu and Rana, 2006*). To study this pathway, we used the list of AGO1-4 targets, as identified in CLIP experiments (*Yang et al., 2015*) (**Figure 5—figure supplement 3A**). In addition, we analyzed the experimentally documented targets of the 22 most abundant miRNAs in HEK293 cells (19 from *Hafner et al., 2010*, and three additional ones from our own quantitation, **Figure 5—figure supplement 3B**), as described in miRTarBase (*Hsu et al., 2014*). The mRNA targets of AGO proteins were AU-rich, as observed for most group II RBPs, and this was also true for the targets of most miRNAs when analyzed separately (**Figure 5C**). Overall, they also shared common behavior in the various silencing experiments and PB dataset, with nevertheless some differences. This is summarized in **Figure 5D** in a heatmap representing their median value in each dataset, while **Figure 5—figure supplement 3** provides detailed analysis, as described below.

The AGO targets tended to accumulate in PBs (**Figure 5—figure supplement 3C**; note that the number of AGO4 targets was too small to reach statistical significance) and their translation rate was

DDX6-dependent (**Figure 5—figure supplement 3D**). In terms of stability, only AGO2 targets were marginally DDX6-dependent (**Figure 5—figure supplement 3E**), and the effects were not stronger when analyzing separately the mRNAs enriched or excluded from PBs (**Figure 5—figure supplement 3F**). In contrast, their stability was PAT1B-dependent (**Figure 5—figure supplement 3G**).

The targets of the 22 miRNAs had a behavior overall similar to the targets of AGO proteins, with accumulation in PBs, DDX6-dependent translation, and PAT1B rather than DDX6- or XRN1-dependent stability (**Figure 5D**). However, our analysis revealed some differences between miRNAs, particularly in terms of extent of PB storage (**Figure 5—figure supplement 3H**), which appeared associated with distinct GC content: at the two extremes, miR21-5p targets were particularly AU-rich and strongly enriched in PBs, while the targets of miR-99b-5p, the most GC-rich in these sets, were not. In terms of translation, miR-18a-5p targets were not sensitive to DDX6 silencing, despite clear enrichment in PBs. In terms of stability, the targets of the less GC-rich miR-99b-5p were sensitive to DDX6 but not PAT1B silencing.

In conclusion, miRNA targets generally tend to be AU-rich, like the targets of most translation regulators, and accumulate in PBs. While their translation depends on DDX6, their stability is not markedly affected following DDX6 or XRN1 silencing, but is dependent on PAT1B.

The GC content of mRNAs shapes post-transcriptional regulation

As the global GC content appeared closely linked to mRNA fate, but also to RBP and miRNA binding, as well as to translation activity, our analyses then aimed at ranking the importance of these various features.

We first assessed the respective weight of the GC content and the binding capacity of particular RBPs. To this aim, we binned the whole transcriptome depending on its GC content (bin size of 500 transcripts). The median fold-changes of the bins in each RNAseq dataset were calculated and plotted as a function of their median GC content. Median values were similarly calculated for the various group I and II target lists and overlaid for comparison (**Figure 5—figure supplement 4**). Surprisingly, the fold changes of the targets of particular RBPs generally fell very close to the tendency plot based on GC content only. This was particularly true for DDX6- and XRN1-dependent decay, with only 4E-T targets being more stabilized after DDX6 silencing than expected from their GC content (**Figure 5—figure supplement 4A,B**). In terms of translation rate, only FXR1 targets were slightly more translated after DDX6 depletion than expected from their GC content (**Figure 5—figure supplement 4C**). FXR1 targets were also more dependent on PAT1B for stability (**Figure 5—figure supplement 4D**) and more enriched in PBs (**Figure 5—figure supplement 4E**). In the case of HuR, TTP, FXR1-2, FMR1, PUM2, IGF2BP1-3 and MOV10, there was some, but minimal, additional PAT1B-sensitivity and PB enrichment.

Similarly, the fate of the miRNA targets was mostly in the range expected from their GC content (**Figure 5—figure supplement 5**). Nevertheless, some miRNA-specific effects were observed. For instance, the targets of several miRNAs were more stabilized than expected after DDX6 depletion, including miR-99b-5p, 92a-3p, 16-5 p, 18a-5p, 19a-3p, 19b-3p (**Figure 5—figure supplement 5A**), though this was not observed following XRN1 depletion (**Figure 5—figure supplement 5B**). Similarly, while the targets of miR-101-3 p and miR-21-5 p were both particularly enriched in PBs (**Figure 5—figure supplement 5E**), only miR-101-3 p targets were particularly dependent on PAT1B for stability (**Figure 5—figure supplement 5D**). Interestingly, we noted that the median GC content of the miRNA targets correlated with the GC content of the miRNA itself (**Figure 5—figure supplement 5F**). Thus, despite their small size, the miRNA binding sites tend to have a GC content similar to that of their full-length host mRNA, which affects their fate in terms of PB localization and post-transcriptional control. Altogether, our analysis showed that, in steady-state conditions, mRNA GC content is a major parameter in terms of PB localization and regulation by DDX6, XRN1 and PAT1B, while the presence of binding sites for regulatory proteins makes subsidiary contributions.

Next, the strong correlation observed between GC content and PB localization raised the possibility that localization out of PBs was sufficient to determine mRNA sensitivity to DDX6 and XRN1 decay. While a tempting hypothesis, it could not explain all DDX6- and XRN1-dependent decay, since TOP mRNAs were strongly excluded from PBs (**Figure 5—figure supplement 2A**), but unaffected by DDX6 or XRN1 silencing (**Figure 5—figure supplement 1B,C**). To address this issue more generally, we considered the fate of the minor subset of AU-rich mRNAs that were excluded from PBs. Compared to other similarly AU-rich transcripts, these mRNAs were indeed more sensitive to

XRN1-dependent decay (**Figure 6—figure supplement 1A**). However they were not more sensitive to DDX6-dependent decay (**Figure 6—figure supplement 1B**). This suggested that XRN1 preference for GC-rich mRNAs is at least in part related to their exclusion from PBs, whereas DDX6 has a true preference for GC-rich mRNAs.

Interestingly, these PB-excluded AU-rich mRNAs were strongly enriched in mRNAs encoding secreted proteins and proteins associated with membranous organelles, with GO categories related to mitochondria, intracellular organelles and extracellular matrix proteins representing up to 36% of the transcripts (**Figure 6—figure supplement 1C**). Thus, while mRNA localization in PBs is highly influenced by their GC content, it may also be outcompeted by retention on membranous organelles and plasma membrane.

Contribution of both the CDS and 3'UTR GC content to PB localization

The next major issue was to distinguish which of the CDS or 3'UTR is more important for PB localization, since they have very similar GC contents ($r_s = 0.72$, $p < 0.0001$).

As a first approach, we analyzed PB localization of long non-coding RNAs (lncRNAs) (**Hubstenberger et al., 2017**). The correlation between their GC content and PB accumulation was significant ($r_s = -0.20$, $p < 0.0001$), but much weaker than that observed for mRNAs (-0.64 , **Figure 1B**) or 3'UTRs (-0.55 , **Figure 1D**) (-0.20 and -0.55 are significantly different, $p < 0.0001$). In fact, AU-rich lncRNAs poorly accumulated in PBs, while GC-rich lncRNAs were excluded (**Figure 6—figure supplement 1D,E**). This suggested that the coding capacity of mRNAs was important for PB localization. As a second approach, we directly analyzed the respective contribution of the GC content of CDS and 3'UTR to PB localization. On one side, we analyzed transcripts by groups of similar 3'UTR GC content. Their GC3 was systematically much lower in PB mRNAs than in PB-excluded mRNAs, with differences ranging between 9% and 13% GC (**Figure 6A**, **Figure 6—figure supplement 1E**). In a mirror analysis, we analyzed groups of transcripts with similar GC3. The importance of the 3'UTR GC content became visible only for GC3 higher than 50% GC (note that GC3 median value is 59% GC), with AU-rich 3'UTR allowing for their accumulation in PBs despite a GC-rich CDS (**Figure 6B**, **Figure 6—figure supplement 1E**). We concluded that both the CDS and the 3'UTR GC content are important for PB localization, with the CDS being the primary feature.

We speculate that suboptimal translation of AU-rich CDS makes mRNAs optimal targets for translation regulation, since any control mechanism has to rely on a limiting step. Conversely, optimally translated transcripts would be better controlled at the level of stability. One prediction is that proteins produced in limiting amounts, such as those encoded by haplo-insufficiency genes, are more likely to be encoded by PB mRNAs. Genome-wide haplo-insufficiency prediction scores have been defined for human genes, using diverse genomic, evolutionary, and functional properties trained on known haplo-insufficient and haplo-sufficient genes (**Huang et al., 2010**; **Steinberg et al., 2015**). Using these scores, we found that haplo-insufficient mRNAs were indeed significantly enriched in PBs (**Figure 6C**).

To add experimental support to the importance of GC content for PB assembly, we conducted two assays. First, we analyzed the localization of reporter transcripts that differ only by the GC content of their CDS. HEK293 cells stably expressing the PB marker GFP-LSM14A (**Hubstenberger et al., 2017**) were transfected with plasmids containing an AU-rich (36% GC) or GC-rich (58% GC) CDS that encodes the same Renilla luciferase (Rluc) protein. After 24 h cells were analyzed for luciferase activity and transcript localization. In agreement with our previous analyses, Rluc protein yield was considerably reduced (4.5-fold) using the AU-rich rather than the GC-rich version of the CDS, despite similar mRNA levels (**Figure 6D**). The localization of the Rluc transcripts was then analyzed by smiFISH using AU-rich or GC-rich specific probes (**Figure 6—figure supplement 2A**, **Supplementary file 2**) (**Tsanov et al., 2016**). PBs containing clusters of Rluc mRNA molecules were five times more frequent using the AU-rich than the GC-rich version of the CDS (**Figure 6E,F**). A similar result was obtained in HEK293 cells after PB immunostaining with DDX6 antibodies (**Figure 6F**, **Figure 6—figure supplement 2B**). Therefore, simply changing the GC content of this medium-size CDS (564 codons) was sufficient to modify mRNA localization in PBs.

