



HAL
open science

Identification des substrats ARN de l'hélicase Ded1 et de son rôle biologique chez la levure

Hilal Yeter

► **To cite this version:**

Hilal Yeter. Identification des substrats ARN de l'hélicase Ded1 et de son rôle biologique chez la levure. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris sciences et lettres, 2021. Français. NNT : 2021UPSLT001 . tel-03810483

HAL Id: tel-03810483

<https://theses.hal.science/tel-03810483>

Submitted on 11 Oct 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
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Institut de Biologie Physico-Chimique

**Identification des substrats ARN de l'hélicase Ded1
et de son rôle biologique chez la levure**

Soutenue par

Hilal YETER-ALAT

Le 29 janvier 2021

Ecole doctorale n° 577

**Structure et Dynamique des
Systèmes Vivants**

Spécialité

**Sciences de la vie et de la
santé**

Composition du jury :

M. Vincent CROQUETTE
DR, ESPCI Paris - CNRS

Président

Mme Séverine MASSENET
CR, Université de Lorraine - CNRS

Rapportrice

M. Bruno SARGUEIL
DR, Université de Paris - CNRS

Rapporteur

Mme Naïma BELGAREH-TOUZE
CR, IBPC - CNRS

Examinatrice

Mme Micheline FROMONT-RACINE
DR, Institut Pasteur - CNRS

Examinatrice

M. N. Kyle TANNER
DR, IBPC - CNRS

Directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais commencer par remercier chaleureusement les membres de mon jury pour leur participation à ma soutenance de thèse. Je tiens à remercier en particulier le travail de mes deux rapporteurs Bruno Sargueil et Séverine Massenet, ainsi que mes examinateurs Vincent Croquette, Micheline Fromont-Racine et Naïma Belgareh-Touzé. C'est avec joie que je vous sou mets tout mon travail effectué lors de ma thèse.

Je continuerai ensuite par une anecdote qui m'a profondément marquée... C'était le 9 octobre 2015, j'avais rendez-vous à 14h à l'IBPC avec Kyle Tanner et Josette Banroques pour un poste d'ingénieur d'étude. Arrivée une heure à l'avance, je m'étais rendue dans un café italien, juste à côté du Panthéon. Je lisais... Tous mes rapports de stages, la thématique du laboratoire, les hélicases... Mais c'était quoi une hélicase ??? Tout ce que je savais c'est que j'allais anticiper. Au moment de l'entretien, le regard vide, j'observais Kyle en train de m'expliquer le projet avec un enthousiasme sans précédent. Je ne comprenais absolument rien... Non pas à la thématique, mais à l'accent de Kyle. Je devais vraiment avoir l'air perdue puisque Josette me traduisait le « franglais » de Kyle avec un grand sourire. C'était le 9 octobre... Le jour de mon anniversaire ... Aujourd'hui, c'est moi qui traduis son accent aux autres.

Je verse une petite larme en écrivant cette ligne. Je ne saurais comment vous remercier, Kyle et Josette, pour avoir créé cet environnement de famille au laboratoire, de m'avoir permis d'être à l'aise dans ma relation avec vous, mais aussi de m'avoir permis de mener à bien tout le projet... Un projet qui commençait à zéro. Un projet pas facile. Je n'imaginai pas encore les difficultés d'un nouveau projet, le temps que ça allait me prendre, les mises au point interminables... Mais comme le disait Axel Oxenstierna « *la patience est une vertu qui porte toujours sa récompense avec elle* ». Avec des hauts et des bas, j'ai pu acquérir une expertise dans plusieurs techniques. Je vous remercie de m'avoir permis d'encadrer des étudiants, et « une » en particulier pour son stage de Master 2. Merci d'avoir été là pour tout m'apprendre, patiemment... Même si j'avais (et que j'ai toujours d'ailleurs) cette « mauvaise » habitude de poser un million de questions et parfois les mêmes. Merci pour ce que vous avez pu apporter dans ma vie tant bien professionnelle que personnelle. Mes jours, semaines, années passées à l'IBPC avec vous étaient plus que géniaux ; même si, je tiens quand même à le préciser, j'ai fait toutes mes grandes découvertes à chaque fois que vous étiez en vacances, haha. Et je ne parle même pas des bêtises commises au labo...

Je sais que ça n'a pas été facile au début avec moi. J'ai eu beaucoup de mal à cerner et à m'adapter au projet. J'ai persévéré, je voulais absolument vous montrer que j'étais capable de le mener à bien. Et je pense que je l'ai montré lorsque j'ai gagné le prix du meilleur poster

au SifrARN 2018 à Nancy. Je n'oublierai jamais ce que tu m'as dit Kyle : « même moi je n'ai jamais gagné de prix, mais comment as-tu fait ? Je suis impressionné ! ». C'est ce jour que j'ai compris que j'étais sur la bonne voie.

Kyle... J'ai pu acquérir une indépendance sans précédent grâce à ta façon de me « coacher », qui au départ ne me plaisait pas du tout ! Mais aujourd'hui je t'en remercie. Je te remercie pour tout ce que tu m'as appris, tant scientifiquement que culturellement. J'aimais beaucoup polémiquer avec toi lorsque tu disais A et moi B, et surtout, te montrer que tu pouvais avoir tort (rarement, mais quand même !). J'ai réussi à devenir une vraie scientifique, à me poser les bonnes questions, à rédiger ... Merci. Tu assures !

Josette... Merci pour tout ce que tu m'as appris. Malgré les épisodes difficiles qui ont pu t'arriver, tu as toujours été présente, je t'en remercie et ça ne sera jamais assez. J'ai acquis un savoir sans précédent grâce à toi, et pas simplement dans le domaine scientifique. Merci pour ta sagesse et ta bienveillance... Merci beaucoup !

Molka... J'ai eu la chance de démarrer ma thèse en même temps que toi et surtout d'avoir connu une personne aussi formidable que toi. J'ai gagné une amitié, qui je l'espère, sera de très longue durée ! Nous avons eu la chance de nous soutenir mutuellement dans l'avancement de nos thèses, d'avoir des discussions scientifiques pour le bon avancement de nos projets qui évoluaient en parallèle. Grâce à toi j'ai pu prendre je ne sais combien de kilos à force de manger tout et n'importe quoi (comme les sushis ou kebab du coin). Mais ceci dit, je te souhaite quand même le meilleur pour la suite, tant au niveau professionnel que personnel.

Naïma, je ne sais pas par où commencer... Je t'ai connue lors de mon stage de master 1. Tu m'as initiée dans le monde du labo et je t'en remercie. J'ai beaucoup appris scientifiquement, mais aussi dans ta discipline de travail. Durant ma thèse, tu as accepté d'être ma tutrice et je t'en remercie. Et maintenant, tu fais partie de mon jury, tout ça pour te dire à quel point tu es une personne importante pour moi.

Emmeline, c'était un privilège de faire ma thèse à tes côtés. Merci pour tout le travail auquel tu as contribué dans ce projet. Mise à part la science, tu as toujours réussi à me faire rire (merci Snapchat). Merci pour ta disponibilité, tes blagues et ta bonne humeur ! J'en profite pour te remercier Valérie. Je venais souvent t'embêter sur des questions scientifiques qui au final déviaient sur des sujets « hors sujet ». Merci pour ta disponibilité et pour tes multiples conseils scientifiques. Merci aussi d'avoir lu l'introduction de ce manuscrit.

Stéphanie, « I would exprime my special thanks » même si je sais que tu comprends parfaitement bien la version « je voudrais spécialement te remercier ». C'était un vrai plaisir de partager mon bureau avec toi, toutes ces discussions scientifiques (ou pas) que nous avons pu avoir. Je remercie également Oznur (Güzellik !), Caroline, Nathalie, Maxence, Vincent, Marjorie, Zina et Assia dont la présence a été vitale pour supporter certaines journées.

De façon plus générale, je remercie tous les membres de l'unité EGM (UMR 8261), mais aussi les membres de l'IBPC, que j'ai pu côtoyer, avec qui j'ai pu rigoler et échanger sur un plan scientifique ou non.

Un grand merci à Marc Dreyfus, Harald Putzer, Ciarán Condon, Laurence Gauthier et sans oublier Francis-André Wollman pour leur grand soutien dans mon obtention de la bourse de thèse. Mille mercis pour votre confiance !

Je remercie du fond du cœur mes amies (mes M², mes Merve, mes merveilles), qui m'ont soutenue et ont cru en moi depuis le début.

Pour finir, je voudrais remercier mes parents, mes frères et surtout mon mari pour leur soutien immense tout au long de mes études et ma thèse.

Anne... Baba... Size ne kadar tesekkür etsem az. Basından beri bana inandınız, destek çıktınız, sorup sorgulamadan hep arkamda durdunuz. Buralara geldiysem bilin ki sizin sayenizde. İyi varsınız, seviyorum sizi <3

Ogün... Özgün... İyi varsınız, baslarda iyi dalga geçtiniz benimle, ama biliyorum ki bugün benimle gurur duyuyorsunuz, bende sizinle, iyi kardeşlerimsiniz, bu yolda beni yalnız bırakmadığınız için teşekkür ederim <3

Volkan... Basından beri bana destek çıktın, yaptığım işe saygı duydun ve herkeze ovdun, bana inandin, tezimde seninde katkin çok, tesekkür ederim... İyi varsin... İyi hayatimdasin <3

Résumé

L'hélicase à ARN à boîte DEAD, Ded1, est une protéine essentielle de levure impliquée dans l'initiation de la traduction. La protéine humaine DDX3 et des protéines appartenant à d'autres organismes complètent une souche de levure délétée pour le gène *DED1* endogène, démontrant un fort degré de conservation fonctionnelle. De plus, DDX3 est impliquée dans l'oncogenèse et la réplication virale. *In vitro*, la protéine Ded1 purifiée lie l'ARN en présence d'ATP et a une activité ATPase dépendante de l'ARN, mais elle manque de spécificité de substrat et de régulation enzymatique. Nous avons précédemment montré que Ded1 est un facteur associé au cap qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme et colocalise avec des foci cellulaires. Pour mieux comprendre le(s) rôle(s) de Ded1 dans la cellule, nous avons identifié les ARN qui lui sont associés. Pour cela, nous avons utilisé une technique de PAR-CLIP modifiée (réticulation et immunoprécipitation améliorées par un ribonucléoside photoactivable) qui utilise des UV longs (UV-A) car nous avons constaté que Ded1 est rapidement dégradée avec des UV courts (UV-C), classiquement utilisée, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats indiquent que Ded1 interagit préférentiellement avec un sous-ensemble d'ARNm et ne montrent aucune corrélation avec la longueur des UTR ou des régions codantes, ni avec l'abondance des transcrits. Ded1 interagit principalement avec certains ARNm codant pour des protéines impliquées dans la traduction. De plus, par des techniques de génétique de la levure, de localisation *in situ* et par les approches biochimiques *in vitro*, nous avons trouvé que Ded1 est associée et régulée par la particule de reconnaissance du signal (SRP), qui est un complexe ribonucléoprotéique universellement conservé nécessaire à la translocation co-traductionnelle des polypeptides dans la lumière du réticulum endoplasmique et la membrane. Nos résultats indiquent que Ded1 est physiquement associée aux composants de la SRP *in vivo* et *in vitro* et est génétiquement liée aux protéines de la SRP. Enfin, l'activité enzymatique de Ded1 est inhibée par la Srp21 en présence de l'ARN de la SRP, SCR1. Nous proposons un modèle où Ded1 participe activement à la translocation des protéines lors de la traduction et nous établissons une nouvelle compréhension du rôle cellulaire de Ded1 lors de l'étape de l'élongation de la traduction.

Mots clés :

Ded1/DDX3, hélicase, boîte DEAD, PAR-CLIP, SRP, ARN, traduction, régulation

Abstract

The DEAD-box RNA helicase Ded1 is an essential yeast protein involved in translation initiation. Mammalian DDX3 and related proteins from other organisms complement a yeast strain deleted for the endogenous *DED1* gene, which demonstrates a high degree of functional conservation. Moreover, DDX3 is implicated in oncogenesis and viral replication. *In vitro*, the purified Ded1 protein is an ATP-dependent RNA binding protein and an RNA-dependent ATPase, but it lacks RNA substrate specificity and enzymatic regulation. We have previously found that Ded1 is a cap-associated factor that actively shuttles between the nucleus and cytoplasm and colocalized with cellular foci. We studied the role(s) of Ded1 in the cell by characterizing its RNA substrates. For that, we used a modified PAR-CLIP (Photoactivable Ribonucleoside-enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation) technique that uses long UV light (UV-A) because we find that Ded1 is rapidly degraded, both *in vitro* and *in vivo*, with short UV light (UV-C) that is typically used. Our results indicate that Ded1 preferentially interacts with a subset of mRNAs that show no correlation with the length of the UTR or coding regions, or with the mRNA abundance. Ded1 interacts mostly with certain mRNAs encoding proteins involved in translation. Moreover, we find by yeast genetics, *in situ* localization and *in vitro* biochemical approaches that Ded1 is associated with and regulated by the signal recognition particle (SRP), which is a universally conserved ribonucleoprotein complex required for the cotranslational translocation of polypeptides into the endoplasmic reticulum lumen and membrane. Ded1 is physically associated with SRP components *in vivo* and *in vitro*. Ded1 is genetically linked with SRP proteins. Finally, the enzymatic activity of Ded1 is inhibited by SRP21 with SRP RNA, SCR1. We propose a model where Ded1 actively participates in the translocation of proteins during translation, and we open a new comprehension of the cellular role of Ded1 during translation.