Second, we tested the capacity of AU-rich and GC-rich RNA to form granules independently of translation. To this aim, we set-up a cell-free assay using HEK293 cells expressing GFP-LSM14A to monitor the formation of fluorescent PB-like granules and count them by flow cytometry, as previously performed for PBs (**Hubstenberger et al., 2017**). After lysis and elimination of preexisting PBs

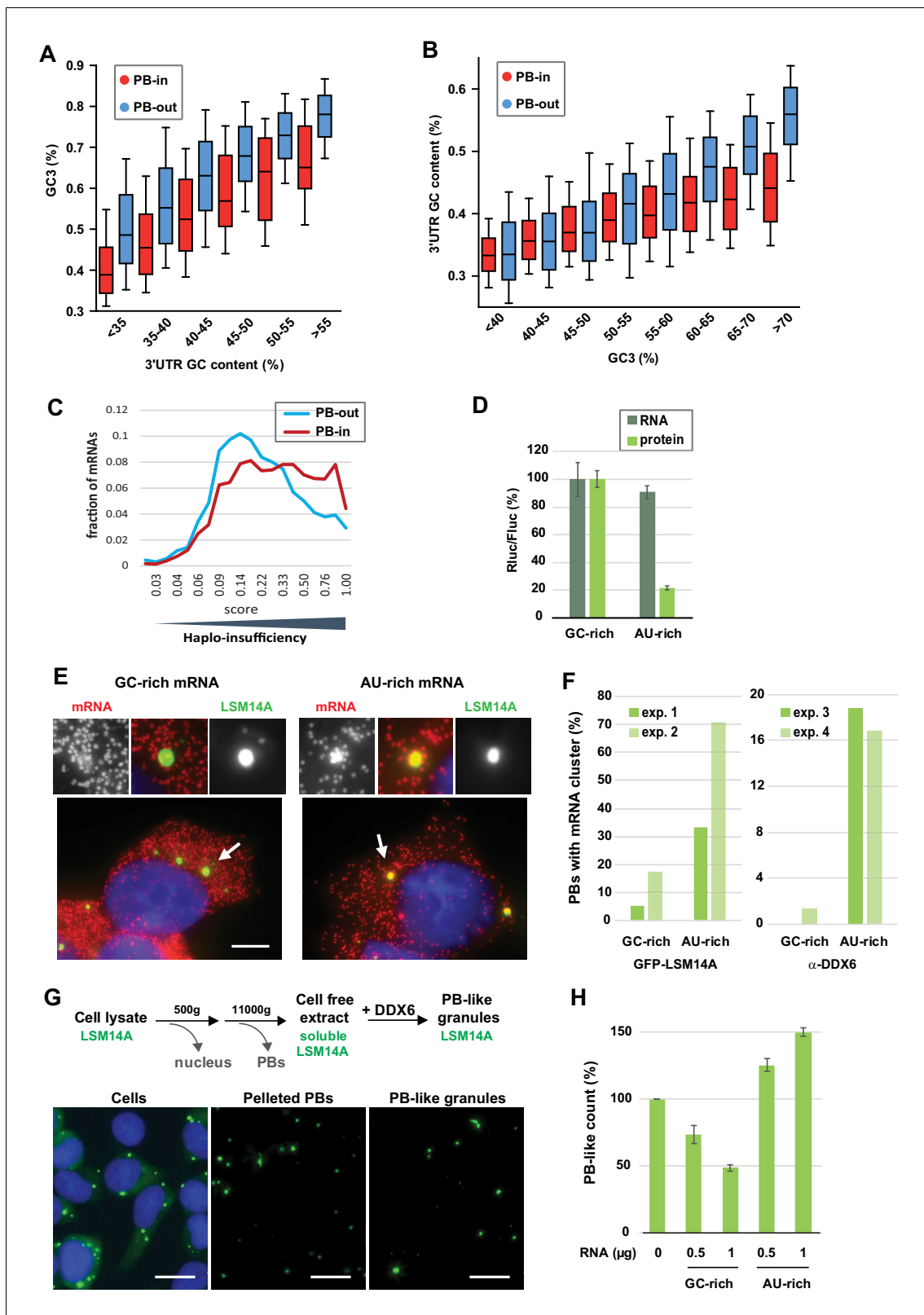


Figure 6. The GC content of the CDS and the 3'UTR both contribute to PB localization. (A) General importance of the CDS. Transcripts were subdivided into six classes depending on the GC content of their 3'UTR (from <40 to >55%). The boxplots represent the distribution of their CDS GC content at position 3 (GC3) in PB-enriched (PB-in) and PB-excluded (PB-out) mRNAs. (B) Importance of the 3'UTR for GC-rich CDSs. Transcripts were subdivided into eight classes depending on their GC3 (from <40 to >70%). The boxplots represent the distribution of their 3'UTR GC content in PB-enriched (PB-in) and PB-excluded (PB-out) mRNAs. (C) Fraction of mRNAs with high GC3 content is enriched in haplo-insufficient genes. (D) Rluc/Fluc ratio is significantly higher in GC-rich mRNAs compared to AU-rich mRNAs, indicating that GC-rich mRNAs are more efficiently translated. (E) Fluorescence microscopy images show that GC-rich mRNAs (red) and LSM14A (green) co-localize in PBs. (F) PBs with mRNA clusters are significantly enriched in GC-rich mRNAs compared to AU-rich mRNAs. (G) Schematic of the experimental workflow to purify PB-like granules from cell lysates. (H) PB-like count is significantly higher in GC-rich mRNAs compared to AU-rich mRNAs.

Figure 6 continued

enriched (PB-in) and PB-excluded (PB-out) mRNAs. (C) The transcripts of haplo-insufficiency genes are enriched in PBs. The haplo-insufficiency score is the probability that a gene is haplo-insufficient, as taken from the [Huang et al. \(2010\)](#) study. The analysis was performed for PB-enriched (PB-in, $n = 4646$, median score 0.26) and PB-excluded (PB-out, $n = 4205$, median score 0.17) mRNAs. The difference of distribution of haplo-insufficiency scores was statistically significant using a two tail Mann-Whitney test: $p < 0.0001$. The results were similar using [Steinberg et al. \(2015\)](#) scores. (D) Protein yield is higher from a GC-rich than an AU-rich CDS. HEK293 cells were transfected with Rluc reporters differing by the GC content of their CDS, along with a control Fluc plasmid. After 24 hr, mRNA levels were measured by qPCR and protein levels by luciferase activity. The Rluc to Fluc ratio for the GC-rich reporter was set to 100 ($n = 3$). Error bars, SD. (E, F) Preferential localization of AU-rich transcripts in PBs. HEK293 cells expressing GFP-LSM14A were transfected with the AU-rich and GC-rich Rluc reporters and the localization of the Rluc transcripts (in red) was analyzed by smiFISH. Representative cells are shown in (E). Bar, 5 μm . Arrows indicate the PBs enlarged above. The experiment was performed in duplicate (exp. 1 and 2) and repeated in HEK293 cells where PBs were immunostained using DDX6 antibodies (exp. 3 and 4). The percentage of PBs containing clusters of Rluc transcripts in the four experiments is represented in (F). Exp.1: 56/75 PBs from 21/27 cells; exp.2: 87/75 PBs from 38/35 cells; exp.3: 31/32 PBs from 15/19 cells; exp.4: 72/83 PBs from 34/41 cells (G) Assembly of PB-like granules in cell-free extracts from HEK293 cells expressing GFP-LSM14A. The scheme recapitulates the main steps of the assay. Fluorescence microscopy images show that PBs in cells, PBs after cell lysis, and reconstituted PB-like granules have similar size. Bar, 10 μm . (H) AU-rich RNA favors the formation of PB-like granules. PB-like granules were assembled in cell-free extracts in the presence of AU-rich or GC-rich RNA, and counted by flow cytometry. Their number in the absence of added RNA was set to 100 ($n = 3$ experiments in duplicate, using two independent cell-free extracts and RNA preparations). Error bars, SD.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 6:

Figure supplement 1. Role of PB localization in XRN1 and DDX6 sensitivity and importance of the coding property for PB localization.

Figure supplement 2. The GC content of reporters RNAs is key for PB localization.

by centrifugation, addition of recombinant DDX6 triggered the formation of new granules on ice, in a dose-dependent manner ([Figure 6—figure supplement 2C–E](#)). These granules had a similar size to endogenous PBs ([Figure 6G](#), [Figure 6—figure supplement 2D](#)). This reconstitution assay was surprisingly efficient, as granule formation required rather low concentrations of both the lysate components (about 100-fold lower than in cells, see Materials and methods) and recombinant DDX6 (0.17 μM versus 3.3 μM in cells, [Ernault-Lange et al., 2012](#)). Next, the cell-free extract was briefly treated with micrococcal nuclease to decrease the amount of cellular RNA, and the assay was repeated with or without addition of an either AU-rich or GC-rich 1700 nt-long synthetic RNA ([Figure 6H](#), [Figure 6—figure supplement 2F](#)). The AU-rich RNA increased the number of PB-like granules in a dose-dependent manner, while GC-rich RNA prevented their formation. Therefore, in the complex lysate environment and at 0°C, uncapped non-polyadenylated AU-rich RNA specifically favor the condensation of granules that are DDX6-dependent and contain LSM14A, two proteins that play a major role in the assembly of cellular PBs.

We conclude from these experimental data and our previous analyses that both the CDS and the 3'UTR contribute to PB localization. Low GC content in the CDS likely acts, at least in part, through codon usage and low translation efficiency. In the 3'UTR low GC content could allow for the binding of RBPs with affinity for AU-rich motifs and/or influence RNA secondary structure.

Discussion

An integrated model of post-transcriptional regulation

Our combined analysis of the transcriptome of purified PBs together with transcriptomes following the silencing of broadly-acting storage and decay factors, including DDX6, XRN1 and PAT1B, provided a general landscape of post-transcriptional regulation in human cells, where mRNA GC content plays a central role. As schematized in [Figure 7](#), GC-rich mRNAs are excluded from PBs and mostly controlled at the mRNA level by a mechanism involving the helicase DDX6 and the 5'–3' exonuclease XRN1. In contrast, AU-rich mRNAs are enriched in PBs and rather controlled at the level of translation by a mechanism also involving DDX6, while their accumulation tend to depend on a mechanism involving the DDX6 partner PAT1B and most likely 3' decay. Accordingly, NMD and m6A-associated mRNA decay pathways tend to target GC-rich mRNAs, while most sequence-specific translation regulators and miRNAs tend to target AU-rich mRNAs. The distinct fate of GC-rich and AU-rich mRNAs correlates with a contrasting protein yield resulting from both different codon usage and CDS length. Thus, 5' mRNA decay appears to control preferentially mRNAs with optimal

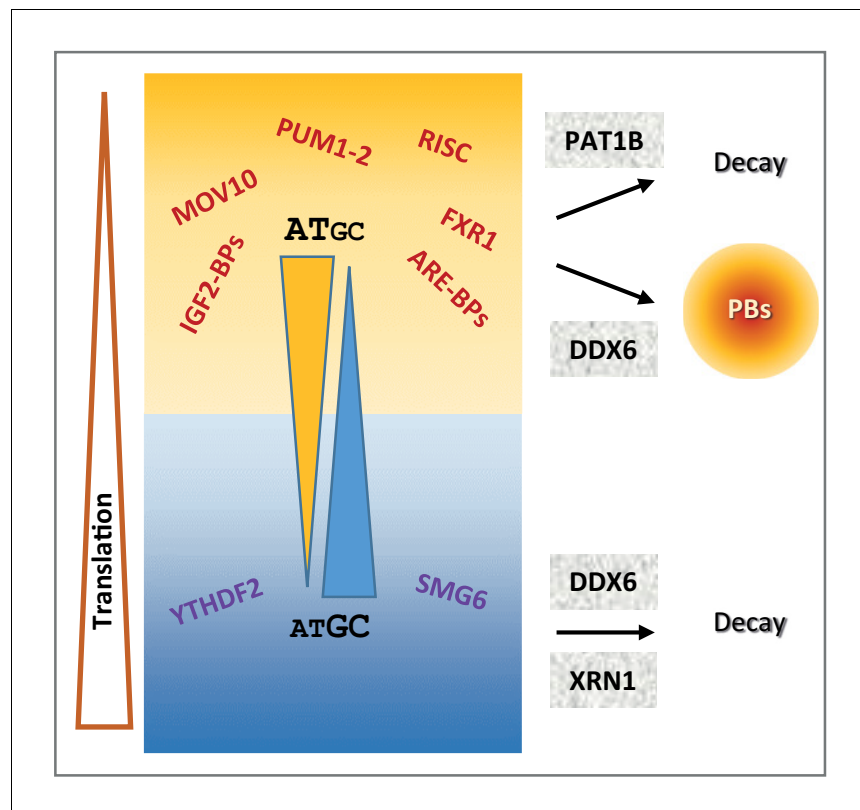


Figure 7. Schematic representation recapitulating the features of mRNA post-transcriptional regulation depending on their GC content.