Keywords :

Ded1/DDX3, helicase, DEAD-box, PAR-CLIP, SRP, ARN, translation, regulation

Table des matières

| | |
|--|------------|
| INTRODUCTION GENERALE | 1 |
| 1. INTRODUCTION AUX HELICASES | 5 |
| 1.1. Généralités..... | 5 |
| 1.2. Classification des hélicases..... | 5 |
| 1.2.1. La famille ASCE (<i>Additional Strand Catalytic Glutamate</i>) | 6 |
| 1.2.2. Caractéristiques des groupes RecA-like et AAA+ | 6 |
| 1.2.3. Architecture générale des hélicases..... | 8 |
| 1.2.4. Les différentes superfamilles d'hélicases..... | 9 |
| 1.3. Les hélicases ARN à boîte DEAD..... | 11 |
| 1.3.1. Caractéristiques du noyau hélicase | 11 |
| 1.3.2. Propriétés enzymatiques des protéines à boîte DEAD | 14 |
| 1.3.3. Régulation et spécificité des hélicases | 17 |
| 1.3.4. Diversité de fonctions..... | 20 |
| 2. LA SOUS-FAMILLE D'ARN HELICASE DED1/DDX3 | 22 |
| 2.1. Caractéristiques | 22 |
| 2.2. Les membres de la sous-famille Ded1/DDX3..... | 24 |
| 2.2.1. Chez les eucaryotes (autres que chez l'homme et la levure) | 24 |
| 2.2.2. Chez l'homme..... | 25 |
| 2.2.3. Chez la levure..... | 26 |
| 2.3. Fonctions biologiques de Ded1 | 27 |
| 2.3.1. Rôle dans l'épissage | 27 |
| 2.3.2. Rôle dans l'export de l'ARN..... | 30 |
| 2.3.3. Rôle dans la biogenèse du ribosome..... | 33 |
| 2.3.4. Rôle dans la traduction..... | 34 |
| 2.3.5. Rôle dans la formation de foci cellulaires..... | 40 |
| 3. LA PARTICULE DE RECONNAISSANCE DU SIGNAL | 42 |
| 3.1. Introduction..... | 42 |
| 3.2. Organisation de la SRP..... | 42 |
| 3.3. Biogenèse de la SRP | 44 |
| 3.4. Fonction | 46 |
| 4. OBJECTIF DE TRAVAIL | 49 |
| RESULTATS..... | 51 |
| 1. IDENTIFICATION DES ARN ASSOCIES A DED1 | 53 |
| 1.1. Approche expérimentale et résultats principaux de l'article | 53 |
| 1.2. Manuscrit de l'article méthode..... | 56 |
| 1.3. Résultats ne figurant pas sur l'article..... | 72 |
| 2. L'HELICASE A ARN DED1 EST ASSOCIEE A LA PARTICULE DE RECONNAISSANCE DU SIGNAL ET SON ACTIVITE EST REGULEE PAR LA SRP21 | 83 |
| 2.1. Approches expérimentales et résultats principaux de l'article | 83 |
| 2.2. Manuscrit de l'article | 84 |
| DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES | 135 |
| MATERIELS ET METHODES..... | 145 |
| BIBLIOGRAPHIE..... | 151 |
| ANNEXE..... | 169 |

Table des illustrations

| | |
|--|-----|
| Figure 1 : Comparaison des repliements des groupes <i>RecA-like</i> et AAA+ | 7 |
| Figure 2 : Architecture générale des hélicases | 8 |
| Figure 3 : Classification des hélicases de la SF1 et SF2 | 10 |
| Figure 4 : Organisation du noyau hélicase des protéines à boîte DEAD | 12 |
| Figure 5 : Vue schématique des modes et étapes de déroulement de l'ARN par le noyau hélicase des protéines à boîte DEAD | 15 |
| Figure 6 : Représentation schématique des mécanismes de régulation des hélicases à boîte DEAD..... | 19 |
| Figure 7 : Processus cellulaires impliquant les protéines à boîte DEAD chez la levure et l'homme | 21 |
| Figure 8 : Alignement de séquences des membres de la sous-famille Ded1/DDX3..... | 23 |
| Figure 9 : Les membres de la sous-famille Ded1/DDX3 complètent une souche de levure délétée pour Ded1 | 27 |
| Figure 10 : Rôle des hélicases à ARN dans l'épissage d'un pré-ARNm dans le noyau..... | 29 |
| Figure 11 : Représentation schématique des deux voies d'export de l'ARNm..... | 31 |
| Figure 12 : Structure cristalline du ribosome 80S chez la levure <i>S. cerevisiae</i> | 34 |
| Figure 13 : Représentation schématique de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes .. | 37 |
| Figure 14 : Partenaires protéiques de Ded1 dans l'initiation de la traduction | 39 |
| Figure 15 : Représentation schématique de l'organisation de la SRP | 43 |
| Figure 16 : Modèle de l'assemblage de la SRP chez la levure..... | 45 |
| Figure 17 : Schéma illustrant la translocation co-traductionnelle chez la levure..... | 48 |
| Figure 18 : Vue d'ensemble de la technique de PAR-CLIP classique (A) ainsi que la version modifiée (B)..... | 55 |
| Figure 19 : Ded1 se lie principalement sur des ARNm | 73 |
| Figure 20 : Ded1 se lie principalement sur l'hélice 16 de l'ARNr 18S | 74 |
| Figure 21 : Comparaison du niveau de <i>crosslink</i> obtenus au sein de chaque classe d'ARN dans les conditions WT et Δ -glucose..... | 75 |
| Figure 22 : Les ARNm réticulés ne présentent pas de corrélation avec le niveau de transcrits et la taille des ARNm. | 77 |
| Figure 23 : Ded1 se lie sur son propre ARNm | 78 |
| Figure 24 : Diagramme MA de l'analyse de l'expression différentielle des conditions WT et Δ -glucose..... | 79 |
| Figure 25 : Ded1 se lie sur l'ARNnc SCR1..... | 81 |
| Figure 26 : Aperçu général des différentes étapes pour l'alignement | 148 |

| | |
|---|----|
| Tableau 1 : Cofacteurs d'ARN hélicases à boîte DEAD sans domaine MIF4G..... | 20 |
| Tableau 2 : Les membres de la sous-famille Ded1/DDX3 sont impliqués dans de multiples fonctions biologiques..... | 24 |
| Tableau 3 : Liste de gènes hypo- et hyperdépendant de Ded1 en condition de carence en glucose..... | 80 |

Liste des abréviations

| | |
|--------------------------|--|
| AAA+ | ATPases associées à diverses activités cellulaires |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADN_c | ADN complémentaire |
| ADP | Adénosine diphosphate |
| AMP-PNP | Adénosine 5'-(β , γ imido) triphosphate |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ARN_{db} | ARN double brin |
| ARN_m | ARN messenger |
| ARN_{nc} | ARN non codant |
| ARN_r | ARN ribosomique |
| ARN_{sb} | ARN simple brin |
| ARN_{sn} | Petit ARN nucléaire – Small nuclear RNA |
| ARN_{sno} | Petit ARN nucléolaire – Small nucleolar RNA |
| ARN_t | ARN de transfert |
| ASCE | Additional Strand Catalytic Glutamate |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| CBC | Complexe liant la coiffe – Cap-binding complex |
| CLIP | Crosslink et immunoprécipitation |
| DDX3 | DEAD-box hélicase 3 |
| DEAD | Asparagine Glutamine Alanine Asparagine |
| Ded1 | Defines Essential Domain 1 |
| eIF4A | Facteur d'initiation de la traduction eucaryote 4A |
| ECT | Extension C-terminale |
| EJC | Exon junction complex |
| ENT | Extension N-terminale |
| FC | Foci cellulaires |
| GS | Granules de stress |
| IDR | Région intrinsèquement désordonnée – Intrinsically disordered region |
| ILS | Intron lariat spliceosome |
| IP | Immunoprécipitation |
| IP₆ | Inositol hexakisphosphate |
| LCD | Domaine de faible complexité – Low complexity domain |
| m7G | 7-méthyl guanosine triphosphate |
| MIF4G | Middle domain of eucaryotic initiation factor 4G |
| MCM | Minichromosome maintenance |
| NES | Séquence d'export nucléaire - Nuclear export signal |
| NLS | Séquence de localisation nucléaire - Nuclear localisation signal |
| NMD | Dégradation non-sens - Nonsense-mediated decay |
| NPC | Complexe de pore nucléaire - Nuclear pore complex |
| NTP | Nucléotide triphosphate |
| ORF | Phase de lecture ouverte – Open reading frame |
| PAR-CLIP | CLIP améliorée par un ribonucléoside photoactivable |
| PIC | Complexe de pré-initiation |
| RBP | Protéines liant l'ARN – RNA binding proteins |
| RNC | Ribosome-chaine naissante – Ribosome-nascent chain |

| | |
|--------------|---|
| RNP | Ribonucléoprotéine |
| SCR1 | Small cytoplasmic RNA 1 |
| SF | Superfamille |
| snRNP | Petites particules nucléaires de RNP |
| SR | Récepteur de la SRP |
| SRP | Particule de reconnaissance du signal |
| TC | Complexe ternaire |
| UTR | Région non traduite - Untranslated transcribed region |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |
| 4TU | 4-thiouracile |

Introduction générale

The operative industry of Nature is so prolific that machines will be eventually found not only unknown to us but also unimaginable by our mind

Marcello Malpighi

Avant-propos

Les cellules des organismes vivants obéissent à un programme de fonctionnement contrôlé par le génome. Une règle qui ne donne lieu à aucune exception. En effet, l'expression de l'information génétique nécessite la participation d'une machinerie extraordinairement complexe, mais tout aussi « parfaite », en passant de l'acide désoxyribonucléique (ADN) à la protéine par l'intermédiaire d'un acide ribonucléique (ARN). Depuis la découverte de l'ADN en 1953 par Watson et Crick (Watson and Crick, 1953), une multitude d'efforts scientifiques ont conduit à plusieurs découvertes dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui expliquent la transmission de l'information génétique ainsi que la stabilité du génome. Au milieu des années 70, une des découvertes majeures a été la mise en évidence de protéines capables de déroulement d'acides nucléiques dépendant de nucléotide triphosphate (NTP) fournissant l'énergie nécessaire à la protéine. C'est en 1978, que Hoffmann-Berling invente le terme d'« hélicase » pour désigner ces protéines (Geider, 1978). Avant que l'ADN et l'ARN puissent accomplir leurs rôles essentiels dans les cellules, les hélicases séparent les brins d'acides nucléiques en interaction pour rendre « visible » l'information. C'est pourquoi les hélicases sont apparues comme une classe d'enzymes clé à étudier. Au fil des ans, un progrès remarquable a permis de mettre en évidence des propriétés structurales, mécaniques et cellulaires accentuant la complexité de compréhension de ces enzymes. Les hélicases à ARN sont, par exemple, considérées comme l'une des plus grandes classes de protéines participant à « presque » tous les aspects du métabolisme de l'ARN.

L'équipe de N. Kyle Tanner, dans laquelle j'ai effectué ma thèse, s'intéresse aux hélicases à ARN et plus particulièrement à l'hélicase essentielle de levure, Ded1 (*Defines Essential Domain 1*). Il s'agit d'une protéine multifonctionnelle impliquée dans le contrôle de presque toutes les étapes de la régulation génique à savoir l'épissage, le transport, l'initiation de la traduction et le stockage des ARN messagers (ARNm). Le rôle biologique de Ded1 étant inconnu, mon équipe a dans un premier temps identifié ses partenaires protéiques et a pu apporter des éléments de réponse dans la compréhension de son rôle. Dans un second temps, cette étude a été complétée par l'identification des substrats ARN de Ded1 ; un projet qui a duré 4 ans et au cours duquel j'ai effectué ma thèse. Pour ce faire, j'ai utilisé et apporté des modifications majeures à une technique de capture d'ARN existante. L'analyse bio-informatique des résultats obtenus a permis l'identification de plusieurs ARNm et étonnamment d'un ARN non-codant (ARNnc), SCR1 (*Small cytoplasmic RNA 1*). Ce dernier est un composant de la particule de reconnaissance du signal (SRP) impliquée dans la translocation des protéines dans le réticulum endoplasmique au cours de la traduction. J'ai pu

conduire différentes expériences *in vivo* et *in vitro* pour comprendre le rôle de Ded1 associée à la SRP dans la cellule.

L'introduction de ce manuscrit vise à apporter les éléments essentiels pour la bonne compréhension de notre étude. Le premier chapitre introduira le lecteur dans le « monde » des hélicases et plus particulièrement la famille des hélicases ARN à boîte DEAD dans tous leurs aspects. Le deuxième chapitre portera sur une des protéines de cette famille, Ded1, l'acteur central de notre étude. L'introduction s'achèvera avec un dernier chapitre sur une présentation de la SRP afin de comprendre les résultats décrits par la suite.

1. Introduction aux hélicases

1.1. Généralités

La cellule, unité fondamentale de la vie, est une usine microscopique infiniment complexe qui dépend du fonctionnement d'un réseau interconnecté d'unités de traitement et de machines moléculaires spécialisées. C'est dans cet environnement dense que les informations contenues dans les acides nucléiques sont transmises d'une génération à l'autre. En effet, l'ADN et l'ARN sont deux macromolécules constituées de nucléotides liés, chacun composé d'un sucre à cinq carbones (désoxyribose ou ribose), d'un groupement phosphate et d'une base azotée. Il existe cinq bases réparties en deux catégories ; les pyrimidines comprenant l'uracile (spécifique à l'ARN), la thymine (spécifique à l'ADN) et la cytosine ainsi que les purines comprenant la guanine et l'adénine. Toutefois, les bases présentent des propriétés spéciales qui leur permettent la formation de paires spécifiques stabilisées par des liaisons hydrogène. Le bon fonctionnement de nombreux processus cellulaires n'est possible qu'avec un accès à l'information contenue dans les acides nucléiques. Ceci est rendu possible par l'évolution d'une classe d'enzymes essentielles dans tous les règnes de la vie, les hélicases.

Les hélicases constituent une très grande famille de protéines qui jouent un rôle indispensable dans presque tous les aspects du métabolisme des acides nucléiques, y compris la réplication de l'ADN, la réparation, la recombinaison, la transcription, la biogenèse des ribosomes, la traduction et la dégradation de l'ARN (Abdelhaleem, 2009). Initialement découverte chez *Escherichia coli* en 1976, une hélicase a été décrite comme étant une « enzyme de déroulement de l'ADN dépendant de l'adénosine triphosphate (ATP) » semblable à une fermeture éclair qui rompt les liaisons hydrogène complémentaires (Abdel-Monem and Hoffmann-Berling, 1976). Avec la découverte de nouvelles hélicases dans différents organismes, les scientifiques ont vite réalisé que les fonctions biochimiques de ces enzymes vont au-delà de la simple ouverture des acides nucléiques. En effet, beaucoup d'hélicases remplissent non seulement des fonctions canoniques de déroulement, mais aussi une fonction de remodelage des acides nucléiques (Bustamante *et al.*, 2011, Wu, 2012).

1.2. Classification des hélicases

Les hélicases ont été initialement classées selon la présence de motifs conservés. En 1982, les prémices d'une classification ont démarré avec l'identification de deux motifs de séquences conservées en acides aminés dans plusieurs protéines utilisant l'ATP et le GTP, appelés motif I (Walker A) constituant une boucle de liaison au phosphate du NTP ou « P-

loop » et motif II (Walker B) (Walker *et al.*, 1982). Plus tard, des analyses de comparaisons de séquences ont permis d'identifier 4 autres motifs conservés d'acides aminés, le tout constituant un « noyau hélicase », dans des protéines impliquées dans la réplication et la recombinaison de l'ADN et de les classer en une superfamille (SF) (Gorbalenya *et al.*, 1988a, Hodgman, 1988, Gorbalenya *et al.*, 1988b).

Un alignement de séquences plus poussé a été élaboré par Gorbalenya et Koonin en 1993, sur la base de comparaison d'acides aminés, qui ont proposé une classification générale des hélicases en trois superfamilles (SF1,2,3) et deux familles d'hélicases putatives (DnaB-like et Rho-like) (Gorbalenya and Koonin, 1993). Quatorze ans plus tard, cette classification a été simplifiée par Singleton et ses coll. en classant les hélicases DnaB-like, Rho-like au sein des SF4 et SF5 respectivement puis en ajoutant la classe des ATPases associées à diverses activités cellulaires (AAA+) au sein d'une sixième superfamille (SF6). Ils ont également ajouté un système de dénomination qui classe les superfamilles en sous-familles qui peuvent être définies en fonction de leur directionnalité et de leur translocation sur un acide nucléique simple ou double brin (Singleton *et al.*, 2007).

1.2.1. La famille ASCE (*Additional Strand Catalytic Glutamate*)

Bien que les hélicases des 6 SF possèdent un large éventail de mécanismes catalytiques différents, leurs séquences protéiques et leurs structures ont plusieurs caractéristiques communes. Etant donné que les hélicases couplent l'hydrolyse du NTP (généralement l'ATP), elles appartiennent à une division des NTPases dite *P-loop* et plus particulièrement à la famille ASCE qui a la particularité de posséder un brin supplémentaire dans sa structure centrale entre les motifs Walker A (*P-loop*) et B. Elle est composée de plusieurs sous-groupes (Leipe *et al.*, 2002). Les hélicases de la SF 1/2/4/5 ainsi que 3/6 font parties des groupes *RecA-like* et AAA+ respectivement (Iyer *et al.*, 2004, Berger, 2008).