The online version of this article includes the following figure supplement(s) for figure 7:

Figure supplement 1. Distribution of the gene GC content in various eukaryotic genomes.

translation, which are mostly GC-rich, whereas translation regulation is mostly used to control mRNAs with limiting translational efficiency, which are AU-rich.

It should be stressed that this model only applies to post-transcriptional regulation pathways that involve PBs, XRN1, DDX6 and PAT1B. Moreover, while the analysis was consistent in proliferating cells of various origins, giving rise to a general model, it is possible that changes in cell physiology, for instance at particular developmental stages or during differentiation, rely on a different mechanism. In addition, our analysis focused on trends common to most transcripts, which does not preclude that particular mRNAs could be exceptions to the general model, being GC-rich and translationally controlled, or AU-rich and regulated by 5' decay. In terms of translation yield and PB localization, this model is strongly supported by our experiments using AU-rich and GC-rich RNAs: AU-rich reporter mRNAs have a low protein yield compared to GC-rich ones, they preferentially localize in PBs in cells, and they enhance the formation of PB-like granules in a cell free extract.

GC content and codon usage

While the redundancy of the genetic code should enable amino acids to be encoded by synonymous codons of different base composition, the wide GC content variation between PB-enriched and PB-excluded mRNAs has consequences on the amino acid composition of encoded proteins. It also strongly impacts the identity of the wobble base: in PB mRNAs, the increased frequency of A/U at position 3 of the codon mechanically results in an increased use of low usage codons. As CDS are also longer in PB mRNAs, it further increases the number of low usage codons per CDS in these mRNAs. Interestingly, we showed that the absolute number of low usage codons per CDS best correlates with low protein yield. Thus, these results provide a molecular mechanism to a previously unexplained feature of PB mRNAs, that is, their particularly low protein yield, which we reported was

an intrinsic property of these mRNAs and not simply the result of their sequestration in PBs (*Hubstenberger et al., 2017*). Interestingly, the mRNAs of haplo-insufficiency genes, which by definition are expected to have a limited protein yield, are indeed enriched in PBs (*Figure 6C*).

In addition to the GC-dependent codon bias, we also observed some GC-independent codon bias in PB-enriched mRNAs. Interestingly, some important post-transcriptional regulation programs involve codon usage. This was shown for proliferation- versus differentiation-specific transcripts in human cells (*Gingold et al., 2014*) and for maternal mRNA clearance during the maternal-to-zygotic transition in zebrafish, *Xenopus*, mouse, and *Drosophila* (*Bazzini et al., 2016*). Codon usage could also enable the regulation of small subsets of mRNAs, depending on cellular requirements. In man, half of GO sets show more variability in codon usage than expected by chance (*Rudolph et al., 2016*). Based on GO analysis, we previously demonstrated that PB mRNAs tend to encode regulatory proteins, while PB-excluded mRNAs encode basic functions. Furthermore, proteins of the same complexes tended to be encoded by mRNAs co-regulated in or out of PBs, in so-called post-transcriptional regulons (*Hubstenberger et al., 2017; Standart and Weil, 2018*). We speculate that specific codon usage could also underlie these post-transcriptional regulons.

Distinct mechanisms of mRNA stability control

Our analysis distinguished separate modes of stability control, depending on mRNA GC content. Interestingly, our previous analysis of the read coverage of PB and non-PB RNAs also suggested the existence of distinct decay pathways related to 3' and 5' extremities, respectively (*Hubstenberger et al., 2017*). Part of the triage towards the PAT1B versus the DDX6/XRN1-dependent pathway could be somehow associated with the capacity of the transcripts to condense in PBs, since, among the AU-rich mRNAs, only the ones enriched in PBs were affected by PAT1B silencing (not shown). Nevertheless, PBs do not directly mediate the triage, since (i) TOP mRNAs were strongly excluded from PBs, but unaffected by either DDX6 or XRN1 silencing, and (ii) while PBs disappeared after DDX6 silencing (*Minshall et al., 2009*), causing the release of AU-rich mRNAs into the cytosol, only GC-rich mRNAs were stabilized.

Focusing on DDX6-dependent decay, the minor impact of the 5'UTR GC content, compared to CDS and 3'UTR, indicates that this helicase is not simply involved in allowing XRN1 access to the 5' end. It is tempting to propose rather that, by unwinding GC-rich double-stranded regions over the entire length of the mRNA, DDX6 facilitates XRN1 progression. UPF1, another RNA helicase involved in mRNA decay, has also been shown to preferentially affect the decay of GC-rich mRNAs (*Imamachi et al., 2017*). The same observation was made for targets of the NMD pathway, which involves UPF1, SMG6 and SMG7 (*Colombo et al., 2017*). Although the bias in these cases was restricted to the 3'UTR regions, it suggests that DDX6 could act in concert with other helicases for decay of GC-rich mRNAs. For AU-rich mRNAs, either such an active unfolding would be dispensable, or it would rely on other helicases that remain to be identified, with potential candidates being those enriched in purified PBs (*Hubstenberger et al., 2017*). Noteworthy, in agreement with the present study in cell lines, skin fibroblasts from patients with DDX6 missense mutations also showed significant accumulation of GC-rich mRNAs (*Balak et al., 2019*).

Concerning XRN1, we showed that it preferentially acts on PB-excluded mRNAs, that is, on GC-rich mRNAs but also, to a lesser extent, on a subset of AU-rich mRNAs (*Figure 6—figure supplement 1A*). While XRN1 is described as a general decay factor, there is evidence that 5' decay shows some specificity in vivo. In *Drosophila*, mutations in XRN1 have specific phenotypes, including wound healing, epithelial closure and stem cell renewal in testes, suggesting that it specifically degrades a subset of mRNAs (*Pashler et al., 2016*). Of particular relevance, a recent study showed that yeast XRN1 associates with ribosomes and decays mRNAs during translation (*Tesina et al., 2019*). If the mechanism is conserved in human, it would explain why XRN1 preferentially acts on GC-rich mRNAs, since they are the most actively translated mRNAs.

Turning to PAT1B, we showed that its silencing did not affect the same mRNAs as DDX6 silencing. A recent yeast study also showed that Dhh1/DDX6 and Pat1/PAT1B decay targets poorly overlap, suggesting the existence of two separate pathways in yeast as well (*He et al., 2018*). However, the underlying mechanisms may differ in the two organisms, since both Pat1 and Dhh1 targets were poorly translated in yeast, while only PAT1B targets were poorly translated in our study. Previous studies reported that tethered PAT1B decreases the abundance of a reporter mRNA in human cells, as a result of enhanced deadenylation and decapping (*Ozgur et al., 2010; Kamenska et al., 2014*;

Totaro et al., 2011). However, we did not find any significant evidence of PAT1B-enhanced 5' to 3' decay in our read coverage analysis. Interestingly, genome-wide evidence in yeast too suggests that following decapping a significant fraction of the transcripts up-regulated in cells lacking Pat1 or Lsm1 is efficiently decayed from 3' to 5', rather than by the 5'–3' Xrn1 exonuclease (*He et al., 2018*). Moreover, CLIP experiments in yeast showed a preference for Pat1 and Lsm1 binding to the 3' end of mRNAs (*Mitchell et al., 2013*). Altogether, we therefore favor the possibility that the mechanism by which PAT1B affects mRNA stability in human cells relies prominently on 3' to 5' decay. It could involve the CCR4/CNOT deadenylase and the LMS1-7 complexes, as, despite their low abundance or small size, CNOT1 and LSM2/4 had high scores in our previous PAT1B interactome analysis (*Vindry et al., 2017; Vindry et al., 2019*).

PAT1B showed a strong preference for AU-rich targets, including those containing AREs. Many studies have demonstrated a link between AREs and mRNA stability, and its striking importance for processes such as inflammation (*Wells et al., 2017*). Most ARE-BPs promote mRNA destabilization while some ARE-BPs, such as HuR (*Lebedeva et al., 2011; Mukherjee et al., 2011*) and AUF1 for a subset of mRNAs (*Yoon et al., 2014*), can stabilize mRNAs. Altogether, these observations raise the possibility that ARE-BPs behave either as enhancers or inhibitors of PAT1B activity in mRNA decay. Similarly, the miRNA pathway could activate this PAT1B activity.

Translation repression and PB accumulation

DDX6 activity in translation repression has been documented in a variety of biological contexts. In *Xenopus* oocytes, DDX6 contributes to the repression of maternal mRNAs, as a component of the well characterized CPEB complex (*Minshall et al., 2007*). In *Drosophila*, Me31B/DDX6 represses the translation of thousands of mRNAs during the early stages of the maternal to zygotic transition (*Wang et al., 2017*). It also collaborates with FMRP and AGO proteins for translation repression in fly neurons (*Barbee et al., 2006*). In mammals, DDX6 is a general co-factor of the miRNA pathway (*Chen et al., 2014; Mathys et al., 2014; Kamenska et al., 2016; Chu and Rana, 2006*). The intriguing finding of our analysis was that the targets of most tested translation regulators (FRX1-2, FMR1, PUM1-2, most miRNAs. . .) were AU-rich and had a median behavior in all datasets similar to other mRNAs of same GC content. While the GC bias of the targets of the various RBPs and miRNAs are likely to reflect their sequence preference, some RBPs may not reach sufficient concentration to occupy a significant number of binding sites. Moreover binding does not mean activity, and these factors could require cofactors or post-translational modifications to become 'productive' in terms of mRNA regulation. Of note, while TOP mRNAs clearly constituted an exception in terms of GC content, they are particular too in terms of their translation repression mechanism, with a regulatory sequence located at the 5' end.

PBs add another layer to translation regulation, by storing translationally repressed mRNAs. It was already known that ARE-containing mRNAs bound to ARE-BPs such as TTP and BRF were recruited to PBs (*Franks and Lykke-Andersen, 2007*) and that miRNA targets accumulate in PBs upon miRNA binding in a reversible manner (*Bhattacharyya et al., 2006; Liu et al., 2005*). As DDX6 and 4E-T are key factors in PB assembly in mammalian cells (*Minshall et al., 2009; Ayache et al., 2015; Kamenska et al., 2014; Ferraiuolo et al., 2005*), it raises the question of whether these proteins contribute to translation repression by triggering the recruitment of arrested mRNA to PBs, or by mediating translation arrest, which then results in mRNA recruitment to PBs. While we have no answer for DDX6, we observed that 4E-T targets were particularly enriched in PBs, though rather insensitive to DDX6 or PAT1B depletion. First, this suggests that 4E-T function in PBs is partly independent of DDX6, agreeing with the previous observation that some PBs can still form when the DDX6 interaction domain of 4E-T is mutated (*Kamenska et al., 2016*). Second, it indicates that PB localization and translation repression by DDX6 can be separated, at least to some extent.

In addition to their high AU content, we observed that PB mRNAs were longer than mRNAs excluded from PBs. Long CDS could favor mRNA recruitment in PBs by decreasing translation efficiency, and hence increasing the fraction of polysome-free mRNAs. Long 3'UTR should increase the probability of binding translation regulators, contributing also to PB recruitment. In agreement, it is interesting that DDX6 preferentially repressed the translation of mRNAs with long 3'UTR, while the CDS length was irrelevant (**Figure 3—figure supplement 2G**). It is also possible that protein binding over the entire length of mRNA may contribute to PB recruitment. This would explain why the GC content of the 5'UTR has little impact as it is considerably shorter than CDS and 3'UTR. In this

regard, it is interesting to note that we and others have previously proposed from biochemical experiments and electron microscopy imaging that DDX6 and its partner LSM14A coat repressed mRNAs at multiple positions, according to their length (*Ernoul-Lange et al., 2012; Götze et al., 2017*).

Evolutionary issues

Our results raise intriguing issues in terms of evolution. While PBs have been observed in very diverse eukaryotes, animal and vegetal, the GC-rich part of the human genome only emerged in amniotes (the ancestor of birds and mammals) (*Duret et al., 2002*). In more distant organisms, such as yeast, *C. elegans*, *Drosophila* or *Xenopus*, genes have a narrow GC content distribution, most often AU-rich (*Figure 7—figure supplement 1*). Thus, despite the conservation of the DDX6, XRN1 and to a lesser extent PAT1B proteins in eukaryotes, distinct modes of mRNA stability control depending on GC content may have evolved more recently. Moreover, the enzymatic properties of DDX6 could have adapted to the higher GC content of human transcripts.

The GC-rich part of the human genome was acquired through GC-biased gene conversion (gBGC), a non-selective process linked with meiotic recombination affecting GC content evolution (*Duret and Galtier, 2009*). We considered the possibility that meiotic recombination occurred more frequently in genomic regions containing genes involved in basic functions, leading to stronger gBGC and, consequently, to higher GC content of PB-excluded mRNA. However, our analysis showed that mRNA base composition and PB enrichment are associated independently of meiotic recombination or the genomic context. We therefore put forward a model where the genome of higher eukaryotes has evolved partly to facilitate the control of regulators at the translation level, by limiting their protein yield. Regardless, the overall outcome of our study is that in human the GC content, a feature written in the genome, shapes in part mRNA fate and its control in a strikingly coherent system.

Materials and methods

Key resources table

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Cell line (<i>Homo sapiens</i>)	HEK293	ATCC	Cat# PTA-4488, RRID:CVCL_0045	
Cell line (<i>Homo sapiens</i>)	HeLa	ATCC	Cat# CCL-2, RRID:CVCL_0030	
Cell line (<i>Homo sapiens</i>)	HCT116	ATCC	Cat# CCL-247, RRID:CVCL_0291	
Cell line (<i>Homo sapiens</i>)	HEK293 expressing GFP-LSM14A	<i>Hubstenberger et al., 2017</i>	PMID:28965817	
Transfected construct (rabbit)	si β -Globin	<i>Serman et al., 2007</i>	PMID:17604308	GGUGAAUGUGGAAGAAGUdTdT siRNA used as negative control for the siDDX6 expt.
Transfected construct (human)	siDDX6	<i>Minshall et al., 2009</i>	PMID:19297524	GGAACUAUGAAGACUAAAAdTdT
Transfected construct (human)	siXRN1	Thermofisher	Cat# AM16708A	ID125199
Transfected construct (human)	siRNA negative control	Thermofisher	Cat# 4390843	siRNA used as a negative control for the siXRN1 expt.
Transfected construct (human)	shXRN1	Thermofisher	Cat# RHS 4696–99704634	Lentiviral 'TRIPZ' construct to transfect and express the XRN1 shRNA.
Transfected construct (human)	Non-silencing shRNA	Thermofisher	Cat# RHS 4743	Lentiviral 'TRIPZ' construct to transfect and express the control shRNA.

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Antibody	anti DDX6 (rabbit polyclonal)	Novus biological	Cat# NB200-191, RRID:AB_10003156	WB (1:15000), IF (1:2000)
Antibody	Anti XRN1 (rabbit polyclonal)	Novus Biosciences	Cat# NB 500-191, RRID:AB_527572	WB (1:5000)
Antibody	Anti XRN1 (rabbit polyclonal)	Bethyl	Cat# A300-443A, RRID:AB_2219047	WB (1:1000)
Antibody	Anti ribosomal S6 (rabbit monoclonal)	Cell signalling technologies	Cat# 2217, RRID:AB_331355	WB (1:5000)
Antibody	Anti Pol II (rabbit polyclonal)	Santa Cruz	Cat# sc-899, RRID:AB_632359	WB (1:100)
Antibody	Anti tubulin (mouse monoclonal)	Sigma-Aldrich	Cat# T9026, RRID:AB_477593	WB (1:30000)
Recombinant DNA reagent	hRluc-GFP-GC-rich	This paper		phRL-CMV vector bearing an Rluc-GFP GC-rich insert, used in PB-like reconstitution, smiFISH and luciferase reporter expts.
Recombinant DNA reagent	Rluc-GFP-AU-rich	This paper		phRL-CMV vector bearing an Rluc-GFP GC-rich insert, used in PB-like reconstitution, smiFISH and luciferase reporter expts.
Sequence-based reagent	ACTB qPCR primers	This paper		Fwd: TCCCTGGAGAAGAGCTACGA Rev: AGCACTGTGTTGGCGTACAG
Sequence-based reagent	APP qPCR primers	Gift from R. Blaise		Fwd: acttgcatgactacggc Rev: actcttcagtgtcaagttgt
Sequence-based reagent	BACE1 qPCR primers	Gift from R. Blaise		Fwd: ctttgaggagatggtggac Rev: aaagtactgctgcctgtat
Sequence-based reagent	LSM14A qPCR primers	This paper		Fwd: AGCAGTTTGGTGCTGTTGGT Rev: AACCGCACTACTTTGGGGTA
Sequence-based reagent	LSM14B qPCR primers	This paper		Fwd: CGACAACATCTCTTCTGAAC TCAA Rev: GTGTTGAGCTTCTCTCTTCG
Sequence-based reagent	MFN2 qPCR primers	This paper		Fwd: GAACCTGGAGCAGGAAATG Rev: AACCAACCGCTTTATTCTCT
Sequence-based reagent	PNRC1 qPCR primers	This paper		Fwd: CCCCTCAGGAAAGAGGTTTT Rev: ACAAGTGATAACCATGAACAAGCTG
Sequence-based reagent	TIMP2 qPCR primers	<i>Blaise et al., 2012</i>	PMID:22260497	Fwd: gaagagcctgaaccacaggt Rev: cgaggaggagatgtgacac
Sequence-based reagent	TRIB1 qPCR primers	This paper		Fwd: ACCTGAAGCTTAGGAAGTTCGT Rev: CTGACAAAGCATCATCTTCCCC
Sequence-based reagent	HPRT1 qPCR primers	This paper		Fwd: TAATTGACACTGGCAAACAATGCAGACT Rev: GGGCATATCTACAACAACACTTGTCTGGA
Sequence-based reagent	REN-lowGC qPCR primers	This paper		Fwd: CCAGGATTCTTTCCAATGC Rev: CTTGCGAAAATGAAGACCTT
Sequence-based reagent	REN-highGC qPCR primers	This paper		Fwd: CGAGAACGCCGTGATTTT Rev: GACGTGCCTCCACAGGTAG
Sequence-based reagent	FIREfly qPCR primers	This paper		Fwd: TGAGTACTTCGAAATGTCCGTTT Rev: GTATTGAGCCCATATCGTTTCAT
Sequence-based reagent	RenGFP-lowGC-24 DNA probe	This paper		Set of 24 primary probes specific of the RenGFP lowGC mRNA used in smiFISH expts. (See Supplementary file 2)

Continued on next page

Continued

Reagent type (species) or resource	Designation	Source or reference	Identifiers	Additional information
Sequence-based reagent	RenGFP-highGC-24 DNA probe	This paper		Set of 24 primary probes specific of the RenGFP highGC mRNA used in smiFISH expts. (see Supplementary file 2)
Sequence-based reagent	FLAP-Y-Cy3 DNA probe	<i>Tsanov et al., 2016</i>	PMID:27599845	AA TGC ATG TCG ACG AGG TCC GAG TGT AA Secondary probe conjugated to two Cy3 moieties at the 5' and 3' termini. Used in smiFISH expts.
Peptide, recombinant protein	CBP-DDX6-HIS	<i>Ernault-Lange et al., 2012</i>	PMID:22836354	
Commercial assay or kit	miRNeasy Mini kit	Qiagen	Cat# 217004	
Commercial assay or kit	TruSeq Stranded Total RNA kit	Illumina	Cat# RS-122-2201	
Commercial assay or kit	Dual-Glo Luciferase assay system	Promega	Cat# E2920	
Chemical compound, drug	Micrococcal Nuclease	Thermo Scientific	Cat# 88216	
Software, algorithm	Cluster 3.0	http://www.eisenlab.org/eisen/?page_id=42	RRID:SCR_013505	
Software, algorithm	Java Treeview	https://sourceforge.net/projects/jtreeview/	RRID:SCR_016916	
Software, algorithm	Morpheus	https://software.broadinstitute.org/morpheus	RRID: SCR_017386	
Software, algorithm	Icy	http://icy.bioimageanalysis.org/	RRID:SCR_010587	
Software, algorithm	WebGestalt	http://www.webgestalt.org/	RRID:SCR_006786	

Cell culture and transfection

Human embryonic kidney HEK293 cells, epithelioid carcinoma HeLa cells and colorectal carcinoma HCT116 cells were obtained from ATCC. All cells were tested negative for mycoplasma contamination. HEK293 and HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum. HCT116 cells were grown in McCoy's 5A modified medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum, 5% (v/v) sodium pyruvate and 5% (v/v) non-essential amino acids. The HEK293 cell line stably expressing GFP-LSM14A (*Hubstenberger et al., 2017*) was maintained under selection using 500 µg/ml Geneticin (Gibco, Life Technology).