1.2.2. Caractéristiques des groupes *RecA-like* et AAA+

« Structure mère » commune : domaine ASCE

Les membres de la famille ASCE possèdent un glutamate nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP et une structure « centrale » qui consiste en 5 feuillets β parallèles conservés pris en sandwich entre cinq hélices α (**Figure 1**). Le motif I (Walker A), situé entre le brin β -1 et l'hélice α -A, est une boucle possédant les résidus conservés G-K-T (glycine, lysine et thréonine), où la lysine interagit avec le phosphate γ d'une molécule de NTP (généralement ATP) et la thréonine qui coordonne un ion magnésium. Le motif II (Walker B) possède les

résidus conservés D-E (aspartate et glutamate), l'un coordonnant l'interaction avec un ion magnésium couplé à l'ATP et l'autre, qui a donné le nom à la famille ASCE, activant une molécule d'eau pour permettre une attaque nucléophile sur le phosphate γ durant l'hydrolyse. Un autre composant du site actif conservé est la présence d'un motif « senseur 1 » (SI) composé d'un résidu polaire ayant la capacité de détecter l'état du nucléotide lié (ATP ou ADP) afin de transmettre des changements de conformation de la protéine. Enfin, la communication conformationnelle est assurée par la présence d'un motif IV possédant une arginine conservée appelé « doigt d'arginine » qui aide à coupler la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. La liaison de l'ATP sur ces différents motifs entraîne un changement de conformation de l'hélicase qui permet la formation d'une poche de liaison à l'ATP et permet ainsi son hydrolyse (Cordin *et al.*, 2004).

Différences topologiques

Les protéines du groupe *RecA-like* ont un domaine structural similaire à la protéine de recombinaison RecA de *E. Coli* et sont caractérisées par deux extensions de feuillet β des deux côtés de la « structure mère » communes, de la famille ASCE (**Figure 1A**).

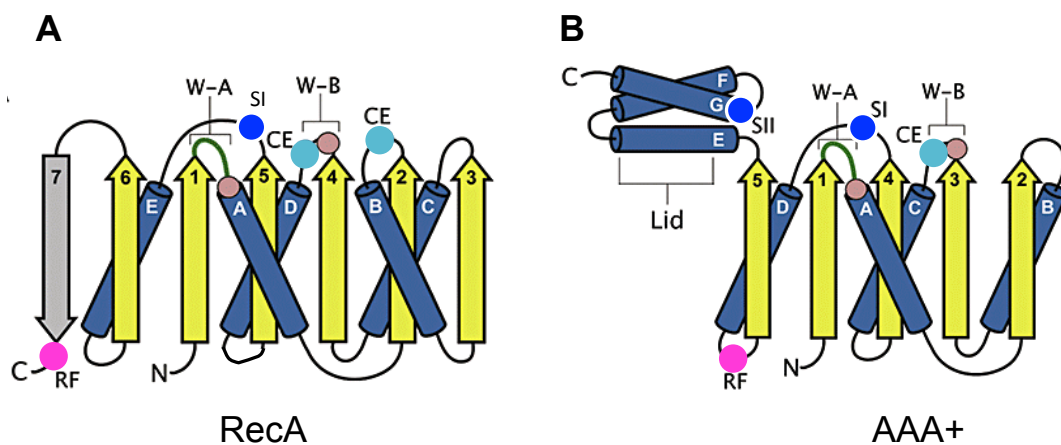


Figure 1 : Comparaison des repliements des groupes *RecA-like* et AAA+

Les groupes *RecA-like* (A) et AAA+ (B) appartiennent à la famille ASCE des NTPases *P-loop* et comprennent une structure « mère » commune composée de 5 brins parallèles de feuillets β (flèche) entourés d'hélices α (cylindre). La structure secondaire commune aux protéines ASCE est représentée en bleu foncé/jaune. La boucle P contenant le motif Walker A (W-A) est représenté en vert. Abréviations : W-B : Walker B ; CE (bleu) : glutamate catalytique ; RF (rose) : doigt d'arginine ; SI, SII (bleu) : senseur 1 et 2 respectivement. Figure adaptée de l'article de Thomsen et ses coll, 2008.

Les protéines du groupe AAA+ sont caractérisées par la présence de deux domaines : le premier étant la « structure mère » commune avec un doigt d'arginine situé avant le brin 5. Ce dernier est suivi d'un deuxième domaine composé de 3 à 4 hélices, parfois appelé « le couvercle », contenant un motif « senseur 2 » (SII) composé d'un résidu chargé positivement

qui couple la liaison et l'hydrolyse de l'ATP afin de transmettre des changements de conformation de la protéine (**Figure 1B**) (Thomsen and Berger, 2008, Medagli and Onesti, 2012).

1.2.3. Architecture générale des hélicases

Les protéines du groupe *RecA-like* et AAA+ s'appuient sur des mécanismes similaires pour la génération de mouvement le long d'un acide nucléique. L'activation de l'enzyme nécessite au moins deux domaines ASCE en tandem qui s'assemblent de manière à former un site de liaison à l'ATP et au magnésium. Deux classes d'hélicases sont reconnues sur la base de leurs structures oligomériques (Singleton et al., 2007). La première classe forme des multimères (le plus souvent hexamères) par l'association de six domaines ASCE simples de topologie *RecA-like* pour les SF4-5 et AAA+ pour les SF3-6 (**Figure 2A**). La deuxième classe comprend un grand nombre d'hélicases de la SF1 et SF2 qui fonctionnent en monomères (ou dimères) par l'association de deux domaines ASCE en tandem de topologie *RecA-like* sur une même chaîne polypeptidique. Ces deux domaines sont reliés par un « linker » flexible permettant ainsi à la protéine de changer de conformation une fois liée au substrat (**Figure 2B**).

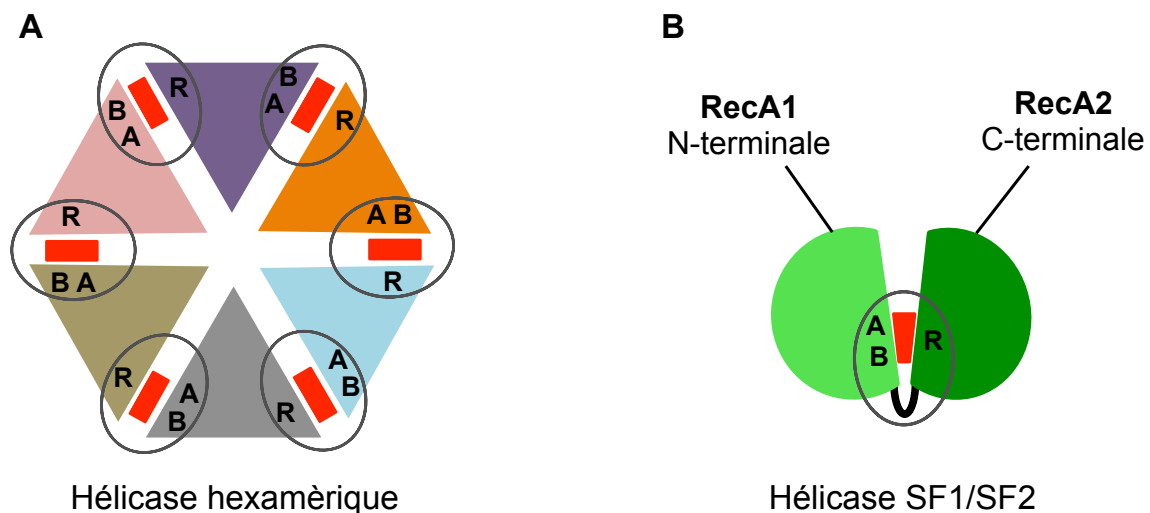


Figure 2 : Architecture générale des hélicases

A. Représentation schématique des hélicases hexamériques. Elles se replient en six domaines ASCE simples (*RecA-like* ou AAA+) et forment un anneau formant une fente de liaison pour l'ATP (rouge). Chaque monomère contient à la fois les motifs Walker A et B (A et B) d'un côté et le doigt arginine (R) de l'autre. La cavité centrale de l'anneau lie l'acide nucléique. **B.** Représentation schématique des hélicases appartenant aux SF1 et SF2 qui sont typiquement monomériques (dimériques pour certaines). Elles se replient en deux domaines ASCE en tandem (*RecA-like*) reliés par un linker (noir) et forment une fente de liaison pour l'ATP. Les motifs Walker A et B sont situés du côté N-terminal et le doigt d'arginine du côté C-terminal. Figure adaptée de l'article de Medagli et Onesti, 2012.

Toutefois dans les deux cas, l'interface entre les domaines ASCE RecA-*like* ou AAA+ forme une fente bordée de motifs conservés qui coordonnent l'ATP, le Mg²⁺ et les substrats d'acides nucléiques (Jackson *et al.*, 2014).

Par souci de simplification, les deux domaines ASCE des hélicases de la SF1 et SF2 seront nommés RecA1 et RecA2 dans ce manuscrit.

1.2.4. Les différentes superfamilles d'hélicases

Hélicases hexamériques

La SF3 est composée d'hélicases impliquées dans la réplication du génome viral le long d'un ADN ou ARN. Les membres les plus étudiés sont les hélicases de l'antigène T du virus simien 40, la protéine Rep du virus adéno-associée et l'hélicase E1 du papillomavirus (Hickman and Dyda, 2005, Gorbalenya *et al.*, 1990).

La SF4 est composée d'une petite famille d'hélicases impliquées dans la réplication des génomes des bactéries (DnaB et DnaG), bactériophages (gp4 de T7 et gp41 de T4) et mitochondries (Twinkle). Ces hélicases peuvent être associées à la primase pour accomplir leurs fonctions (Singleton *et al.*, 2007).

La SF5 n'est composée que du facteur Rho responsable de la terminaison de la transcription chez les bactéries. Malgré une ressemblance topologique avec celle des protéines de la SF4, la protéine Rho a été placée dans une famille distincte en raison de sa séquence divergente. Elle se déplace le long de l'ARN naissant tout en séparant les duplexes ARN/ADN (Gogol *et al.*, 1991).

La SF6 est composée d'hélicases MCM (*minichromosome maintenance*) impliquées dans la réplication des génomes eucaryotes et archées (Tye, 1999, Singleton *et al.*, 2007). Cette famille inclue également la protéine RuvB impliquée dans le traitement des jonctions Holliday de l'ADN lors de la recombinaison homologue (West, 1996).

Hélicases monomériques (ou dimériques)

Les hélicases de la SF1 et SF2 constituent un grand groupe de protéines impliquées dans pratiquement tous les aspects du métabolisme de l'ARN et/ou de l'ADN. Un alignement de séquences des hélicases humaines, de bactéries (*E. Coli*) et de levure (*S. cerevisiae*) des deux SF a permis à Fairman-Williams et ses coll. de classer les hélicases en familles ou groupes (**Figure 3**). Un groupe est composé de 1 ou 2 hélicases d'un même organisme alors qu'une famille en possède au minimum 3. Selon ces critères, les hélicases de la SF1 ont été réparties en 3 familles et les hélicases de la SF2 en 9 dont 1 groupe (Jankowsky, 2011).

Les hélicases de ces deux SF partagent des similitudes structurales leur permettant d'utiliser des mécanismes similaires pour leurs activités enzymatiques (Cordin *et al.*, 2006). Toutefois, ces familles présentent des fonctions biologiques distinctes au sein des protéines d'une même famille. Cette diversité de fonction a été attribuée aux domaines accessoires des extrémités N- et C-terminales.

De plus, il est intéressant de noter que plusieurs familles d'hélicases peuvent agir sur l'ARN et/ou l'ADN suggérant que la distinction entre ces deux substrats n'a probablement pas été une force évolutive prédominante pour la différenciation des familles d'hélicases, d'où cette absence de corrélation entre les familles. Par exemple les membres des familles *Upf1-like*, *DEAH-RHA*, *NS3/NPH-II*, *Ski2-like* et *RIG-I-like* agissent à la fois sur l'ARN et l'ADN ; les membres des familles *UvrD/Rep*, *Pif1-like*, *RecQ-like*, *RecG-like*, *Swi/SNF*, *T1R* et *Rad3/XPD* agissent sur l'ADN ; seule la famille *DEAD-box* (ou boîte DEAD) agit uniquement sur l'ARN (Fairman-Williams *et al.*, 2010).

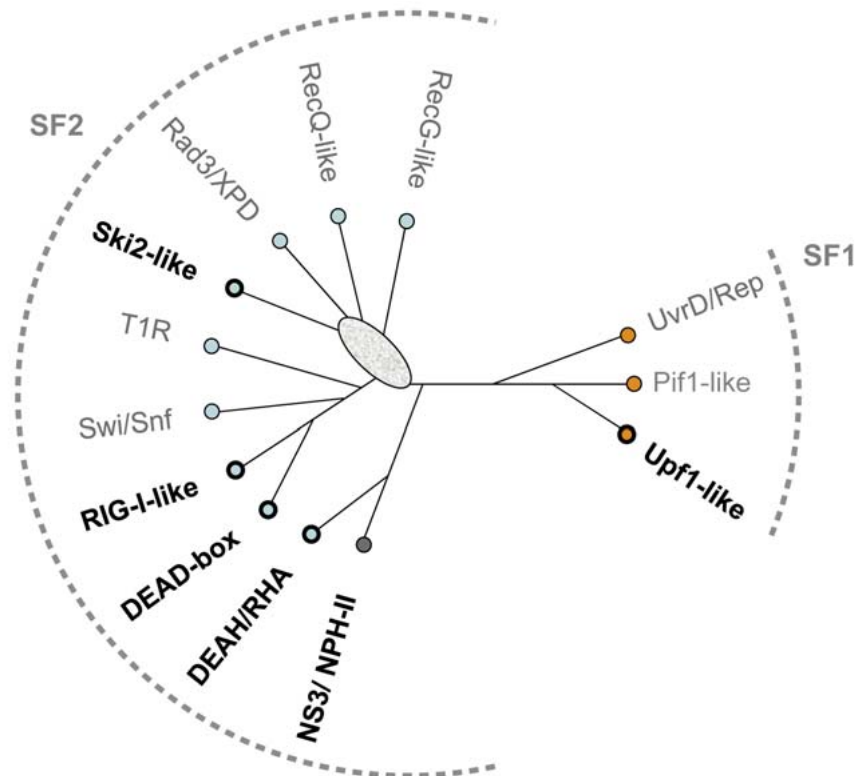


Figure 3 : Classification des hélicases de la SF1 et SF2

Cladogramme schématisé non raciné montrant les membres de la SF1 à droite et de la SF2 à gauche. Les longueurs des branches ne sont pas à l'échelle. L'ovale indique une incertitude dans la topologie des cladogrammes au niveau de cette région. Les noms en caractères gras correspondent aux familles hébergeant des hélicases à ARN. La nomination des familles a été faite soit en fonction du membre protéique bien étudié au sein de la famille (« protéine »-like) ou en fonction de la séquence en acides aminés conservés au sein d'un motif de la famille (exemple *DEAD-box*). Abréviations : T1R : enzyme de restriction de type 1, RHA : ARN hélicase A. Figure extraite de l'article de Jankowsky, 2011.

Les hélicases à ARN (**Figure 3, en gras**) déroulent des duplex d'ARN selon deux types distincts : par déroulement canonique ou par séparation de brins locaux. Dans le déroulement canonique, l'hélicase se lie à une extrémité du duplex, puis utilise l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer avec une direction définie (3'-5' ou 5'-3') le long de l'un des brins d'acide nucléique. Ainsi, des cycles répétés d'hydrolyse de l'ATP entraînent une translocation directionnelle de l'enzyme qui fait basculer l'hélicase pour finalement entraîner le déroulement complet de l'hélice (Lohman *et al.*, 2008, Singleton *et al.*, 2007). Ce mode de déroulement fait référence au mécanisme utilisé par de nombreuses hélicases à ADN et par toutes les hélicases à ARN, sauf les protéines à boîte DEAD. Ces dernières déroulent les duplex par séparation de brins locaux. Dans ce mode de déroulement, la protéine se lie directement sur la région en duplex, puis sépare les brins d'ARN d'une manière dépendant de l'ATP sans directionnalité définie (Pyle, 2008). Ce mode de séparation fera l'objet d'un paragraphe plus loin dans ce chapitre. Par ailleurs, durant ma thèse je me suis intéressée aux hélicases à ARN à boîte DEAD, le reste de ce chapitre portera sur la présentation de cette famille.