For DDX6 silencing, $7 \cdot 10^5$ cells were transfected at the time of their plating (reverse transfection) with 50 pmoles DDX6 or control β -globin siRNAs (*Minshall et al., 2009*) per 3 cm diameter well, using Lipofectamine 2000 (Life Technologies, France), and split in two 24 hr later. Cells were lysed 48 hr after transfection.

For XRN1 silencing with siRNAs, $2 \cdot 10^5$ cells/well were plated in 6-well plates and transfected 24 hr later with 50 nM siRNA negative Control or Silencer Pre-designed siRNA XRN1 (ThermoFisher), using Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies). Cells were lysed 48 hr after transfection.

For XRN1 silencing with shRNA, a doxycycline inducible construct provided by ThermoFisher (TRIPZ) with shRNA against XRN1 or non-silencing shRNA was introduced by lentiviral transduction (MOI 0.5). After 10 days of puromycin selection, cells were tested for expression of the construct. For shRNA induction cells were grown to 30% confluency in 10 cm plates before adding 1 µg/ml doxycycline. After 24 hr, cells were split in three and doxycycline was maintained until 48 hr.

For smiFISH experiments and luciferase reporter expression, $2 \cdot 10^5$ cells were plated in 35 mm diameter dish and transfected 24 hr later with 100 ng of hRluc-GFP-GC-rich or Rluc-GFP-AU-rich plasmids using GenJet Plus DNA (SignaGen Laboratories). For luciferase reporter assay, a Firefly luciferase plasmid (150 ng) was added for normalization. All transfection mixes were made up to 1 µg with pUC19. Cells were processed 24 hr after transfection.

Construction of DNA plasmids

All plasmids were obtained using the InFusion Advantage PCR cloning kit (Clontech). To obtain medium-size CDS, we cloned the Rluc CDS in frame with the one of GFP. An AU-rich CDS of GFP was amplified from the pUC57-GFP(opt) plasmid (generous gift from N. Campo, *Martin et al., 2010*) and cloned in place of GFP into the BamHI/NotI sites of the pEGFP-N1 plasmid (Clontech) to generate the pGFP(opt)-N1 plasmid. The AU-rich CDS of Rluc was taken from the pRL-TK vector (Promega) and cloned in frame into the pGFP(opt)-N1 plasmid to obtain pRL-GFP(opt) plasmid. The GC-rich CDS of Rluc (hRluc) was taken from the pHRL-CMV vector (Promega) and cloned in-frame into the pEGFP-N1 to obtain the pHRL-EGFP plasmid. Finally, hRluc-EGFP-GC-rich and Rluc-GFP-AU-rich CDS were cloned into the NheI/NotI sites of the T7 promoter-containing pHRL-CMV vector to generate hRluc-GFP-GC-rich and Rluc-GFP-AU-rich plasmids, respectively. The resulting plasmids differ by their AU-rich or GC-rich CDS but encode the same Rluc-GFP fusion protein.

CBP-DDX6-HIS protein purification

E. E. coli BL21-CodonPlus (Novagen) transformed with the CBP-p54-His expression vector (*Ernoul-Lange et al., 2012*) were induced in MagicMedia (Invitrogen) at 16°C during 72 hr to produce the CBP-DDX6-HIS protein. Crude protein extract was prepared and sequentially purified as described previously (*Ernoul-Lange et al., 2012*).

In vitro transcription and RNA purification

GC-rich and AU-rich RNAs (1707 and 1714 bp, respectively) were transcribed with T7 RNA polymerase (Promega) from linearized (NotI) hRluc-GFP-GC-rich and Rluc-GFP-AU-rich plasmids, purified using the Nucleospin RNA clean-up XS (Macherey-Nagel), quantified with Quantus Fluorometer (Promega) and visualized on 1% agarose gel in 1XTAE buffer containing ethidium bromide.

Cell-free extract preparation

Stable GFP-LSM14A HEK293 cells grown to 80–90% confluency in 15 cm plates were collected in PBS, cell pellets were frozen in liquid nitrogen and stored at –80°C. Pellets were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,2% Triton X-100) containing 65 U/mL RNaseOut ribonuclease inhibitor (Promega) and EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics), incubated 20 min on ice and centrifuged at 500 xg for 5 min at 4°C to deplete nuclei. The cytoplasmic lysate was half diluted to 75 mM NaCl with buffer containing 50 mM Tris, pH 7.4, 1 mM EDTA, 10 mM CaCl₂, 0,2% Triton X-100, and treated with 1000 u/ml of micrococcal nuclease (Thermo Scientific) for 15 min at 37°C. The micrococcal nuclease was inactivated by adding EGTA, pH 8.0 to a final concentration of 20 mM. The cytoplasmic lysate was further spun at 11000 xg for 7 min at 4°C to obtain a supernatant depleted of endogenous P-bodies. This supernatant containing the GFP-LSM14A soluble protein, called cell free extract, was quantified by the Coomassie protein assay (Thermo Scientific).

In vitro reconstitution assay of P-body like granules

To reconstitute P-body like granules, 1 µg of purified CBP-DDX6-HIS protein was added to 200 µg of cell free extract, mixed or not with RNA, in a 100 µL reaction volume. After 2 hr on ice, 90 µL of the reactions were run through a MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec). Particles were detected according to their Forward-scattered light (FSC) and their green fluorescence using the 488 nm excitation laser and counted in the total volume. We have previously reported that in HeLa cells, 15 µg proteins (corresponding to 53,000 cells) contain 8.6 ng DDX6, and that DDX6 concentration is 0.56 mM in PBs and 3.3 µM in cells (170-fold less) (*Ernoul-Lange et al., 2012*). In the assay, CBP-DDX6-HIS concentration is 0.17 µM (1 µg in 100 µL, 61 kDa), and therefore about 20 fold less concentrated than in a cell, while the cell content (15 µg/53000 cells, 1000 µm³/cell, leading to 200 µg/0.7 µL) is diluted about 100 fold (200 µg in 100 µL).

For imaging experiments, the reactions were centrifuged at 11000 xg for 7 min at 4°C, resuspended in 5 µL of Mowiol (PolySciences) mounting medium, mixed by vortexing and mounted between glass slide and coverslip. Microscopy was performed on a Leica DMR microscope (Leica) using a 63 × 1.32 oil-immersion objective. Photographs were taken using a Micromax CCD camera

(Princeton Scientific Instruments) driven by MetaMorph software (Molecular Devices). Images were processed with NIH ImageJ software.

smiFISH experiments

Cells transfected for 24 hr with hRluc-GFP-GC-rich or Rluc-GFP-AU-rich plasmids were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at RT and permeabilized in 70% ethanol overnight at 4°C. The sets of transcript-specific probes (**Supplementary file 2**) and the secondary Cy3 FLAP probe were designed, purchased and hybridized as previously described (**Tsanov et al., 2016**). Of note, none of the AU-rich probes and only 7 out of the 24 GC-rich probes hybridize to the GFP-LSM14A transcripts, resulting in either no signal or a faint signal which was easy to discriminate from the Rluc-GFP mRNA signal. Cells were further processed for immunostaining using rabbit polyclonal anti-DDX6 (1:2000; Novus Biological) and goat anti-rabbit Alexa Fluor 350 (1:300, Thermofisher) antibodies. Epifluorescence microscopy was performed on an inverted Zeiss Z1 microscope equipped with a motorized stage using a 63 × 1.32 oil immersion objective. Images were processed with Icy software.

Luciferase reporter assay

Cells transfected for 24 hr with Firefly control plasmid and hRluc-GFP-GC-rich or Rluc-GFP-AU-rich plasmids were harvested and processed for RNA (4/5) and protein (1/5) luciferase quantification. Total RNA was purified using Trizol (Invitrogen) and DNase-treated (Turbo DNase, Invitrogen). qRT-PCR was carried out as described in the corresponding section, and Renilla mRNA levels were normalized to the Firefly control. Luciferase protein assay was performed with the Dual Glo Luciferase assay kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. Relative light determinations were measured in a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold).

Western blot analysis

Total cell lysates were obtained as described previously (**Courel et al., 2006**). Proteins were separated on SDS-PAGE on 4–12% polyacrylamide gel (NuPage, Invitrogen) and transferred onto nitrocellulose membrane (PerkinElmer, France). After blocking in 5% (w/v) nonfat dry milk in PBS for 30 min at RT, the membrane was incubated for 1 hr at 37°C with primary antibodies. After washing in PBS containing 0.05% (v/v) tween-20, blots were incubated for 40 min at RT with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit antibody (1:10000; Jackson ImmunoResearch Laboratories). Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence detection of peroxidase activity (SuperSignal West Pico, Pierce) and exposure to CL-XPosure film (Pierce). Protein expression was evaluated by densitometry (NIH ImageJ).

For the shRNA XRN1 experiment, proteins were isolated using RIPA buffer with Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific), precipitated with acetone and separated on Tris-Acetate 3–8% polyacrylamide gel (NuPage, Invitrogen) before transfer to nitrocellulose membrane (GE Healthcare). After blocking with 5% (w/v) nonfat dry milk in TBST for 30 min at RT the membrane was incubated for 1 hr at RT or o/n at 4°C with primary antibodies. After washing in TBST, blots were subsequently incubated for 1 hr at RT with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-rabbit/mouse antibodies (1:10000; Sigma). Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence detection of peroxidase activity (SuperSignal West Dura, Pierce) and imaged using ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare). Protein expression was evaluated by densitometry (NIH ImageJ).

Primary antibodies were: rabbit polyclonal anti-DDX6 (1:15000; Novus Biological), rabbit polyclonal anti-ribosomal S6 (1:5000; Cell Signaling Technology), rabbit polyclonal anti-XRN1 (1:1000, Bethyl Laboratories, and 1:5000 Novus Bioscience), rabbit polyclonal anti-Pol II (1:100, Santa Cruz), mouse monoclonal anti-tubulin (1:30000, Sigma-Aldrich). *q-RT-PCR analysis* Total RNA (1 µg) was reverse transcribed for 1 hr at 50°C using the SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) with 1 µg random primers (Promega). Reverse primers for Firefly and Renilla luciferases were also added for the luciferase reporter assay. No amplification was detected in negative controls omitting the reverse transcriptase. qPCR amplifications (12 µl) were done in duplicates using 1 µl of cDNA and the GoTaq Probe 2X Master Mix (Promega) on a LightCycler 480 (Roche), programmed as follows: 5 min, 95°C; 40 cycles [10 s, 95°C; 15 s, 60°C; 10 s, 72°C]. A last step (5 min progressive

95°C to 72°C) calculating the qPCR product T_m allowed for reaction specificity check. Primers for ACTB, APP, BACE1, LSM14A, LSM14B, MFN2, PNRC1, TIMP2, TRIB1, HPRT1, REN-low-GC, REN-high-GC and FIREfly were either gifts from R. Blaise or designed using the Primer three software (*Untergasser et al., 2012*). The results were normalized using either HPRT1 or FIREfly.