1.3. Les hélicases ARN à boîte DEAD

La famille à boîte DEAD est de loin la plus grande famille de la SF2 avec 25 membres chez *S. cerevisiae* (ci-après dénommée « levure », sauf indication contraire) et 37 membres chez l'homme. Le nom de la famille est dérivé de la séquence en acides aminés D-E-A-D (Asp-Glu-Ala-Asp) retrouvée dans le motif II (Walker B) (Linder *et al.*, 1989).

1.3.1. Caractéristiques du noyau hélicase

Les hélicases à boîte DEAD se caractérisent par la présence d'au moins 13 motifs conservés impliqués dans les activités ATPases et hélicases et dans la liaison à l'ARN (**Figure 4A**) (Tanner *et al.*, 2003, Putnam and Jankowsky, 2013). Ces motifs sont répartis sur deux domaines RecA reliés par un « *linker* » flexible qui adopte des conformations différentes en réponse à la liaison du substrat.

Les différents motifs

Les hélicases à boîte DEAD doivent lier et positionner efficacement l'ATP à la fois pour catalyser l'hydrolyse de la liaison phosphate et pour exploiter l'énergie chimique libérée afin d'effectuer des remaniements sur l'ARN. Ces rôles sont effectués par l'arrangement spatial des **motifs I, II, VI et Q**, tous interconnectés entre eux. La spécificité pour l'adénine

est conférée par un résidu glutamine (Q) qui se lie de manière spécifique à la base adénine par la formation de liaisons hydrogène. Ce motif est spécifique des hélicases à boîte DEAD, même si le résidu glutamine seul est retrouvé dans d'autres hélicases de la SF1 et SF2 et est absent dans les protéines des familles DEAH/ RHA qui peuvent utiliser d'autres substrats que l'ATP (Tanner et al., 2003). Il semblerait toutefois que ce motif soit également impliqué dans la liaison efficace de l'ARN.

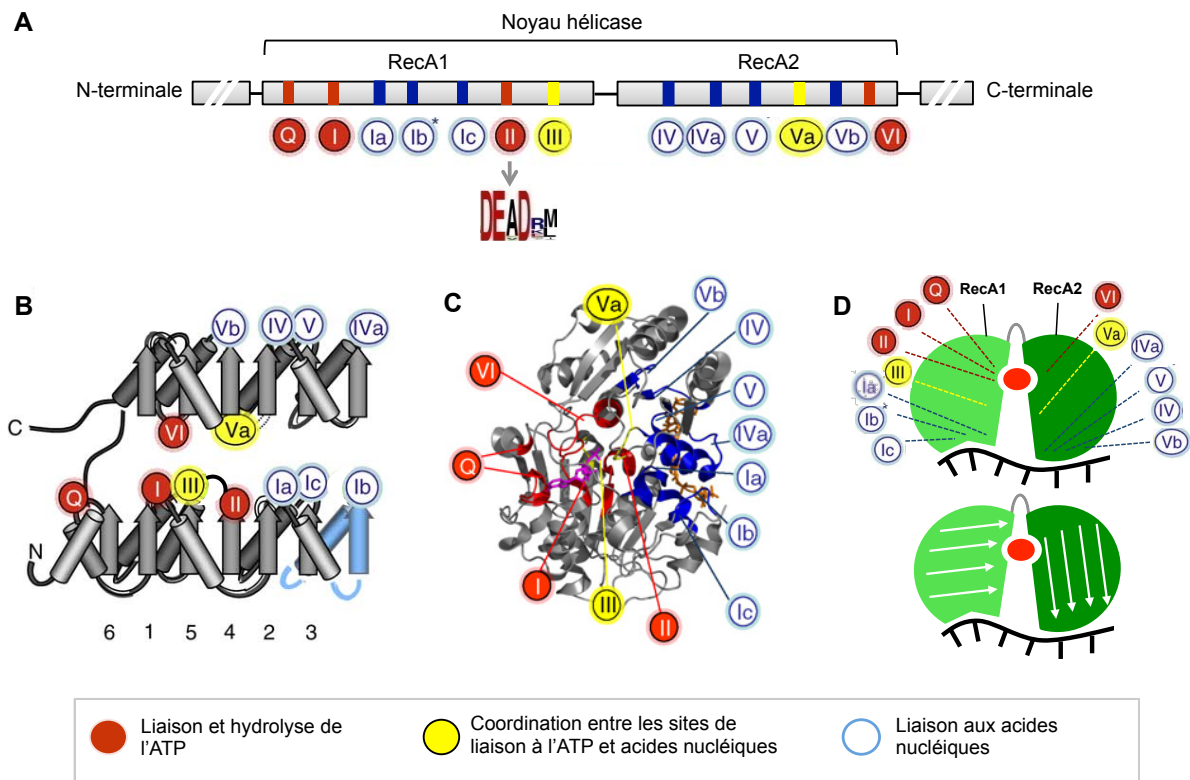


Figure 4 : Organisation du noyau hélicase des protéines à boîte DEAD

A. Représentation des motifs de séquences caractéristiques du noyau hélicase des protéines à boîte DEAD. Les nombres encadrés indiquent l'emplacement approximatif des motifs de séquences caractéristiques, colorés en fonction de leur fonction biochimique principale (cf. encadré du bas). L'astérisque sur le motif Ib indique que ce motif peut être absent dans certaines protéines à boîte DEAD. La conservation de séquence caractéristique est indiquée en dessous du motif II. La hauteur des lettres est proportionnelle à la conservation des acides aminés. **B.** Représentation schématisée de la topologie des deux domaines RecA. Les feuillet β sont indiqués par des flèches, les hélices α par des cylindres. La coloration en bleue indique la présence de feuillet β et α supplémentaires dans les protéines à boîte DEAD. **C.** Position des motifs de séquences caractéristiques dans la structure tridimensionnelle de l'hélicase Vasa à boîte DEAD. L'analogue de l'ATP, l'AMP-PNP, est coloré en magenta et l'ARN en orange. **D.** Représentation schématisée d'une protéine à boîte DEAD dans son état « actif » lié à l'ATP (rouge) et l'ARN (noir). Haut : disposition des différents motifs sur l'hélicase, bas : direction des brins β dans les deux domaines RecA. Cette représentation sera utilisée tout au long du manuscrit. Les motifs de séquences caractéristiques sont colorés comme dans A. Figure adaptée de l'article de Fairman-Williams et ses coll, 2010, sauf pour la figure D.

De ce fait, par son interaction avec les autres motifs, le motif Q agirait comme un « senseur » de l'état du nucléotide lié et l'hydrolyse de l'ATP ne serait possible que si le substrat ARN est

correctement lié à la protéine (Cordin et al., 2004). De plus, les motifs I, II et VI, les plus conservés, sont respectivement les motifs Walker A (*P-loop*), Walker B et le doigt d'arginine vu précédemment (cf. 1.2.2.). L'importance de ces motifs a été montrée à travers différentes études mutationnelles. Par exemple, des mutations au niveau du résidu lysine du motif I (Walker A) en un acide aminé non chargé d'asparagine abolissent la liaison à l'ATP (Pause and Sonenberg, 1992)

Les **motifs III et Va**, impliqués dans la coordination entre l'ATP et le site de liaison à l'ARN, sont très conservés au sein des membres de la famille des hélicases à boîte DEAD (Banroques *et al.*, 2010). Toutefois, cette communication est mal comprise.

Les **motifs Ia, Ib, Ic, IV, IVa, V et Vb**, situés sur la face opposée du site de liaison du NTP, participent à la liaison de l'acide nucléique. Ils sont conservés au sein de chaque famille de la SF2, à part le domaine Ib qui ne se retrouve que chez certains membres (Fairman-Williams et al., 2010).

Caractéristiques structurales

La liaison de l'ARN et de l'ATP entraîne des réarrangements structuraux qui se traduisent par un état « fermé » qui rend l'hélicase active. Cet état est transitoire et est inversé par un état « ouvert », état inactif de la protéine, lorsqu'il y a eu hydrolyse de l'ATP et libération de l'ARN. Ces états ont été visualisés initialement avec la structure de la protéine Vasa de drosophile complexée avec un ARN et un analogue non hydrolysable de l'ATP, l'adénosine 5'-(β , γ imido) triphosphate (AMP-PNP) (**Figure 4C**). Dans l'état actif, les deux domaines RecA sont presque perpendiculaires avec une jonction profonde où se trouve la poche de liaison à l'ATP (**Figure 4D**). Six nucléotides de l'ARN longent les motifs de liaison à l'ARN de l'hélicase qui se retrouvent alignés à l'opposé de la fente où se trouve l'ATP. L'extrémité 5' de l'ARN se situe au niveau du domaine RecA2 et l'extrémité 3' au niveau du domaine RecA1. De façon surprenante, l'ARN se lie dans une conformation étendue, mais avec un pli prononcé au niveau du 5^{ème} nucléotide à proximité du domaine RecA1, ce qui est incompatible avec la géométrie de l'ARN (Sengoku *et al.*, 2006). Ainsi, ce pli entraîne une altération des liaisons hydrogène et une déstabilisation locale du duplex. Toutes les protéines à boîte DEAD connues à ce jour ont la même conformation à l'état « fermé » alors que l'état « ouvert » peut varier selon les différents membres de la famille (Ozgur *et al.*, 2015, Theissen *et al.*, 2008). Par exemple, la protéine Mss116 de levure et DDX19 humaine, toutes deux étant des hélicases à boîte DEAD d'espèces divergentes avec des rôles biologiques différents, se lient à l'ARN dans une conformation presque identique et lient un AMP-PNP orienté de façon identique, accentuant la conservation structurale robuste (Henn *et al.*, 2012). De plus, les contacts établis par ces motifs sont principalement effectués vers le squelette sucre-phosphate de l'acide nucléique, sans contact spécifique avec les bases, ce qui indique que ces

protéines n'ont intrinsèquement pas la capacité de reconnaître spécifiquement leurs substrats *in vitro* (Bono *et al.*, 2006, Sengoku *et al.*, 2006). Cependant, il a été montré que la spécificité *in vivo* des hélicases peut être conférée par la présence d'extensions N- ou C-terminales ou encore par l'intermédiaire de protéines cofacteurs (cf. 1.3.3.).

1.3.2. Propriétés enzymatiques des protéines à boîte DEAD

Bien que les structures cristallines des protéines à boîte DEAD ont montré qu'elles interagissent avec l'ATP et l'ARN, ces enzymes possèdent des activités biochimiques uniques et diverses fonctions physiologiques. Elles fonctionnent généralement au sein de complexes multi-protéiques, ce qui complique leur analyse puisqu'il est difficile de reconstituer ces complexes *in vitro*. C'est pourquoi les études biochimiques se limitent à l'utilisation de ces hélicases de façon isolée avec peu ou pas de cofacteurs permettant d'établir des modèles sur leurs modes de fonctionnement. Les analyses biochimiques ont initialement été effectuées sur quelques protéines à boîte DEAD comme eIF4A, Mss116, DbpA, Fal1, prp5 et Ded1. Les comportements enzymatiques de ces protéines ne sont pas identiques soulignant une divergence des mécanismes. De façon intéressante, il a été montré *in vitro* que Ded1 est l'une des protéines les plus actives avec la capacité de dérouler, de manière dépendante de l'ATP, un large excès de substrats à des concentrations nanomolaires (Banroques *et al.*, 2011, Iost *et al.*, 1999). C'est pourquoi cette protéine a servi de modèle pour les analyses biochimiques des protéines à boîte DEAD.

Enzyme non processive

Contrairement aux hélicases classiques, les protéines à boîte DEAD sont qualifiées de « mauvaises » hélicases. Tout d'abord, la processivité des protéines à boîte DEAD, c'est-à-dire le nombre de paires de bases que la protéine sépare avant de se dissocier de l'ARN, diminue lorsque la longueur de l'ARN dépasse 10-12 paires de bases, pour être indétectable au-delà de 25 paires de bases, *in vitro* (Rössler *et al.*, 2001, Chamot *et al.*, 2005). Ce qui limite généralement leurs actions aux duplex d'ARN de moins de deux tours hélicoïdaux (Tanner and Linder, 2001). Puis, l'efficacité de la séparation des brins diminue si l'ARN possède beaucoup de paires G-C (Chen *et al.*, 2008, Rogers *et al.*, 1999, Chamot *et al.*, 2005). Une explication à ce phénomène étrange viendrait du fait que les éléments hélicoïdaux au sein d'ARN structurés sont rarement plus longs que 10 paires de bases, ce qui indique qu'il n'y a pas besoin d'une grande processivité pour les séparer (Jarmoskaite and Russell, 2011). Enfin, une étude réalisée sur les protéines Ded1 et Mss116 montre que même les duplex avec un segment d'ARN flanqué des deux côtés par de l'ADN, peuvent être efficacement séparés par ces protéines, alors que les mêmes protéines ne sont pas actives sur des substrats entièrement

ADN, indiquant que la séparation des brins est initiée en interne, sans translocation (Yang *et al.*, 2007).

Liaison et déroulement de duplex par séparation de brins locaux

Le déroulement de l'ARN nécessite une coordination entre l'ATP, l'ARN et l'hélicase. Les études biochimiques des protéines à boîtes DEAD ont révélé que toutes déroulent des duplex d'ARN *in vitro*. Cependant, il n'est pas clair si toutes les hélicases partagent ce rôle au sein de la cellule. Des mutations qui entraînent des diminutions dans l'activité de déroulement de l'ARN entraînent souvent une altération des fonctions cellulaires des enzymes. Mais cette conclusion ne veut pas forcément dire qu'une hélicase déroule systématiquement l'ARN dans la cellule (Putnam and Jankowsky, 2013). *In vitro*, la séparation de l'ARN se fait d'une manière dépendante de l'ATP et la liaison peut se faire différemment selon le membre de la famille (Hilbert *et al.*, 2009). Bien que les mécanismes exacts des processus de chargement ne soient pas bien compris, il a largement été établi que la liaison de l'hélicase peut se produire à n'importe quel endroit du duplex, à savoir : sur une structure simple brin en interne ou externe (**Figure 5A1-A2**) (Gao *et al.*, 2019), sur une hélice double brin (**Figure 5B**) (Rogers *et al.*, 2001) ou sur une des extensions 3' ou 5' simple brin adjacent au duplex (Tijerina *et al.*, 2006, Yang and Jankowsky, 2006).

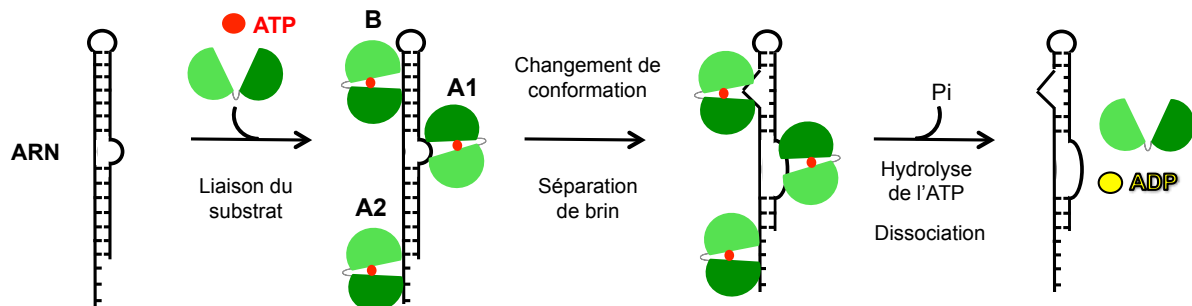


Figure 5 : Vue schématique des modes et étapes de déroulement de l'ARN par le noyau hélicase des protéines à boîte DEAD

Les hélicases **A1**, **A2**, et **B**, représentent les différents modes de chargement sur l'ARN. Seul le mode utilisant une extension simple brin n'a pas été représenté par souci de simplicité. Sans ligands, les deux domaines RecA de l'hélicase à boîte DEAD sont en conformation ouverte. En présence d'ATP, le complexe hélicase-ARN passe à la conformation fermée qui est incompatible avec la liaison du duplex d'ARN. Ceci entraîne un déroulement local de l'ARN, sans polarité stricte. L'ADP lié entraîne à nouveau un passage à la conformation ouverte (Shi *et al.*, 2004) avec libération du phosphate inorganique (Pi) et dissociation du complexe.