Library preparation and RNA-Seq data processing

For polysome profiling after DDX6 silencing and transcriptome after PAT1B silencing in HEK293 cells, rRNA was depleted using the Ribo-Zero kit Human/Mouse/Rat (Epicentre), and libraries were prepared using random priming. Triplicate and duplicate libraries were generated from three and two independent experiments, respectively, and processed as detailed previously (*Hubstenberger et al., 2017; Vindry et al., 2017*).

For the transcriptome after XRN1 silencing in HeLa cells, libraries were prepared from 500 ng of total RNAs and oligo(dT) primed using TruSeq Stranded Total RNA kit (Illumina) with two technical replicates for each sample. Libraries were then quantified with KAPA Library Quantification kit (Kapa Biosystems) and pooled. 4 nM of this pool were loaded on a high output flowcell and sequenced on a NextSeq500 platform (Illumina) with 2 × 75 nt paired-end chemistry.

For the shRNA XRN1 experiment RNA was isolated using Quiazol and miRNeasy Mini Kit (Qiagen), next subjected to DNase treatment (Qiagen) and quality control with Bioanalyzer. The rRNA was removed using rRNA Removal Mix. Libraries were prepared from 1 µg of RNA following TruSeq Stranded Total RNA kit (Illumina) with two technical replicates for each sample. 100nt paired-end RNA-Seq was performed on HiSeq - Rapid Run (Illumina). The results were aligned using hg19 genome and DESeq2, with standard settings, was used for determining FC and p-values.

For PB enrichment, libraries were prepared without prior elimination of rRNA and using random priming. Triplicate libraries were generated from three independent experiments and processed using the same pipeline as for DDX6 silencing (*Hubstenberger et al., 2017*).

For the transcriptome after induction of a stably transfected DDX6 shRNA for 48 hr in K562 cells, the .fastq files from experiments ENCSR119QWQ (DDX6 shRNA) and ENCSR913CAE (control shRNA) were processed according to the same pipeline as DDX6 silencing, except that the control and DDX6 shRNA experiments were not paired to compute the corrected p-values of RNA differential expression in EdgeR_3.6.2.

The ENCODE dataset of mRNAs clipped to DDX6 in K562 cells was generated using ENCODE .bam files aligned on the hg19 genome corresponding to (i) the DDX6 eClip experiment ENCSR893EFU, and (ii) the total RNA-seq of K562 experiment ENCSR109IQO. The enrichment in the CLIP dataset compared to the total RNA sample was calculated as in the DDX6 shRNA experiment.

Bioinformatic analysis

Briefly, the read coverage was computed as follows. Raw reads were processed using trimmomatics. Alignment was performed on the longest transcript isoforms of Ensembl annotated genes with bowtie2 aligner. Isoforms shorter than 500 nucleotides were not considered. Only unique mapped reads were qualified for counting. Each transcript was subdivided in 20 bins from transcription start site (TSS) to transcript end site (TES) and the proportion of reads for each bin was computed. For the metagene analysis, the average distribution of reads along transcript length was computed so that each gene had the same weight independently of its expression level.

The protein yield was calculated as the ratio between protein abundance in HEK293 cells, taken from *Geiger et al. (2012)*, and mRNA abundance in HEK293 cells, taken from the control sample of our DDX6 polysome profiling experiment. The translation rate was defined as the polysomal to total mRNA ratio, since polysome accumulation can result from both regulated translation and a change in total RNA without altered translation.

For GC profiling of the transcripts in various organisms (*Figure 7—figure supplement 1*), transcripts were downloaded from ENSEMBL (version 92) with their associated gene GC content.

Boxplot representations and statistical tests were performed using the GraphPad Prism software (GraphPad software, Inc) and the R suite (<https://www.R-project.org>) (R Core Team 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). We chose to systematically use the Spearman correlation in the interest of consistency, since the variables under consideration showed both nearly linear (e.g. accumulation in PBs and GC

content of the mRNA) and non-linear (e.g. accumulation in PBs and mRNA length) relationships. Statistical tests for differences between Spearman correlation coefficients were performed using the R package *cocor* and the 'meng1992' test. Partial correlations were computed using the *ppcor* package. Other graphical representations were generated using Excel and the Excel Analysis ToolPak (Microsoft). Hierarchical clustering of all transcripts in **Figure 4E** was performed using the Cluster 3.0/Treeview softwares (Kendall's tau distance, average linkage, *de Hoon et al., 2004*). Heatmap representation of the targets of the various regulators in **Figure 5B and D** was performed online using Morpheus (<https://software.broadinstitute.org/morpheus>).

Gene meiotic recombination rates were computed as crossover rates between gene start and gene end using the genetic map from the HapMap project (*Frazer et al., 2007*). Rates were computed as the weighted average of crossover rates of chromosomal regions that overlap the window.

The enrichment of the GO SLIM categories of cellular component in AU-rich mRNA excluded from PB (Input database: 881 gene IDs, 558 annotated in GO categories) was assessed using the WebGestalt enrichment analysis web tool (*Liao et al., 2019*).

Datasets used in the bioinformatics analysis

The following datasets were downloaded from the supplementary material of the corresponding papers: 1) For mRNAs containing cis-regulatory motifs: (i) in silico identification: AREs (*Halees et al., 2008*); (ii) experimental determination: CPEs (*Piqué et al., 2008*), G4-containing (*Huppert et al., 2008*) and TOP mRNAs (*Thoreen et al., 2012*). G4-containing genes were restricted to those harboring a G4 in 5'UTR. 2) For RBP targets: (i) PARE in HeLa cells: SMG6 (mRNAs actually cleaved by SMG6) (*Schmidt et al., 2015*) (ii) CLIP in HEK293 cells: HuR and TTP (*Mukherjee et al., 2011; Mukherjee et al., 2014*); (iii) CLIP in HeLa cells: YTHDF2 (*Wang et al., 2014*); (iv) RIP-CHIP in HeLa cells: PUM1 (*Galgano et al., 2008*); (v) RIP-CHIP in mouse neurons: 4E-T (*Yang et al., 2014*). In the case of HuR, the transcripts clipped only in 5'UTR/CDS/introns were removed, and the target list was restricted to transcripts clipped more than once. In the case of TTP, the transcripts clipped only in introns were removed.

For other RBP targets (ATXN2, MOV10, IGF2BP1-3, PUM2, FMR1, FXR1-2, AGO1-4, YTHDF2), CLIP data from different laboratories were previously processed through the same pipeline in the CLIPdb 1.0 database using the Piranha method (*Yang et al., 2015*). We retained those performed in epithelial cells (HeLa, HEK293, HEK293T). Moreover, when replicates were available, we selected the RNA-protein interactions detected in at least 50% of the replicates. Except for FXR1-2 targets, we determined whether protein-RNA interactions occurred in UTR or CDS by intersecting coordinates of the read peaks with the v19 gencode annotation, and we removed the transcripts clipped in their CDS.

For miRNA targets, we extracted the list of all experimentally documented targets from miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) (*Hsu et al., 2014*), and selected the targets of the 22 miRNAs of interest.

Acknowledgements

We thank Marina Pinskaya and Marc Gabriel for scientific discussions and technical assistance. We also thank Virginie Magnone, Kevin Lebrigand (NGS platform, UCA Genomix), Sylvain Baulande, Patricia Legoix-Né, Virginie Raynal (NGS platform, Institut Curie), Nathalie Campo (LMGM, Toulouse) and Régis Blaise (IBPS, Paris).

Additional information

Funding

Funder	Grant reference number	Author
Association pour la Recherche sur le Cancer	Subvention Fixe	Dominique Weil
Agence Nationale de la Recherche	ANR-14-CE09-0013-01	Dominique Weil

European Research Council	DARK consolidator grant	Antonin Morillon
Agence Nationale de la Recherche	ANR-11-LABX-0028-01	Antonin Morillon
Canceropôle PACA		Patrick Brest
Biotechnology and Biological Sciences Research Council		Nancy Standart
Isaac Newton Trust		Nancy Standart
Fondation Philippe Wiener - Maurice Anspach		Nancy Standart

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Author contributions

Maité Courel, Marianne Bénard, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review and editing; Yves Clément, Dominika Foretek, Olivia Vidal Cruchez, Michèle Ernoult-Lange, Conceptualization, Formal analysis, Validation, Investigation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review and editing; Clémentine Bossevain, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review and editing; Zhou Yi, Conceptualization, Software, Formal analysis, Validation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review and editing; Marie-Noëlle Benassy, Formal analysis, Validation, Investigation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review and editing; Michel Kress, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Validation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review and editing; Caroline Vindry, Conceptualization, Formal analysis, Validation, Investigation, Writing - original draft, Writing - review and editing; Christophe Antoniewski, Conceptualization, Resources, Formal analysis, Writing - original draft, Writing - review and editing; Antonin Morillon, Patrick Brest, Nancy Standart, Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Writing - original draft, Writing - review and editing; Arnaud Hubstenberger, Conceptualization, Supervision, Writing - original draft, Writing - review and editing; Hugues Roest Crollius, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Writing - original draft, Writing - review and editing; Dominique Weil, Conceptualization, Formal analysis, Supervision, Funding acquisition, Validation, Investigation, Visualization, Writing - original draft, Project administration, Writing - review and editing

Author ORCIDs

Yves Clément  <http://orcid.org/0000-0002-5932-9412>

Christophe Antoniewski  <http://orcid.org/0000-0001-7709-2116>

Antonin Morillon  <http://orcid.org/0000-0002-0575-5264>

Hugues Roest Crollius  <http://orcid.org/0000-0002-8209-173X>

Dominique Weil  <https://orcid.org/0000-0001-7630-1772>

Decision letter and Author response

Decision letter <https://doi.org/10.7554/eLife.49708.sa1>

Author response <https://doi.org/10.7554/eLife.49708.sa2>

Additional files

Supplementary files

- Supplementary file 1. Transcriptome datasets. Sheet1: polysome profiling after siDDX6 in HEK293 cells. Sheet2: transcriptome after shDDX6 in K562 cells. Sheet3: DDX6 CLIP in K562 cells. Sheet4: transcriptome after siXRN1 in HeLa cells. Sheet5: transcriptome after shXRN1 in HCT116 cells. Sheet6: transcriptome after siPAT1B in HEK293 cells.
- Supplementary file 2. SmiFISH probes sets. Sheet1: AU-rich probes Sheet2: GC-rich probes.
- Transparent reporting form

Data availability

RNA-Seq gene data have been deposited in SRA under accession codes E-MTAB-4091 for the poly-some profiling after DDX6 silencing, E-MTAB-5577 for the transcriptome after PAT1B silencing, and E-MTAB-5477 for the PB transcriptome, all in HEK293 cells. RNA-Seq gene data have been deposited in GEO under accession codes GSE115471 and GSE114605 for the transcriptome after XRN1 silencing in HeLa and HCT116 cells, respectively. ENCODE datasets are available at <https://www.encodeproject.org> under accession codes ENCSR893EFU for the DDX6 eClip experiment, and ENCSR109IQO for the transcriptome after DDX6 silencing in K562 cells. All data generated or analyzed during this study are included in Supplementary file 1.