Il a été montré que Ded1 a une haute affinité pour l'ARN simple brin (ARNsb) par rapport à l'ARN double brin (ARNdb) (Raj *et al.*, 2019). Les régions simples brins fourniraient des « sites d'atterrissage » qui amélioreraient l'activité enzymatique, que ce soit en 5' en ou 3', indiquant que l'enzyme ne présente aucune directionnalité. Cependant, les duplex courts avec

des régions flanquantes en 5' sont les substrats préférés de Ded1. Ceci est cohérent avec les structures cristallines déjà résolues : la liaison de l'enzyme à la région 5' place le domaine RecA1 près de la région double brin (cf. **Figure 4**). Ainsi, le chargement de l'hélicase, liée à une molécule d'ATP sur l'ARN, entraîne un passage d'un état ouvert à fermé qui déstabilise localement l'ARN d'environ 10 paires de bases, sans polarité stricte (Linder and Jankowsky, 2011, Pyle, 2008, Bizebard *et al.*, 2004). De façon intéressante, les hélicases à boîte DEAD n'utilisent qu'un seul ATP en moyenne par événement de déroulement (Chen *et al.*, 2008). Cela signifie que l'hydrolyse de l'ATP n'est nécessaire que pour recycler la protéine. Finalement, l'hydrolyse de l'ATP entraîne une dissociation de l'hélicase (Putnam and Jankowsky, 2013). Il est important d'ajouter que la vitesse d'hydrolyse peut dépendre d'une protéine à l'autre. Plus l'hydrolyse prendra du temps plus l'hélicase se comportera comme une pince « bloquée » sur l'ARN stabilisant le complexe si l'hélicase est associée à d'autres protéines (cf. exemple eIF4A-III 1.3.3). On parle alors de pince d'ARN dépendant de l'ATP. En effet, une étude réalisée sur l'hélicase Ded1 montre sa capacité à former une pince ATP-dépendante de l'ARN, en plus de ses fonctions de remodelage de l'ARN (Raj *et al.*, 2019, Liu *et al.*, 2014).

Déplacement de protéines associées à l'ARN

Lors du déroulement, les protéines à boîte DEAD peuvent éliminer les protéines qui sont associées à l'ARN. Des preuves biologiques ont été apportées par différentes études *in vivo* sur l'implication de l'activité ATPase des hélicases sur le déplacement. Par exemple, la protéine Mud2 est déplacée de l'ARN par l'hélicase Sub2 de levure pendant l'épissage d'ARNm précurseur (pré-ARNm) (Kistler and Guthrie, 2001). Ou encore, l'hélicase Dbp5 de levure déplace la protéine Mex67 lors de l'export d'ARNm (Lund and Guthrie, 2005). Cependant, on ne sait pas si le déplacement des protéines et le déroulement de l'ARN par des protéines à boîte DEAD reposent sur des mécanismes identiques. Un élément de réponse est apporté avec une étude intéressante pour la protéine Ded1. Il a été montré que Ded1 peut éliminer une protéine liée à l'ARN indépendamment de la structure de l'ARN, ce qui indique qu'il ne s'agit pas d'un effet secondaire causé par un déroulement local de l'ARN (Fairman *et al.*, 2004). De plus, les hélicases peuvent déplacer des protéines liées à l'ARN à condition qu'elles aient une empreinte de moins de huit nucléotides. Les protéines avec des empreintes plus grandes ne peuvent pas être déplacées par les protéines à boîte DEAD, alors que les hélicases classiques les éliminent facilement (Bowers *et al.*, 2006).

Formation de duplex

De nombreuses hélicases à boîte DEAD sont capables de former un duplex d'ARN, dit « *annealing* », indépendamment de leur rôle dans le déroulement de l'ARN. Cependant,

toutes les protéines étudiées ne présentent pas cette activité *in vitro*. Les protéines Ded1, Mss116 et Dbp2 sont parmi les plus étudiées et montrent une activité d'*annealing* assez importante indépendante de l'ATP. La réaction d'*annealing* n'est pas l'inverse de la réaction de déroulement. Une étude a montré qu'il existerait un équilibre entre ces deux activités opposées et que cet équilibre serait modulé par des concentrations d'ATP et d'ADP. Ainsi, la combinaison des deux événements présenterait un avantage au cours de la formation ou remodelage de complexes ARN-protéines, ou ribonucléoprotéines (RNP), par les hélicases et avoir une fonction de chaperon d'ARN (Yang and Jankowsky, 2005, Halls *et al.*, 2007, Ma *et al.*, 2013).

1.3.3. Régulation et spécificité des hélicases

De façon intéressante, à la différence du noyau hélicase conservé possédant une activité hélicase intrinsèquement faible, un grand nombre de ces enzymes présentent des extensions N- et C-terminales de taille variable contribuant à la diversité fonctionnelle de cette famille (Cordin *et al.*, 2006). Ces extensions peuvent avoir un effet sur la reconnaissance de substrats ARN spécifiques et même agir sur l'état d'activation enzymatique en bloquant l'hélicase dans une conformation défavorable à l'activité catalytique. Par ailleurs, comme dit précédemment, la liaison de l'ARN et de l'ATP sur l'hélicase entraîne une conformation dite « fermée ». Cet état est inversé lorsque l'ATP est hydrolysée et que l'ARN est libéré entraînant une conformation dite « ouverte ». Pour la plupart des hélicases, ces états sont contrôlés par des cofacteurs protéiques qui induisent des réarrangements structuraux modulant l'activité ATPase et la liaison à l'ARN.

Reconnaissance de substrats ARN spécifiques

Bien que la majorité des hélicases n'ait pas de spécificité vis-à-vis de leur substrat *in vitro*, certaines se lient préférentiellement à des structures secondaires d'ARN pour la stimulation de leur activité ATPases. C'est le cas notamment pour les hélicases DbpA (*E. coli*) et YxiN (*Bacillus subtilis*) qui se lient spécifiquement à la boucle 92 de l'ARN ribosomique 23S grâce à la présence de domaine de liaison à l'ARN en C-terminale (**Figure 6A**) (Diges and Uhlenbeck, 2001, López de Victoria *et al.*, 2017). Pour d'autres hélicases, la présence de ce domaine permet la reconnaissance de séquences spécifiques facilitant le déroulement de l'ARN par le noyau hélicase. C'est le cas pour l'hélicase CdsA d'*E. Coli* et DDX17 humaine, capables de reconnaître respectivement des substrats ARN simple brin riches en guanine ou un motif VCAUCH (**Figure 6B**) (Xu *et al.*, 2017, Mori *et al.*, 2014).

Autorégulation

Certaines hélicases présentent des interactions intramoléculaires qui peuvent stabiliser des conformations particulières des domaines de type RecA. Par exemple, l'hélicase humaine DDX19 (Dbp5 chez la levure), impliquée majoritairement dans l'export nucléaire d'ARNm, possède une hélice α en N-terminale qui s'insère entre les deux domaines de type RecA empêchant la fermeture de la fente (**Figure 6C**). Cette inhibition est levée par la liaison d'un cofacteur qui entraîne un changement de conformation de la protéine qui ferme la fente et laisse place à un site ATPase fonctionnel (Collins *et al.*, 2009).

Régulation par des cofacteurs protéiques

De nombreux cofacteurs contiennent des domaines de répétition HEAT qui consistent en une paire d'hélices α antiparallèles disposées en tandem le long d'un axe dont la taille et la forme globale dépendent du nombre de répétitions qu'elles contiennent. Le nom de HEAT provient de quatre protéines possédant ce type de motif : l'huntingtine (H), eEF2 eucaryote (E), la protéine phosphatase 2A (A) et la kinase TOR1 (T). Les cofacteurs régulant certaines protéines à boîte DEAD possèdent un domaine MIF4G (*middle domain of eucaryotic initiation factor 4G*) composé de 5 répétitions HEAT donnant naissance à une structure en croissant de lune (**Figure 6D**) (Ozgun *et al.*, 2015).

Lorsque le cofacteur se lie à l'hélicase, la pointe N-terminale du domaine MIF4G lie le domaine RecA2 de l'hélicase par une interaction à haute affinité alors que la pointe C-terminale entre en contact avec le domaine RecA1 par une interaction de faible affinité. Cette liaison entraîne un réarrangement structural favorisant une communication rapide entre les états ouvert et fermé de l'hélicase stimulant ou inhibant l'activité catalytique de l'enzyme.

Ainsi, dans le cas d'une stimulation, les deux domaines RecA sont rapprochés favorisant l'activité ATPase (**Figure 6D, haut**). C'est le cas par exemple pour le complexe hélicase/cofacteur eIF4AI-II/eIF4G (Hilbert *et al.*, 2010). Lors de la traduction, les hélicases eIF4A-I/II sont sollicitées pour résoudre des structures secondaires dans les 5'UTR des ARNm. Il a été montré que les protéines eIF4AI-II ont une faible affinité pour l'ARN *in vitro* (Rogers *et al.*, 2001). Par conséquent, l'activité ATP stimulée par l'ARN et le déroulement sont faibles. De façon surprenante, après la liaison du cofacteur eIF4G, l'hélicase agit comme une translocase dépendante de l'ATP qui déroule progressivement un duplex d'ARN *in vitro* (García-García *et al.*, 2015). Cette étude montre qu'il est possible que le mode de déroulement et la processivité d'autres hélicases à boîte DEAD puissent être modifiés par des cofacteurs accessoires. Les mêmes principes d'activation sont retrouvés pour les complexes Dbp5/Gle1 et Dhh1/Not1 de levure impliqués respectivement dans la formation de *P-bodies* et dans l'export d'ARNm (Ozgun *et al.*, 2015).

Lors d'une inhibition, les domaines RecA de l'hélicase sont éloignés l'un de l'autre perturbant la poche de liaison à l'ATP (**Figure 6D**, bas).

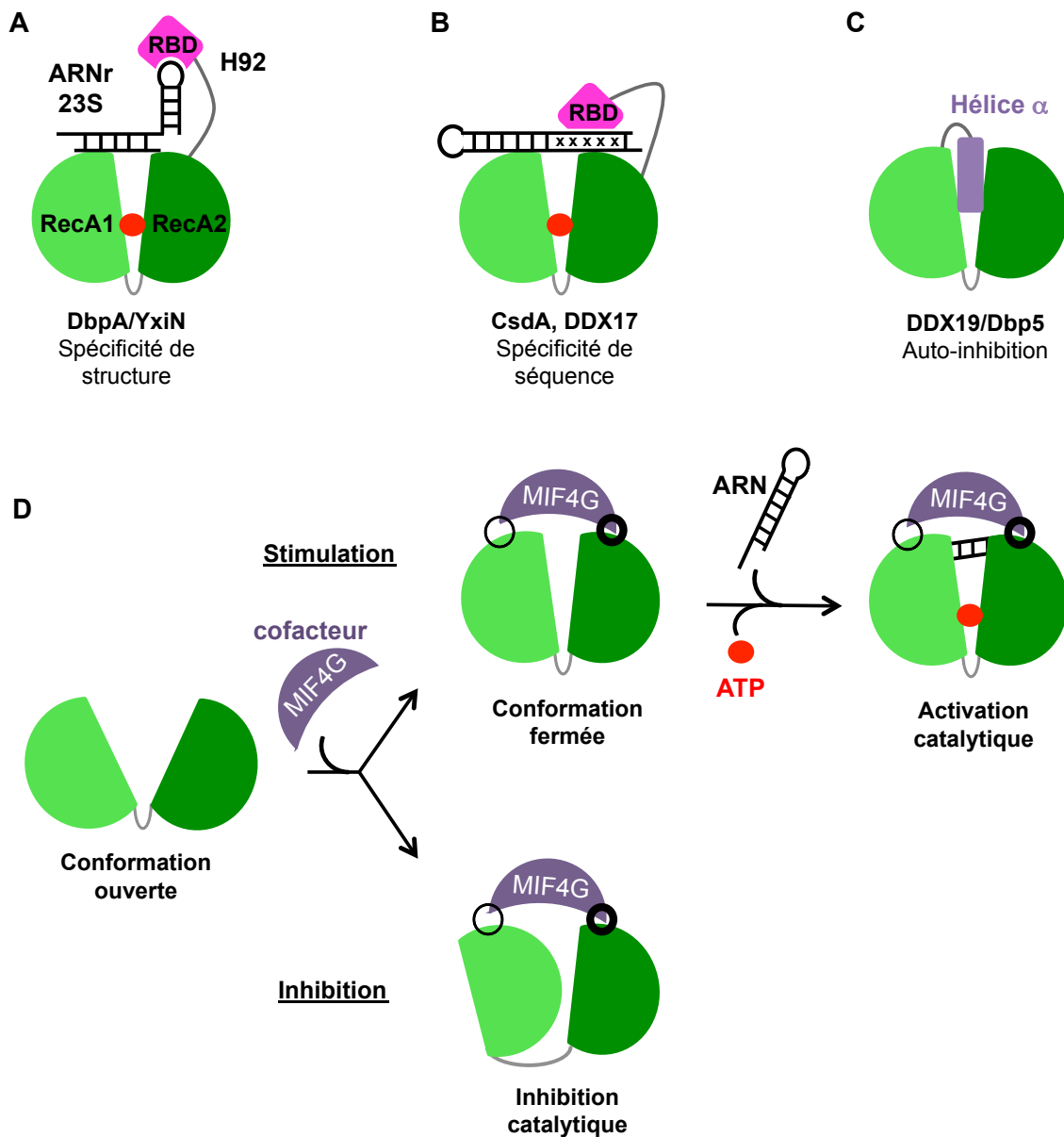


Figure 6 : Représentation schématique des mécanismes de régulation des hélicases à boîte DEAD

A-B. Reconnaissance de substrats ARN spécifiques par la structure secondaire (A) ou la séquence d'ARN (B). **C.** Interaction intramolécule inhibant l'hélicase. **D.** Stimulation ou inhibition de l'activité catalytique de l'hélicase par un cofacteur possédant un domaine MIF4G. Rond épais et fin : forte et faible interaction respectivement. Abréviations : NT : N-terminal, CT : C-terminal, RBD : domaine de liaison à l'ARN.

Ceci a été rapporté pour le complexe eIF4-III/CWC22 impliqué dans l'assemblage du complexe EJC (*exon junction complex*). Pendant l'épissage, eIF4A-III est liée avec 3 sous-unités

de l'EJC (MLN51 et l'hétérodimère MAGOH-Y14) qui induisent une conformation « fermée » favorisant la liaison de l'ATP et du pré-ARNm. Cependant le complexe inhibe la libération du phosphate, ce qui permet à l'enzyme de rester liée à l'ARN de façon stable pendant des périodes prolongées. La liaison du cofacteur CWC22, possédant un domaine MIF4G, déplace le complexe et inhibe l'activité ATPase de l'enzyme (Sloan and Bohnsack, 2018, Hir *et al.*, 2016).

Cependant, il existe plusieurs autres cofacteurs sans le domaine MIF4G qui régulent l'activité des hélicases (**Tableau 1**).

| Cofacteur | Helicase | Organisme | Régulation | Processus cellulaire |
|-------------|-----------|------------|------------|-------------------------|
| Yra1 | Dbp2 | Levure | - | Transcription |
| Prp8 | Brr2 | Levure | - | Epissage |
| Xpo1+RanGTP | Ded1 | Levure | - | Export ARNm |
| Gle1 | Ded1 | Levure | - | Initiation traduction |
| Pat1/Edc3 | Dhh1 | Levure | - | Inhibition traduction |
| PDCD4 | eiF4A-I | Humain | - | Initiation traduction |
| eiF4B/eif4H | eiF4A-I | Humain | + | Initiation traduction |
| Gle1 | Ded1 | Levure | + | Initiation traduction * |
| MNL51 (Btz) | eiF4A-III | Humain | + | Assemblage EJC |
| MAGOH-Y14 | eiF4A-III | Humain | + | Assemblage EJC |
| Oskar | Vasa | Drosophile | + | Localisation ARNm |
| Ezrin | DDX3X | Humain | + | Regulation traduction |
| Rrp5 | Rok1 | Levure | + | Biogenèse ribosome |
| Esf2 | Dbp8 | Levure | + | Biogenèse ribosome |
| Utp14 | Dhr1 | Levure | + | Biogenèse ribosome |

Tableau 1 : Cofacteurs d'ARN hélicases à boîte DEAD sans domaine MIF4G

+ : stimulation, - : inhibition. * : (Senissar *et al.*, 2014). Tableau adapté de l'article de Sloan et Bohnsack, 2018.

Ces régulations sont apportées par la présence d'autres domaines, moins bien caractérisés, ou encore par des interactions électrostatiques favorisant ou non la liaison à l'ARN. C'est le cas par exemple d'une des protéines du complexe EJC, MNL51. Elle possède une région intrinsèquement non structurée qui se lie étroitement au domaine RecA1 de eiF4A-III et stimule son activité ATPase. De plus, elle possède des régions chargées positivement avec plusieurs interactions électrostatiques ce qui contribue au renforcement de la liaison sur l'ARN (Bono *et al.*, 2006). Aujourd'hui encore, de nouveaux cofacteurs s'ajoutent à cette liste non exhaustive, soulignant leur importance dans la régulation des hélicases.

1.3.4. Diversité de fonctions

In vitro, la grande majorité des hélicases à boîte DEAD eucaryotes et bactériennes ne présentent pas de préférence pour une séquence d'ARN. Pourtant, *in vivo*, ce sont des enzymes très spécifiques et non interchangeables c'est-à-dire qu'elles ne sont pas en mesure

de se substituer à une autre hélicase à boîte DEAD même lorsqu'elles sont surexprimées (**Figure 9**) (Tanner et al., 2003). Ces hélicases participent à la régulation de pratiquement tous les processus impliquant l'ARN dans une cellule, allant de la transcription à la dégradation (**Figure 7**).

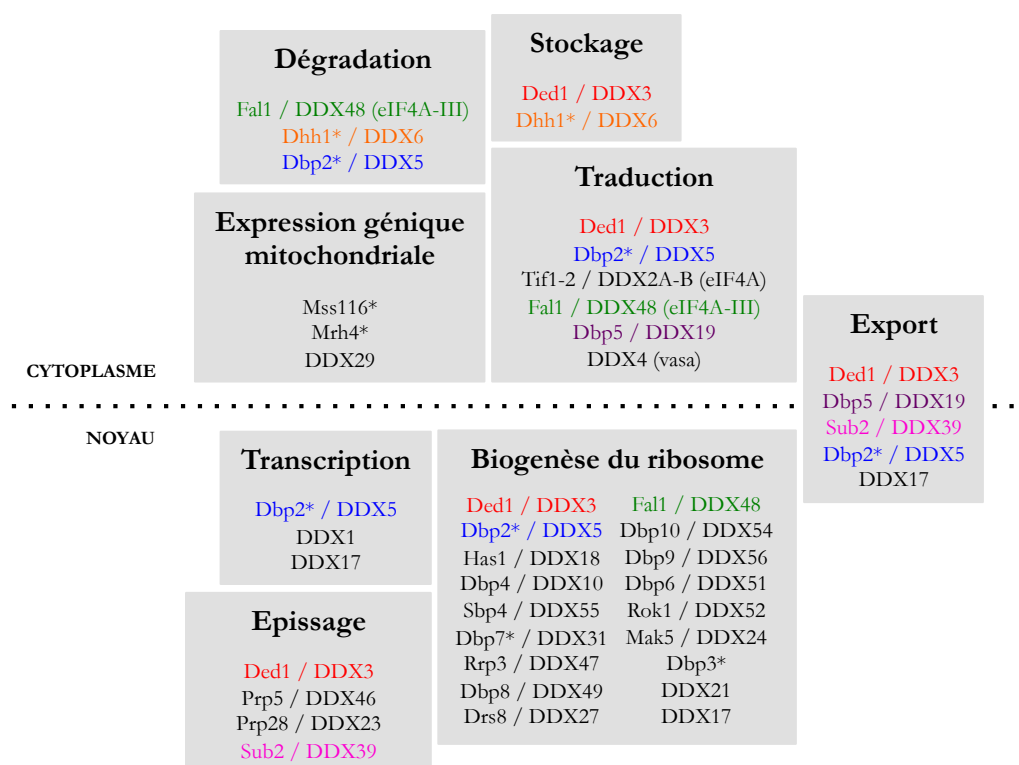


Figure 7 : Processus cellulaires impliquant les protéines à boîte DEAD chez la levure et l'homme

Les orthologues humains sont en majuscule. * : protéines non essentielles chez la levure. La même couleur a été utilisée pour les protéines multifonctionnelles.

La compréhension des rôles des hélicases a été possible grâce à la combinaison d'approches biologiques et structurales. Cependant, les rôles exacts d'une grande majorité d'hélicases à boîtes DEAD ne sont toujours pas très clairs. Et plus important encore, les substrats ARN *in vivo* de ces hélicases ne commencent à être connus que depuis peu grâce aux techniques de séquençages à haut débit.

Il est intéressant de noter que plusieurs hélicases peuvent avoir des fonctions dans plusieurs processus cellulaires, les qualifiant d'enzymes multifonctionnelles. C'est le cas par exemple pour la protéine Ded1 de levure, et son orthologue humain DDX3 (*Dead-box helicase 3*). Les diverses fonctions biologiques faisant intervenir ces hélicases seront illustrées de manière détaillée dans le chapitre suivant.

2. La sous-famille d'ARN hélicase Ded1/DDX3

2.1. Caractéristiques

L'analyse phylogénétique de toutes les hélicases à boîte DEAD identifiées chez différents organismes montre le regroupement d'une sous-famille, appelée Ded1/DDX3, hautement conservée de la levure à l'homme (Sharma and Jankowsky, 2014). Cette sous-famille se caractérise par une conservation de séquences du noyau hélicase ainsi que certaines régions N- et C-terminales. Elle comprend les orthologues de levure (Ded1 et Dbp1), de levure *S. pombe* (Ded1p), de xénope *Xenopus laevis* (An3), de souris *Mus musculus* (PL10, Ddx3x et Ddx3y), de drosophile *Drosophila melanogaster* (Belle), de l'homme *Homo sapiens* (DDX3X et DDX3Y) ainsi que d'autres eucaryotes séquencés (**Figure 8**) (Milani *et al.*, 2017). Chez les invertébrés et les vertébrés non-mammifères, les gènes de la sous-famille Ded1/DDX3 ont souvent été appelé *PL10*.

Les 13 motifs conservés sont retrouvés dans le noyau hélicase. Cependant, il existe une région unique entre les motifs I et Ia présente uniquement au sein des membres de la sous-famille Ded1/DDX3, contrairement aux autres protéines à boîte DEAD. Cette insertion crée une zone chargée positivement impliquée dans la liaison, l'hydrolyse et le déroulement de l'acide nucléique (Garbelli *et al.*, 2011). Les extrémités N- et C-terminales sont en grande partie non structurées avec des domaines de faible complexité (LCD, *low complexity domains*) et/ou des régions intrinsèquement désordonnées (IDR, *intrinsically disordered regions*), mais contiennent des motifs responsables des fonctions uniques de chaque membre de la sous-famille. Par exemple, l'extrémité N-terminale possède une séquence d'export nucléaire (NES, *nuclear export signal*) essentielle à l'export nucléaire médiée par la protéine CRM1 (Xpo1 chez la levure) (Yedavalli *et al.*, 2004, Askjaer *et al.*, 1999, Senissar *et al.*, 2014), une séquence putative de liaison au facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Shih *et al.*, 2008) et une région LCD avec de multiples répétitions RG (Arg-Gly). L'extrémité C-terminale contient également une région LCD riche en résidus SR important pour l'oligomérisation. Il est connu que de nombreuses hélicases sans boîte DEAD fonctionnent comme des oligomères, avec l'intervention de chaque monomère dans la séparation de l'acide nucléique, mais il n'est pas clair si l'oligomérisation est importante pour les hélicases à boîte DEAD (Enemark and Joshua-Tor, 2008). Il a été montré que deux molécules de Ded1 se lient à l'ARN simple brin et facilitent le chargement d'une troisième molécule qui sépare le duplex d'ARN, *in vitro*. Jankowsky et ses collègues parlent de « division du travail » entre les différentes protéines de Ded1 (Putnam *et al.*, 2015). L'orthologue humain DDX3X fonctionne également comme oligomère de 3 molécules suggérant une conservation évolutive de l'oligomérisation dans la

sous-famille Ded1/DDX3 et donc une fonction biologique conservée. De plus, l'extrémité C-terminale présente beaucoup de résidus chargés positivement.

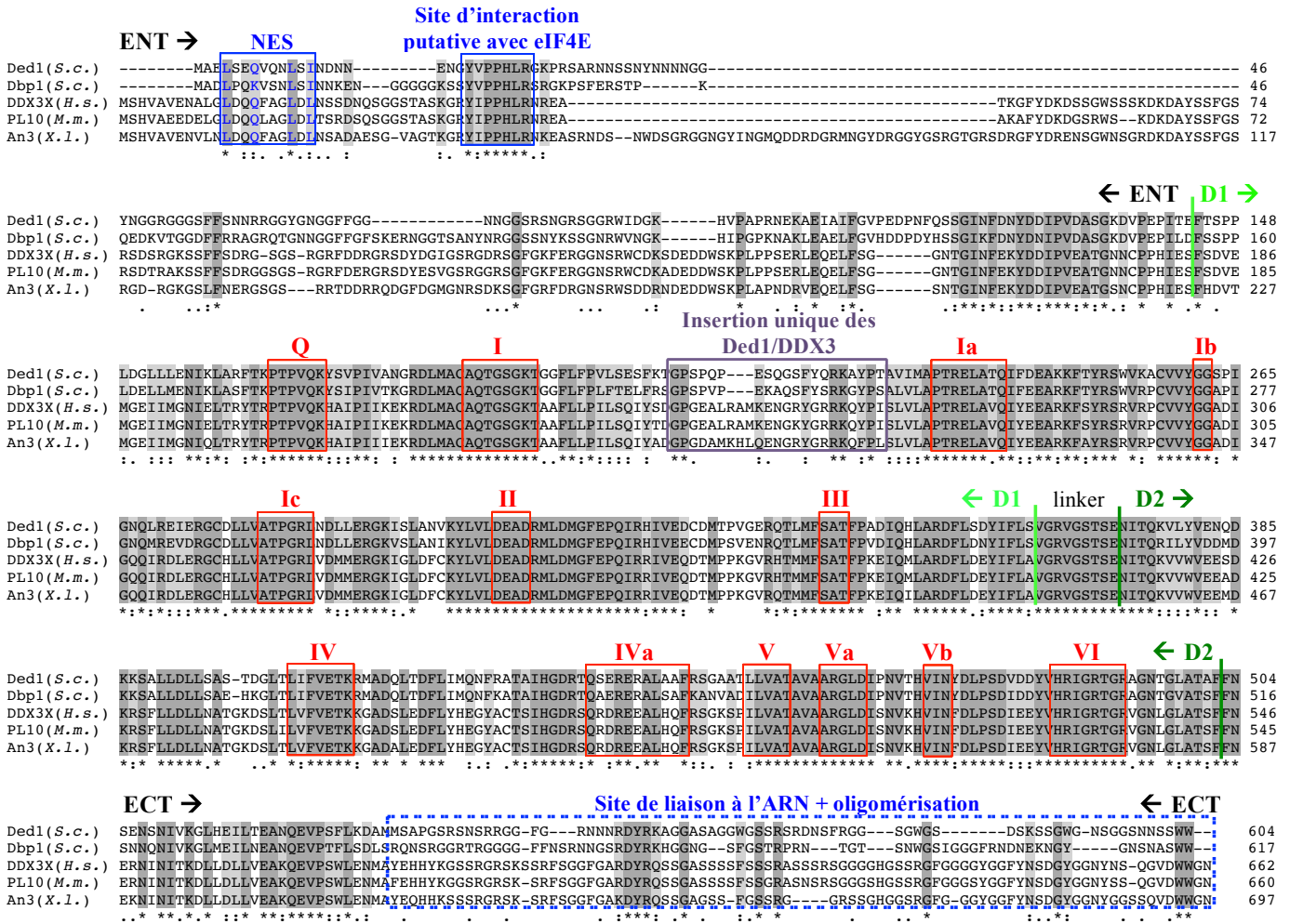


Figure 8 : Alignement de séquences des membres de la sous-famille Ded1/DDX3

L'alignement a été effectué avec le logiciel Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) avec des orthologues de Ded1 allant de la levure à l'homme : seules cinq des espèces sont représentées. Les résidus identiques (*) ou avec une forte conservation (:) sont ombrés en gris foncé et clair respectivement. Les limites ENT (extension N-terminale), D1 (Domaine 1 – RecA1), D2 (Domaine 2 – RecA2) et ECT (extension C-terminale) sont indiquées sur la figure. Les 13 motifs conservés sont encadrés en rouge (d'après Jankowsky, 2011). Les résidus conservés des extensions N et C terminales sont encadrés en bleu. L'encadré en pointillé suscite des analyses approfondies. L'encadré en violet présente une région unique de cette sous-famille. La délimitation des motifs qui a été utilisée a été attribuée par Jankowsky et ses coll, 2010.

La suppression de 69 résidus de l'extrémité C-terminale de Ded1 et du motif conservé RDYR de l'extrémité C-terminale de DDX3X inhibe le déroulement de l'ARN *in vitro* suggérant une fonction dans la liaison de l'ARN (Floor *et al.*, 2016, Sharma *et al.*, 2017). Cependant, le rôle de ce motif dans l'oligomérisation et la liaison à l'ARN mériterait d'être étudié de façon plus

approfondie. Bien que tous les eucaryotes séquencés jusqu'à maintenant possèdent au moins un membre de la sous-famille Ded1/DDX3, les fonctions cellulaires de seulement quelques membres ont été élucidés (**Tableau 2**). En effet, les orthologues de cette sous-famille sont impliqués dans plusieurs processus du métabolisme de l'ARN. Des dérégulations de leurs expressions ou dans les séquences des motifs entraînent souvent des anomalies soulignant leur importance.

| Fonction biologique | Hélicase(s) |
|--|--------------------------------|
| Régulation de la transcription | DDX3X |
| Epissage | Ded1, DDX3X, An3, Belle |
| Export d'ARN | Ded1, DDX3X, An3 |
| Localisation dans des granules | Ded1, DDX3X, Belle |
| Régulation de la traduction | Ded1, DDX3X, Belle |
| Réplication virale | Ded1, DDX3X |
| Développement ou suppresseur de tumeur | DDX3X, An3 |
| Signalisation cellulaire | DDX3X, An3 |
| Régulation du cycle cellulaire | DDX3X, Ded1p, Belle |
| Spermatogenèse | DDX3Y, PL10, Belle |

Tableau 2 : Les membres de la sous-famille Ded1/DDX3 sont impliqués dans de multiples fonctions biologiques

Liste non exhaustive.