The following datasets were generated:

Author(s)	Year	Dataset title	Dataset URL	Database and Identifier
Courel M, Weil D	2017	Large-scale study of total and polysomal mRNA after DDX6 depletion in HEK293 cells	https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-4091/	ArrayExpress, E-MTAB-4091
Vindry C	2017	RNA-seq of HEK293T cells treated with control b-globin siRNA and Pat1b siRNA	https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-5577/	ArrayExpress, E-MTAB-5577
Hubstenberger A	2017	RNA-Seq of purified P-bodies from HEK293 cells	https://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-MTAB-5477/	ArrayExpress, E-MTAB-5477

References

- Ayache J**, Bénard M, Ernoult-Lange M, Minshall N, Standart N, Kress M, Weil D. 2015. P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Molecular Biology of the Cell* **26**: 2579–2595. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-03-0136>, PMID: 25995375
- Balak C**, Benard M, Schaefer E, Iqbal S, Ramsey K, Ernoult-Lange M, Mattioli F, Llaci L, Geoffroy V, Courel M, Naymik M, Bachman KK, Pfundt R, Rump P, Ter Beest J, Wentzensen IM, Monaghan KG, McWalter K, Richholt R, Le Béche A, et al. 2019. Rare de novo missense variants in RNA helicase DDX6 cause intellectual disability and dysmorphic features and lead to P-Body defects and RNA dysregulation. *The American Journal of Human Genetics* **105**:509–525. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.07.010>, PMID: 31422817
- Barbee SA**, Estes PS, Cziko AM, Hillebrand J, Luedeman RA, Collier JM, Johnson N, Howlett IC, Geng C, Ueda R, Brand AH, Newbury SF, Wilhelm JE, Levine RB, Nakamura A, Parker R, Ramaswami M. 2006. Staufin- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* **52**:997–1009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.10.028>, PMID: 17178403
- Bashkirov VI**, Scherthan H, Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD. 1997. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *The Journal of Cell Biology* **136**:761–773. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.136.4.761>, PMID: 9049243
- Bazzini AA**, Del Viso F, Moreno-Mateos MA, Johnstone TG, Vejnar CE, Qin Y, Yao J, Khokha MK, Giraldez AJ. 2016. Codon identity regulates mRNA stability and translation efficiency during the maternal-to-zygotic transition. *The EMBO Journal* **35**:2087–2103. DOI: <https://doi.org/10.15252/emboj.201694699>, PMID: 27436874
- Bhattacharyya SN**, Habermacher R, Martine U, Closs EI, Filipowicz W. 2006. Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**:1111–1124. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.031>, PMID: 16777601
- Bish R**, Cuevas-Polo N, Cheng Z, Hambarzumyan D, Munschauer M, Landthaler M, Vogel C. 2015. Comprehensive protein interactome analysis of a key RNA helicase: detection of novel stress granule proteins. *Biomolecules* **5**:1441–1466. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom5031441>, PMID: 26184334
- Blaise R**, Mateo V, Rouxel C, Zaccarini F, Glorian M, Bérézat G, Golubkov VS, Limon I. 2012. Wild-type amyloid beta 1-40 peptide induces vascular smooth muscle cell death independently from matrix metalloprotease activity. *Aging Cell* **11**:384–393. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00797.x>, PMID: 22260497
- Bonnerot C**, Boeck R, Lapeyre B. 2000. The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. *Molecular and Cellular Biology* **20**:5939–5946. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.20.16.5939-5946.2000>, PMID: 10913177
- Bouveret E**, Rigaut G, Shevchenko A, Wilm M, Séraphin B. 2000. A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *The EMBO Journal* **19**:1661–1671. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1661>, PMID: 10747033
- Braun JE**, Tritschler F, Haas G, Igraja C, Truffault V, Weichenrieder O, Izaurralde E. 2010. The C-terminal alpha-alpha superhelix of pat is required for mRNA decapping in metazoa. *The EMBO Journal* **29**:2368–2380. DOI: <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.124>, PMID: 20543818

- Chan LY, Mugler CF, Heinrich S, Vallotton P, Weis K. 2018. Non-invasive measurement of mRNA decay reveals translation initiation as the major determinant of mRNA stability. *eLife* **7**:e32536. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.32536>, PMID: 30192227
- Chen Y, Boland A, Kuzuoğlu-Öztürk D, Bawankar P, Loh B, Chang CT, Weichenrieder O, Izaurralde E. 2014. A DDX6-CNOT1 complex and W-binding pockets in CNOT9 reveal direct links between miRNA target recognition and silencing. *Molecular Cell* **54**:737–750. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.034>, PMID: 24768540
- Chu CY, Rana TM. 2006. Translation repression in human cells by MicroRNA-Induced gene silencing requires RCK/p54. *PLOS Biology* **4**:e210. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040210>, PMID: 16756390
- Coller J, Parker R. 2005. General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**:875–886. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.012>, PMID: 16179257
- Colombo M, Karousis ED, Bourquin J, Bruggmann R, Mühlemann O. 2017. Transcriptome-wide identification of NMD-targeted human mRNAs reveals extensive redundancy between SMG6- and SMG7-mediated degradation pathways. *RNA* **23**:189–201. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.059055.116>, PMID: 27864472
- Courel M, Rodemer C, Nguyen ST, Pance A, Jackson AP, O'connor DT, Taupenot L. 2006. Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *The Journal of Biological Chemistry* **281**:38038–38051. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M604037200>, PMID: 17032650
- de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. 2004. Open source clustering software. *Bioinformatics* **20**:1453–1454. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth078>, PMID: 14871861
- Duret L, Semon M, Piganeau G, Mouchiroud D, Galtier N. 2002. Vanishing GC-rich isochores in mammalian genomes. *Genetics* **162**:1837–1847. PMID: 12524353
- Duret L, Galtier N. 2009. Biased gene conversion and the evolution of mammalian genomic landscapes. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **10**:285–311. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-082908-150001>, PMID: 19630562
- ENCODE Project Consortium. 2012. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**:57–74. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11247>, PMID: 22955616
- Ernault-Lange M, Wilczynska A, Harper M, Aigueperse C, Dautry F, Kress M, Weil D. 2009. Nucleocytoplasmic traffic of CPEB1 and accumulation in Crm1 nucleolar bodies. *Molecular Biology of the Cell* **20**:176–187. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0904>, PMID: 18923137
- Ernault-Lange M, Baconnais S, Harper M, Minshall N, Souquere S, Boudier T, Bénard M, Andrey P, Pierron G, Kress M, Standart N, le Cam E, Weil D. 2012. Multiple binding of repressed mRNAs by the P-body protein rck/p54. *RNA* **18**:1702–1715. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.034314.112>, PMID: 22836354
- Evans ME, Clark WC, Zheng G, Pan T. 2017. Determination of tRNA aminoacylation levels by high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research* **45**:e133. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx514>, PMID: 28586482
- Ferraiuolo MA, Basak S, Dostie J, Murray EL, Schoenberg DR, Sonenberg N. 2005. A role for the eIF4E-binding protein 4E-T in P-body formation and mRNA decay. *The Journal of Cell Biology* **170**:913–924. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200504039>, PMID: 16157702
- Franks TM, Lykke-Andersen J. 2007. TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes & Development* **21**:719–735. DOI: <https://doi.org/10.1101/gad.1494707>, PMID: 17369404
- Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, et al. 2007. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* **449**:851–861. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature06258>, PMID: 17943122
- Freimer JW, Hu TJ, Blelloch R. 2018. Decoupling the impact of microRNAs on translational repression versus RNA degradation in embryonic stem cells. *eLife* **7**:e38014. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.38014>, PMID: 30044225
- Galgano A, Forrer M, Jaskiewicz L, Kanitz A, Zavolan M, Gerber AP. 2008. Comparative analysis of mRNA targets for human PUF-family proteins suggests extensive interaction with the miRNA regulatory system. *PLOS ONE* **3**:e3164. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003164>, PMID: 18776931
- Geiger T, Wehner A, Schaab C, Cox J, Mann M. 2012. Comparative proteomic analysis of eleven common cell lines reveals ubiquitous but varying expression of most proteins. *Molecular & Cellular Proteomics* **11**:M111.014050. DOI: <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.014050>, PMID: 22278370
- Gingold H, Tehler D, Christoffersen NR, Nielsen MM, Asmar F, Kooistra SM, Christophersen NS, Christensen LL, Borre M, Sørensen KD, Andersen LD, Andersen CL, Hulleman E, Wurdinger T, Ralfkiær E, Helin K, Grønbaek K, Ørntoft T, Waszak SM, Dahan O, et al. 2014. A dual program for translation regulation in cellular proliferation and differentiation. *Cell* **158**:1281–1292. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.011>, PMID: 25215487
- Götze M, Dufourt J, Ihling C, Rammelt C, Pierson S, Sambrani N, Temme C, Sinz A, Simonelig M, Wahle E. 2017. Translational repression of the *Drosophila* Nanos mRNA involves the RNA helicase Belle and RNA coating by Me31B and Trailer hitch. *RNA* **23**:1552–1568. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.062208.117>, PMID: 28701521
- Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M, Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T. 2010. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**:129–141. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.03.009>, PMID: 20371350