2.2. Les membres de la sous-famille Ded1/DDX3

2.2.1. Chez les eucaryotes (autres que chez l'homme et la levure)

Chez la drosophile, Belle est l'orthologue unique de la sous-famille Ded1/DDX3. Elle est présente dans les cellules somatiques et gonadiques et est essentielle pour la viabilité des mouches (Johnstone *et al.*, 2005). Elle est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, dans l'établissement de l'axe antéro-postérieur de l'ovocyte en développement, dans la ségrégation chromosomique pendant la mitose et pendant les mécanismes de métamorphose (Kotov *et al.*, 2020). Il a été démontré que Belle régule la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm spécifique d'une manière dépendante de l'ATP (Thry *et al.*, 2012, Liao *et al.*, 2019).

Chez le xénope, An3 est impliquée dans la signalisation cellulaire (Cruciat *et al.*, 2013). Sa distribution est différente en fonction du stade de développement ; en effet, elle est initialement localisée dans le noyau, mais se retrouve dans le cytoplasme à des stades plus avancés (Gururajan *et al.*, 1994). De plus, An3 interagit physiquement avec la protéine CRM1 impliquée dans l'export nucléaire des ARN et protéines via une séquence NES et fait la navette entre le noyau et le cytoplasme (Askjaer *et al.*, 1999, Askjaer *et al.*, 2000). Par ailleurs,

comme Ded1, An3 est une hélicase dépendante de l'ATP et a une activité ATPase en présence d'ARN (Gururajan and Weeks, 1997).

La souris possède 3 protéines appartenant à la sous-famille Ded1/DDX3 ; Ddx3x, Ddx3y et PL10 (nouvellement appelée D1Pas1). Cette dernière est exprimée dans les tissus testiculaires, participe à la spermatogenèse et a un rôle possible dans la régulation de la traduction (Leroy *et al.*, 1989, Chuang *et al.*, 1997). Bien que Ddx3y et PL10 soient toutes les deux exprimées dans les testicules, il a été montré que PL10 est essentielle pour la première division méiotique des cellules germinales mâles alors que Ddx3y est essentielle pour l'achèvement de la méiose (Inoue *et al.*, 2016).

2.2.2. Chez l'homme

Le génome humain possède deux gènes *DDX3* apparentés : *DDX3X* (sur le chromosome X) et *DDX3Y* (sur le chromosome Y) qui codent respectivement pour les protéines DDX3X et DDX3Y avec 92% d'homologie (Kim *et al.*, 2001). DDX3Y est exprimée dans les testicules où elle présente une fonction essentielle dans la spermatogenèse (Foresta *et al.*, 2000). Des mutations et/ou des dérégulations de l'expression sont associées à l'infertilité masculine et au développement de tumeurs dans les testicules (Gueler *et al.*, 2012). La protéine DDX3X est exprimée à différents niveaux dans tous les tissus somatiques allant des cellules sanguines aux neurones (Soto-Rifo and Ohlmann, 2013). Comme son orthologue Ded1, DDX3X interagit avec plusieurs protéines (Havugimana *et al.*, 2012). A l'heure actuelle, plusieurs structures cristallines du noyau hélicase de DDX3X ont été résolues : la forme apo (PDB (*Protein Data Bank*) : 2JGN et 5E7I), la forme liée à l'AMP-PNP (PDB : 5E7M), la forme liée à l'AMP (2I4I et 5E7J) et la forme pré-déroulée lié à un ARNdb (6O5F) (Rodamilans and Montoya, 2007, Högbom *et al.*, 2007, Floor *et al.*, 2016, Song and Ji, 2019). Par ailleurs, des mutations et/ou des dérégulations de l'expression de DDX3X sont associées à des troubles du développement, à un arrêt du cycle cellulaire, à une déficience intellectuelle et au développement de tumeurs (médulloblastome, lymphome à cellule T, pulmonaire, colorectale, cancer du sein, de la bouche et du foie) (Sharma and Jankowsky, 2014). Hormis cela, DDX3X est ciblée par plusieurs virus pathogènes comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus de l'hépatite C (Valiente-Echeverría *et al.*, 2015, de Bisschop *et al.*, 2019). Ceci a rapidement augmenté l'intérêt biomédical pour cette protéine dans la recherche de traitement contre le cancer et dans le développement d'agents antiviraux (Bol *et al.*, 2015, Brai *et al.*, 2016). Il y a un rôle central de DDX3 dans la biologie de l'ARN (**Tableau 2**) et dans la maladie soulignant la nécessité de définir clairement les activités biochimiques (ATPases et hélicases) et la fonction de l'enzyme. Cependant, peu de

données sont disponibles. Les analyses biochimiques ont initialement été effectuées sur l'hélicase essentielle de levure, Ded1 (cf. 1.3.2.).

2.2.3. Chez la levure

Le gène *DED1* a initialement été identifié chez la levure *S. cerevisiae* avec la perturbation de son cadre ouvert de lecture entraînant un phénotype létal soulignant le rôle essentiel de Ded1 (Struhl, 1985). Le gène code pour une protéine relativement abondante de 65 kDa présente majoritairement dans le cytoplasme (Jamieson and Beggs, 1991, Firczuk *et al.*, 2013, Chuang *et al.*, 1997). Ded1 interagit physiquement et/ou génétiquement avec plusieurs protéines rapportées par diverses techniques à haut débit, dont la plupart a pu être validée directement (Senissar *et al.*, 2014, Costanzo *et al.*, 2016). A l'heure actuelle, aucune structure cristalline n'a été résolue en raison de l'agrégation de la protéine (Hauk and Bowman, 2015). De façon générale, Ded1 est une protéine multifonctionnelle puisqu'elle est retrouvée associée à de nombreux processus cellulaires. Le gène a été identifié comme un suppresseur multicopie d'un mutant du gène *prp8* impliqué dans l'épissage de l'ARNm. La protéine a également été associée à l'initiation de la traduction, la réplication du virus L-A de levure et à la formation de foci cellulaires. De plus, les substrats ARN spécifiques de Ded1 et les effets des partenaires protéiques sur son activité enzymatique n'ont pas été pleinement explorés. Les différents rôles de Ded1 sont détaillés dans la suite de ce chapitre. La protéine Ded1 a un paralogue fonctionnel non essentiel, Dbp1. La surexpression de cette dernière peut restaurer partiellement la croissance d'une souche délétée pour le gène *DED1* (Jamieson and Beggs, 1991, Banroques *et al.*, 2011). La surexpression de Dbp1 dans une souche mutée pour Ded1 améliore la traduction de nombreux ARNm hyperdependants de Ded1 (Sen *et al.*, 2019). Cependant, le rôle exact de Dpb1 dans la traduction n'a pas été clairement montré.

L'orthologue fonctionnel de Ded1 chez la levure *S. pombe*, initialement appelé Sum3⁺, est essentielle et son absence peut être complétée par l'expression de Ded1 de levure (Forbes *et al.*, 1998, Grallert *et al.*, 2000). De façon intéressante, un mutant *ded1* sensible au froid inhibe la progression du cycle cellulaire et la traduction des cyclines de type B Cig2 et Cdc13 (Grallert *et al.*, 2000, Liu *et al.*, 2002). Les ARNm de ces deux protéines possèdent des structures secondaires complexes dans leur région non codante, en amont du codon d'initiation de la traduction (5'UTR, cf. 2.3.4), qui peuvent limiter l'efficacité de la traduction. La protéine Ded1 pourrait être nécessaire pour surmonter ces séquences, spéculation qui d'ailleurs a été confirmée quelques années plus tard par plusieurs études (cf. 2.3.4).

De façon intéressante, les membres de la sous-famille Ded1/DDX3 peuvent compléter partiellement une souche de levure délétée pour le gène *DED1* endogène ce qui indique qu'ils remplissent des fonctions cellulaires similaires soulignant leur conservation au cours de l'évolution. Cela justifie l'utilisation de Ded1 comme objet d'étude de cette sous-famille (**Figure 9**) (Senissar *et al.*, 2014, Mamiya and Worman, 1999). Une meilleure

compréhension du rôle de Ded1 permettra une meilleure compréhension du mode d'action des autres membres et en particulier de la protéine humaine DDX3. La levure représente un modèle puissant par l'utilisation de techniques diverses comme la génétique, la localisation *in situ*, l'enzymologie et la biochimie. C'est également la protéine centrale de ce manuscrit et du projet de thèse, c'est pourquoi ce chapitre portera plus particulièrement sur l'hélicase Ded1. Quelques résultats concernant son orthologue humain DDX3 seront ajoutés au fur et à mesure de l'exposé.

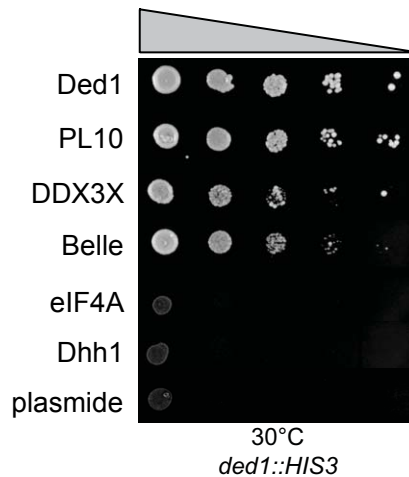


Figure 9 : Les membres de la sous-famille Ded1/DDX3 complètent une souche de levure délétée pour Ded1

Une souche de levure délétée pour la protéine Ded1 a été transformée avec des plasmides contenant les protéines indiquées. Les cultures ont été diluées 10x avant d'être déposées sur boîte contenant un milieu sélectif. PL10, DDX3 et Belle sont les orthologues de Ded1. EIF4A et Dhh1 sont des hélicases à boîte DEAD de levure. Figure adaptée de l'article de Senissar et ses coll, 2014.

2.3. Fonctions biologiques de Ded1

2.3.1. Rôle dans l'épissage

La plupart des ARNm précurseurs eucaryotes contient des séquences non codantes appelées introns qui doivent être éliminées par le processus d'épissage pour produire un ARN mature dans le noyau. La levure possède environ 5600 gènes codant pour des protéines, dont environ 240 avec introns. Une centaine de gènes avec intron codent pour des protéines ribosomiques abondantes et dont la plupart sont essentielles. La machinerie de l'épissage travaille en grande partie pour la biogenèse du ribosome, qui représente 40% des ARNm d'une cellule, soulignant l'importance de l'épissage chez la levure (Ares *et al.*, 1999).

Les introns sont définis par trois séquences conservées : le site d'épissage 5' (5'SS), la séquence de point de branchement interne et le site d'épissage 3' (3'SS). L'épissage est réalisé par le spliceosome, un complexe hautement dynamique et conservé, qui est composé

d'environ 170 protéines chez l'homme, 90 chez la levure et de 5 petites particules de RNP nucléaires, dite snRNP, appelées U1, U2, U5 et U4/U6, contenant chacune un petit ARN nucléaire (ARNsn, *small nuclear*) spécifique et plusieurs protéines (Cordin *et al.*, 2012, Kastner *et al.*, 2019). Parmi les protéines, 8 hélicases à ARN de la SF2 ont été identifiées comme des régulateurs spécifiques de l'épissage, impliquées dans le réarrangement conformationnel du pré-ARNm et dans le déplacement de protéines. Parmi ces hélicases, Prp5, Sub2 et Prp28 appartiennent aux hélicases à boîte DEAD ; Prp2, Prp16, Prp22 et Prp43 aux hélicases à boîte DEAH et Brr2 aux hélicases de type Ski2. Chacune de ces hélicases agit à une étape distincte du processus d'épissage pour favoriser les transitions entre les différents états d'épissage en remodelant les complexes protéine-ARN ou ARN-ARN (**Figure 10**). De façon surprenante, les hélicases à boîte DEAD sont nécessaires pendant l'assemblage du spliceosome, tandis que les autres hélicases activent, remodelent et recyclent le spliceosome catalytique (Will and Luhrmann, 2001, Plaschka *et al.*, 2019).

En bref, U1-snRNP se fixe sur le site d'épissage en 5', U2-snRNP se fixe sur le point de branchement grâce aux activités hélicases de Sub2 et Prp5, et forme le complexe A. Ce dernier s'associe à un complexe ternaire composé de U5-snRNP et de U4/U6-snRNP pour former le complexe pré-B qui est catalytiquement inactif. U1-snRNP se dissocie du complexe par l'activité hélicase de Prp28 et forme le complexe B. Ensuite, l'hélicase Brr2 déroule et dissocie U4/U6-snRNP du spliceosome. Cependant, il est intéressant de noter que pour éviter la dissociation prématurée de U4/U6-snRNP, l'hélicase Brr2 est bloquée par le facteur Prp8 qui obstrue le tunnel de liaison à l'ARN et bloque ainsi son activité ATPase (Mozaffari-Jovin *et al.*, 2013). L'ARNsn U6 ainsi libéré s'associe ensuite sur une partie de l'ARNsn U2 pour créer le site actif. Le spliceosome se stabilise avec la liaison des complexes NTC (*nineteen complex*) et NTR (*ninteen-related*). Avec l'action de l'hélicase Prp2, le spliceosome se transforme en un centre catalytiquement actif et forme le complexe B*. Le cycle catalytique comprend deux étapes de trans-esterification faisant intervenir d'autres hélicases. Au final, l'activité hélicase de Prp22 libère les exons ligaturés (ARNm mature) du complexe post-épissage appelé P qui, à son tour, est désassemblé par l'activité hélicase de Prp43 pour être recyclé (**Figure 10**) (Plaschka *et al.*, 2019).

Cependant d'autres hélicases à ARN ont également été associées à l'épissage. C'est le cas de l'hélicase Ded1 qui a initialement été identifiée comme un suppresseur génétique d'une mutation dans le gène *PRP8*, dont la protéine est un composant majeur de U5-snRNP (Jamieson and Beggs, 1991). Ded1 a également été trouvée associée au spliceosome suite à des analyses par spectrométrie de masse (Stevens *et al.*, 2002). Il en est de même pour son orthologue humain DDX3, même si elle interagit uniquement avec des ARNm associés à l'EJC (Zhou *et al.*, 2002, Merz *et al.*, 2007). De plus, une analyse de puces à ADN a montré que deux mutants de Ded1 présentent un défaut d'épissage du pré-ARNm. Cette même étude a montré que Ded1 s'associe physiquement aux snRNP du spliceosome (Burckin *et al.*, 2005).

Curieusement, Ded1 a été trouvée associée à l'ARN polymérase II *in vivo*, par des expériences de réticulation, suggérant qu'elle s'associe sur l'ARN très tôt (Tardiff et al., 2007). Ces différentes données suggèrent fortement une fonction de Ded1 dans l'épissage des pré-ARNm, cependant le rôle exact de Ded1 dans ce processus reste à être clarifié. Par ailleurs, chez la levure, l'épissage des introns de groupe I et II mitochondriaux est médié par une hélicase à boîte DEAD, Mss116 (Huang *et al.*, 2005). De façon intéressante, Ded1 a également été associée à l'épissage dans la mitochondrie. Elle peut se substituer à la protéine Mss116 et peut stimuler l'épissage des introns d'une manière dépendante de l'ATP *in vivo* et *in vitro* (Solem *et al.*, 2006, Del Campo *et al.*, 2009, Halls et al., 2007).