- Halees AS**, El-Badrawi R, Khabar KS. 2008. ARED organism: expansion of ARED reveals AU-rich element cluster variations between human and mouse. *Nucleic Acids Research* **36**:D137–D140. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm959>, PMID: 17984078
- He F**, Celik A, Wu C, Jacobson A. 2018. General decapping activators target different subsets of inefficiently translated mRNAs. *eLife* **7**:e34409. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34409>, PMID: 30520724
- Hentze MW**, Castello A, Schwarzl T, Preiss T. 2018. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **19**:327–341. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.130>, PMID: 29339797
- Horvathova I**, Voigt F, Kotrys AV, Zhan Y, Artus-Revel CG, Eglinger J, Stadler MB, Giorgetti L, Chao JA. 2017. The dynamics of mRNA turnover revealed by Single-Molecule imaging in single cells. *Molecular Cell* **68**:615–625. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.030>, PMID: 29056324
- Hsu SD**, Tseng YT, Shrestha S, Lin YL, Khaleel A, Chou CH, Chu CF, Huang HY, Lin CM, Ho SY, Jian TY, Lin FM, Chang TH, Weng SL, Liao KW, Liao IE, Liu CC, Huang HD. 2014. miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research* **42**:D78–D85. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1266>, PMID: 24304892
- Huang N**, Lee I, Marcotte EM, Hurler ME. 2010. Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. *PLoS Genetics* **6**:e1001154. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001154>, PMID: 20976243
- Hubstenberger A**, Courel M, Bénard M, Souquere S, Ernout-Lange M, Chouaib R, Yi Z, Morlot JB, Munier A, Fradet M, Daunesse M, Bertrand E, Pierron G, Mozziconacci J, Kress M, Weil D. 2017. P-Body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons. *Molecular Cell* **68**:144–157. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.003>, PMID: 28965817
- Huppert JL**, Bugaut A, Kumari S, Balasubramanian S. 2008. G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Research* **36**:6260–6268. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn511>, PMID: 18832370
- Imamachi N**, Salam KA, Suzuki Y, Akimitsu N. 2017. A GC-rich sequence feature in the 3' UTR directs UPF1-dependent mRNA decay in mammalian cells. *Genome Research* **27**:407–418. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.206060.116>, PMID: 27940950
- Kamenska A**, Lu WT, Kubacka D, Broomhead H, Minshall N, Bushell M, Standart N. 2014. Human 4E-T represses translation of bound mRNAs and enhances microRNA-mediated silencing. *Nucleic Acids Research* **42**:3298–3313. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1265>, PMID: 24335285
- Kamenska A**, Simpson C, Vindry C, Broomhead H, Bénard M, Ernout-Lange M, Lee BP, Harries LW, Weil D, Standart N. 2016. The DDX6-4E-T interaction mediates translational repression and P-body assembly. *Nucleic Acids Research* **44**:6318–6334. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw565>, PMID: 27342281
- Khong A**, Matheny T, Jain S, Mitchell SF, Wheeler JR, Parker R. 2017. The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules. *Molecular Cell* **68**:808–820. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.015>, PMID: 29129640
- Labno A**, Tomecki R, Dziembowski A. 2016. Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**:3125–3147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.023>, PMID: 27713097
- Lebedeva S**, Jens M, Theil K, Schwanhäusser B, Selbach M, Landthaler M, Rajewsky N. 2011. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Molecular Cell* **43**:340–352. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.008>, PMID: 21723171
- Liao Y**, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. 2019. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Research* **47**:W199–W205. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz401>, PMID: 31114916
- Liu J**, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology* **7**:719–723. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncb1274>, PMID: 15937477
- Martin B**, Granadel C, Campo N, Hénard V, Prudhomme M, Claverys JP. 2010. Expression and maintenance of ComD-ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **75**:1513–1528. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07071.x>, PMID: 20180906
- Mathys H**, Basquin J, Ozgur S, Czarnocki-Cieciura M, Bonneau F, Aartse A, Dziembowski A, Nowotny M, Conti E, Filipowicz W. 2014. Structural and biochemical insights to the role of the CCR4-NOT complex and DDX6 ATPase in microRNA repression. *Molecular Cell* **54**:751–765. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.036>, PMID: 24768538
- Minshall N**, Reiter MH, Weil D, Standart N. 2007. CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early xenopus oocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **282**:37389–37401. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M704629200>, PMID: 17942399
- Minshall N**, Kress M, Weil D, Standart N. 2009. Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly. *Molecular Biology of the Cell* **20**:2464–2472. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-01-0035>, PMID: 19297524
- Mitchell SF**, Jain S, She M, Parker R. 2013. Global analysis of yeast mRNPs. *Nature Structural & Molecular Biology* **20**:127–133. DOI: <https://doi.org/10.1038/nsmb.2468>, PMID: 23222640
- Mukherjee N**, Corcoran DL, Nusbaum JD, Reid DW, Georgiev S, Hafner M, Ascano M, Tuschl T, Ohler U, Keene JD. 2011. Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Molecular Cell* **43**:327–339. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.06.007>, PMID: 21723170

- Mukherjee N**, Jacobs NC, Hafner M, Kennington EA, Nusbaum JD, Tuschl T, Blackshear PJ, Ohler U. 2014. Global target mRNA specification and regulation by the RNA-binding protein ZFP36. *Genome Biology* **15**:R12. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-1-r12>, PMID: 24401661
- Nissan T**, Rajyaguru P, She M, Song H, Parker R. 2010. Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Molecular Cell* **39**:773–783. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.025>, PMID: 20832728
- Nonhoff U**, Ralser M, Welzel F, Piccini I, Balzereit D, Yaspo ML, Lehrach H, Krobitsch S. 2007. Ataxin-2 interacts with the DEAD/H-box RNA helicase DDX6 and interferes with P-bodies and stress granules. *Molecular Biology of the Cell* **18**:1385–1396. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-12-1120>, PMID: 17392519
- Novoa EM**, Ribas de Pouplana L. 2012. Speeding with control: codon usage, tRNAs, and ribosomes. *Trends in Genetics* **28**:574–581. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.07.006>, PMID: 22921354
- Ozgur S**, Chekulaeva M, Stoecklin G. 2010. Human Pat1b connects deadenylation with mRNA decapping and controls the assembly of processing bodies. *Molecular and Cellular Biology* **30**:4308–4323. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.00429-10>, PMID: 20584987
- Ozgur S**, Basquin J, Kamenska A, Filipowicz W, Standart N, Conti E. 2015. Structure of a human 4E-T/DDX6/CNOT1 complex reveals the different interplay of DDX6-Binding proteins with the CCR4-NOT complex. *Cell Reports* **13**:703–711. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.033>, PMID: 26489469
- Pashler AL**, Towler BP, Jones CI, Newbury SF. 2016. The roles of the exoribonucleases DIS3L2 and XRN1 in human disease. *Biochemical Society Transactions* **44**:1377–1384. DOI: <https://doi.org/10.1042/BST20160107>, PMID: 27911720
- Piqué M**, López JM, Foissac S, Guigó R, Méndez R. 2008. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell* **132**:434–448. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.038>, PMID: 18267074
- Radhakrishnan A**, Chen YH, Martin S, Alhusaini N, Green R, Collier J. 2016. The DEAD-Box protein Dhh1p couples mRNA decay and translation by monitoring Codon optimality. *Cell* **167**:122–132. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.053>, PMID: 27641505
- Rudolph KL**, Schmitt BM, Villar D, White RJ, Marioni JC, Kutter C, Odom DT. 2016. Codon-Driven translational efficiency is stable across diverse mammalian cell states. *PLOS Genetics* **12**:e1006024. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006024>, PMID: 27166679
- Schmidt SA**, Foley PL, Jeong DH, Rymarquis LA, Doyle F, Tenenbaum SA, Belasco JG, Green PJ. 2015. Identification of SMG6 cleavage sites and a preferred RNA cleavage motif by global analysis of endogenous NMD targets in human cells. *Nucleic Acids Research* **43**:309–323. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1258>, PMID: 25429978
- Serman A**, Le Roy F, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D. 2007. GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Research* **35**:4715–4727. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm491>, PMID: 17604308
- Standart N**, Minshall N. 2008. Translational control in early development: cpeb, P-bodies and germinal granules. *Biochemical Society Transactions* **36**:671–676. DOI: <https://doi.org/10.1042/BST0360671>, PMID: 18631138
- Standart N**, Weil D. 2018. P-Bodies: cytosolic droplets for coordinated mRNA storage. *Trends in Genetics* **34**:612–626. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.005>, PMID: 29908710
- Steinberg J**, Honti F, Meader S, Webber C. 2015. Haploinsufficiency predictions without study Bias. *Nucleic Acids Research* **43**:e101. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv474>, PMID: 26001969
- Tesina P**, Heckel E, Cheng J, Fromont-Racine M, Buschauer R, Kater L, Beatrix B, Berninghausen O, Jacquier A, Becker T, Beckmann R. 2019. Structure of the 80S ribosome-Xrn1 nuclease complex. *Nature Structural & Molecular Biology* **26**:275–280. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0202-5>, PMID: 30911188
- Thoreen CC**, Chantranupong L, Keys HR, Wang T, Gray NS, Sabatini DM. 2012. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**:109–113. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11083>, PMID: 22552098
- Totaro A**, Renzi F, La Fata G, Mattioli C, Raabe M, Urlaub H, Achsel T. 2011. The human Pat1b protein: a novel mRNA deadenylation factor identified by a new immunoprecipitation technique. *Nucleic Acids Research* **39**:635–647. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkq797>, PMID: 20852261
- Tsanov N**, Samacoits A, Chouaib R, Traboulsi AM, Gostan T, Weber C, Zimmer C, Zibara K, Walter T, Peter M, Bertrand E, Mueller F. 2016. smiFISH and FISH-quant - a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic Acids Research* **44**:e165. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw784>, PMID: 27599845
- Untergasser A**, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* **40**:e115. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>, PMID: 22730293
- Vindry C**, Marnef A, Broomhead H, Twyffels L, Ozgur S, Stoecklin G, Llorian M, Smith CW, Mata J, Weil D, Standart N. 2017. Dual RNA processing roles of Pat1b via cytoplasmic Lsm1-7 and nuclear Lsm2-8 complexes. *Cell Reports* **20**:1187–1200. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.091>, PMID: 28768202
- Vindry C**, Weil D, Standart N. 2019. Pat1 rna-binding proteins: multitasking shuttling proteins. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* **10**:e1557. DOI: <https://doi.org/10.1002/wrna.1557>, PMID: 31231973
- Wang X**, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C. 2014. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature* **505**:117–120. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature12730>, PMID: 24284625

- Wang M**, Ly M, Lugowski A, Laver JD, Lipshitz HD, Smibert CA, Rissland OS. 2017. ME31B globally represses maternal mRNAs by two distinct mechanisms during the *Drosophila* maternal-to-zygotic transition. *eLife* **6**: e27891. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.27891>, PMID: 28875934
- Wells ML**, Perera L, Blackshear PJ. 2017. An ancient family of RNA-Binding proteins: still important!. *Trends in Biochemical Sciences* **42**:285–296. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.12.003>, PMID: 28096055
- Yang G**, Smibert CA, Kaplan DR, Miller FD. 2014. An eIF4E1/4E-T complex determines the genesis of neurons from precursors by translationally repressing a proneurogenic transcription program. *Neuron* **84**:723–739. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.10.022>, PMID: 25456498
- Yang YC**, Di C, Hu B, Zhou M, Liu Y, Song N, Li Y, Umetsu J, Lu ZJ. 2015. CLIPdb: a CLIP-seq database for protein-RNA interactions. *BMC Genomics* **16**:51. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1273-2>, PMID: 25652745
- Yoon JH**, De S, Srikantan S, Abdelmohsen K, Grammatikakis I, Kim J, Kim KM, Noh JH, White EJ, Martindale JL, Yang X, Kang MJ, Wood WH, Noren Hooten N, Evans MK, Becker KG, Tripathi V, Prasanth KV, Wilson GM, Tuschl T, et al. 2014. PAR-CLIP analysis uncovers AUF1 impact on target RNA fate and genome integrity. *Nature Communications* **5**:5248. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms6248>, PMID: 25366541