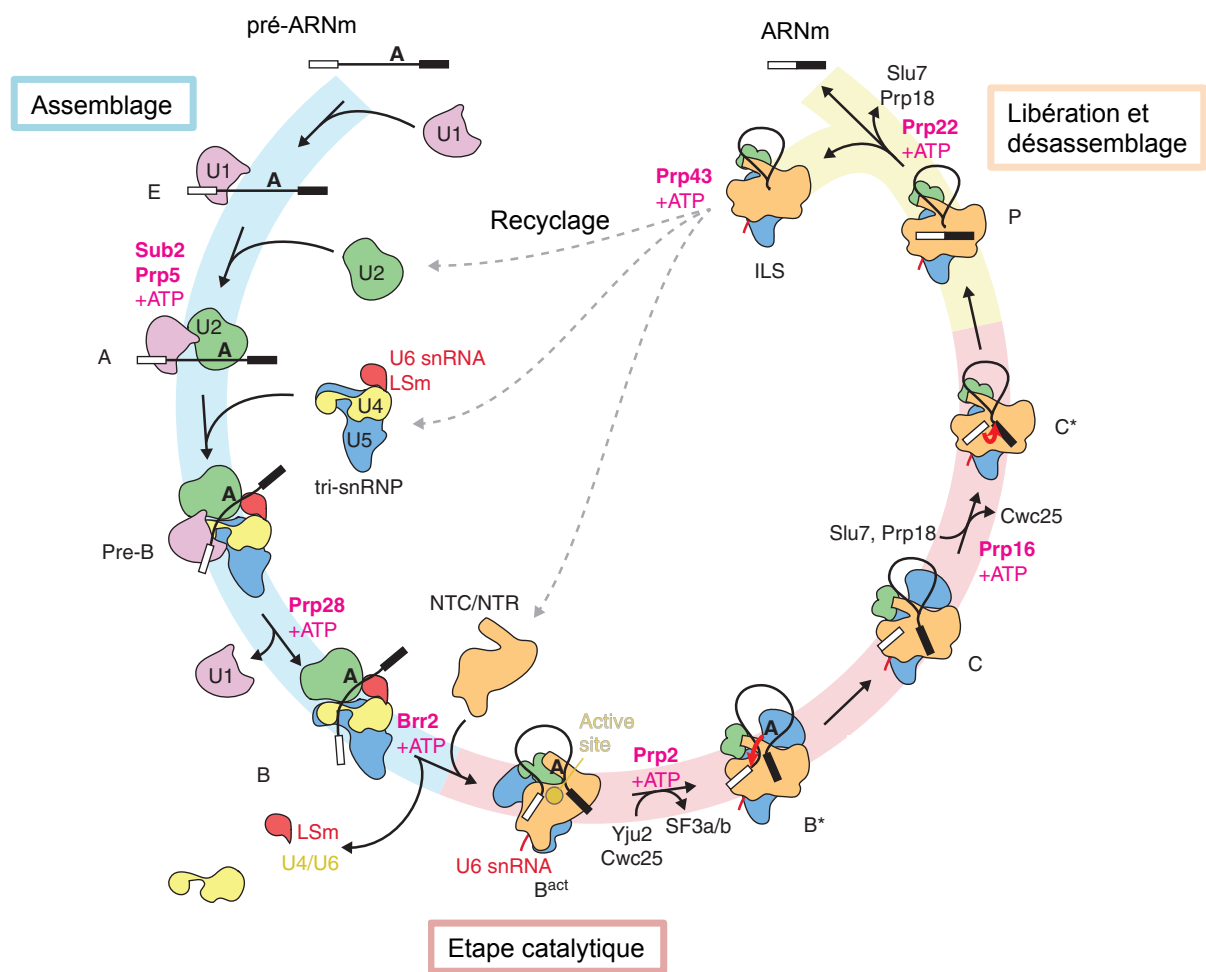


Figure 10 : Rôle des hélicases à ARN dans l'épissage d'un pré-ARNm dans le noyau

Le spliceosome a été isolé dans au moins 10 états distincts, à savoir E, A, pré-B, B, B^{act}, B^{*}, C, C^{*}, P et le complexe ILS (*intron lariat spliceosome*). Les transitions entre ces états sont régulées par les hélicases de la SF2. Les hélicases à boîte DEAD Prp5, Sub2 et Prp28 sont nécessaires pour l'assemblage du spliceosome, l'hélicase Brr2 de type Ski2 favorisent un réarrangement important conduisant à la formation du site actif. Les hélicases à boîte DEAH Prp2, Prp16, Prp22 et Prp43 sont nécessaires pour la formation d'un spliceosome catalytiquement actif et pour les étapes de libération de l'ARNm et le désassemblage du spliceosome. Au cours du cycle d'épissage, d'autres protéines non snRNP se joignent à la réaction, à savoir le complexe NTC et le complexe NTR. Figure adaptée de la revue de Plaschka et ses coll, 2019.

Ded1 est une protéine cytoplasmique qui, normalement, ne peut pas rencontrer d'introns mitochondriaux. Une explication à ce phénomène viendrait du fait que Ded1 et Mss116 partagent des caractéristiques communes, comme la présence d'un domaine C-terminal riche en arginine, et fonctionnent comme des chaperons d'ARN généraux (Del Campo et al., 2009).

2.3.2. Rôle dans l'export de l'ARN

Dans les cellules eucaryotes, les ARN nouvellement transcrits dans le noyau doivent, pour la plupart, rejoindre le cytoplasme pour être traduits en protéine ou participer à la traduction. Ceci est réalisé grâce à une machinerie d'au moins trois catégories de protéines de fonctions différentes regroupées sur l'enveloppe nucléaire (i) les nucléoporines en tant que constituants des complexes de pores nucléaires (NPC), (ii) les récepteurs de transports nucléaires, (iii) et les composants qui fournissent l'énergie nécessaire pour le transport (Güttler and Görlich, 2011). Il existe différentes voies de transport pour chaque ARN, mais indépendamment de la voie utilisée, pendant la transcription l'ARN est rapidement recouvert de protéines, dont un récepteur de transport nucléaire, pour former une RNP. Pour l'ARNm par exemple, un 7-méthyl guanosine triphosphate (m7G) et une queue poly(A) sont ajoutés co-transcriptionnellement respectivement à l'extrémité 5' et 3'. La modification en 5' protège l'ARNm de la dégradation par l'exonucléase Xrn1 qui a une activité de dégradation 5'-3' et est reconnue par les protéines Cbp20 et Cbp80 qui va former le complexe liant la coiffe (CBC, *Cap-binding complex*) important pour le transport de l'ARNm. La queue poly(A), composée d'environ 60 adénines chez la levure, ajoutée par la poly(A) polymérase, est reconnue par d'autres protéines liant l'ARN (RBP, *RNA binding proteins*) comme Nab2 impliquée dans la régulation de la polyadénylation des ARNm et dans l'export de l'ARNm. Ces modifications ont pour but de protéger l'ARNm des activités de dégradation 5'-3' et 3'-5' (Köhler and Hurt, 2007).

De façon générale, le transport de tous les ARN et d'un sous-ensemble d'ARNm nécessite des karyophérines, une famille de récepteurs de transport nucléaire conservés, qui reconnaissent un court signal peptidique de localisation (NLS, *nuclear localisation signal*) ou d'export nucléaire NES sur une protéine de cargaison (Görlich and Kutay, 1999). Les karyophérines impliquées dans l'importation sont appelées importines, et celles impliquées dans l'export sont appelées exportines. Le chargement et déchargement des récepteurs avec des molécules de cargaison sont régulés par la petite GTPase Ran qui est liée au GTP dans le noyau et liée au GDP dans le cytoplasme. Cette répartition dans des compartiments cellulaires distincts établit un gradient qui utilise l'énergie métabolique fournie par le système Ran GTPase comme force motrice pour un transport directionnel (Güttler and Görlich, 2011, Cook *et al.*, 2007).

Pour ce qui est de l'export, les classes d'ARN ayant des structures communes, comme les ARNt et les ARNr, présentent des éléments d'identité qui peuvent être décodés par des récepteurs d'export spécifiques. Or, les ARNm diffèrent en longueur, séquence et structure, et doivent utiliser d'autres stratégies pour trouver leurs récepteurs de transport nucléaire. Classiquement, il existe deux récepteurs d'export de l'ARNm impliqués dans deux voies distinctes à travers le NPC : la karyophérine Xpo1 (CRM1 chez les mammifères) (Stade *et al.*, 1997, Adachi and Yanagida, 1989) et l'hétérodimère Mex67/Mtr2 (NXF1/NXT1 chez les mammifères, également appelé TAP/p15 (Segref *et al.*, 1997, Grüter *et al.*, 1998) (**Figure 11**).

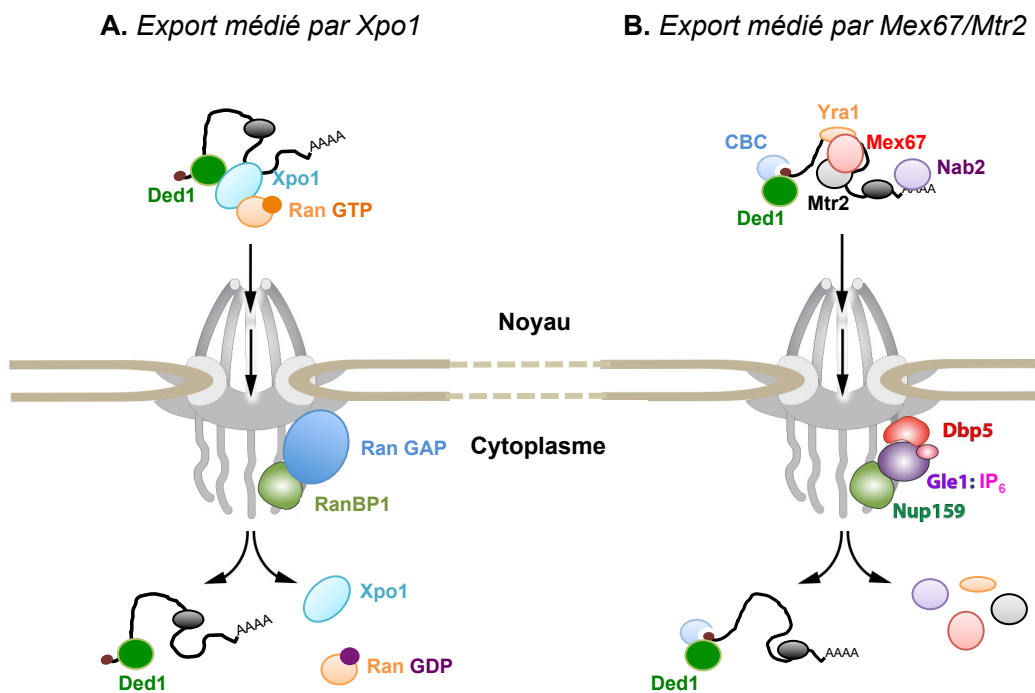


Figure 11 : Représentation schématique des deux voies d'export de l'ARNm

Chez la levure, après la transcription plusieurs protéines de liaison à l'ARN (le complexe liant le cap (CBC) et d'autres (noir)) s'assemblent pour former une RNP. Il existe deux récepteurs d'export de l'ARNm impliqués dans deux voies distinctes à travers le NPC. **A.** L'export médié par Xpo1 dépend de Ran GTP. Xpo1 associée à Ran GTP reconnaît la séquence NES sur la RNP à exporter (ici NES de Ded1). La RNP qui émerge du côté cytoplasmique rencontre une GTPase Ran GAP, qui avec son cofacteur RanBP1, hydrolyse Ran GTP en Ran GDP qui provoque le désassemblage du RNP. Ran GDP est incapable de se lier sur Xpo1 assurant un transport unidirectionnel. **B.** Le récepteur Mex67/Mtr2 est recruté vers la RNP via des protéines adaptatrices telles que Yra1 et Nab2. La RNP qui émerge du côté cytoplasmique rencontre ensuite une machinerie de remodelage sur le NPC comprenant Nup159, l'ARN hélicase à boîte DEAD Dbp5 et ses activateurs Gle1 et IP₆. Cette machinerie favorise le remodelage des interactions ARN-protéine et permet le recyclage des récepteurs et adaptateurs tout en assurant un transport unidirectionnel. Il a été proposé par Senissar et ses coll., 2014, que Ded1 soit un facteur associé au CBC faisant la navette entre le cytoplasme et le noyau.

La majorité des ARNm exprimés de manière constitutive utilise la voie Mex67/Mtr2 médiée par plusieurs protéines adaptatrices qui sont indépendantes du cycle RanGTP. Un sous-

ensemble d'ARNm, d'ARNsn, d'ARNr et de l'ARN de la particule de reconnaissance du signal (SRP) sont exportés par une voie dépendante de Xpo1, médiée par des protéines adaptatrices qui ont une NES (Hutten and Kehlenbach, 2007). Le récepteur de transport est recruté sur la RNP, traverse le NPC grâce aux interactions avec les protéines du NPC, comme la nucléoporeine Nups qui possèdent des domaines avec plusieurs répétitions phénylalanine-glycine. Finalement, la RNP sortant du NPC subit d'importants changements conformationnels et de composition. Par exemple, la libération de la cargaison médiée par la voie dépendante de Xpo1 est dirigée par l'hydrolyse de Ran GTP (**Figure 11A**). Alors que pour la voie Mex67/Mtr2, le remodelage de la RNP au niveau de la face cytoplasmique nécessite deux protéines du NPC, Nup159 et Nup42, qui recrutent le facteur d'export de l'ARN Gle1 et son cofacteur inositol hexakisphosphate (IP₆) qui s'associent et activent une ARN hélicase à boîte DEAD Dpb5 (DDX19B chez les mammifères) (**Figure 11B**). Dbp5 activée déclenche le remodelage de la RNP en déplaçant les protéines pour faciliter la directionnalité de l'export au travers du noyau vers le cytoplasme (Alcázar-Román *et al.*, 2006, Lari *et al.*, 2019).

Par ailleurs, d'autres hélicases à boîte DEAD ont été associées à l'export. Il a été montré que Dbp2 interagit et est nécessaire pour l'assemblage efficace de Yra1 et Mex67 sur l'ARNm. De façon intéressante, Yra1 inhibe l'activité de déroulement de Dbp2 en réduisant son affinité de liaison à l'ARN *in vitro* (Ma *et al.*, 2013, Ma *et al.*, 2016). Par ailleurs, Bolger et ses coll. ont montré que Gle1, en plus de s'associer avec Dpb5, s'associerait à Ded1 et inhiberait son activité ATPase (Bolger and Wentz, 2011, Aryanpur *et al.*, 2017). Cependant, ce résultat est contradictoire avec celui obtenu par mon laboratoire (Senissar *et al.*, 2014). Cette contradiction viendrait probablement de la différence dans l'utilisation d'ARN ainsi que la concentration de protéines utilisées pour les tests ATPases. Cette même étude a montré que (i) Ded1 peut transiter entre le noyau et le cytoplasme par les voies d'export médiées par Mex67/Mtr2 et Xpo1 et (ii) qu'il y a une interaction génétique et physique avec les protéines de liaison la queue poly(A) Nab2 dans le noyau et Pab1 dans le cytoplasme et les protéines de liaison au CBC (Senissar *et al.*, 2014). Une autre étude a montré que Ded1 s'associe à Xpo1, via la séquence NES, et Ran GTP. Cependant, cette association diminue l'activité hélicase et ATPase de Ded1 sur un substrat ARN *in vitro* (Hauk and Bowman, 2015). Il a été proposé que Xpo1 pourrait empêcher Ded1 de remodeler efficacement le 5'UTR de l'ARNm, empêchant ainsi l'initiation de la traduction. Des résultats similaires ont été obtenus avec les orthologues DDX3X, Belle et An3 (Askjaer *et al.*, 2000, Yedavalli *et al.*, 2004, Sekiguchi *et al.*, 2004, Lai *et al.*, 2008, Beckham *et al.*, 2008). Par exemple, DDX3X facilite l'export des ARN du VIH et du virus de l'hépatite C via le récepteur CRM1 (Yedavalli *et al.*, 2004, Shih *et al.*, 2008). Elle transporte également des ARNm via la voie médiée par TAP/p15 (Lai *et al.*, 2008).

2.3.3. Rôle dans la biogenèse du ribosome

Le ribosome est un très grand complexe RNP assurant le décodage de l'ARNm dans la synthèse des protéines. Chez la levure, la biogenèse du ribosome est un processus essentiel hautement complexe et dynamique nécessitant environ 200 facteurs agissants à différents stades afin de modifier et cliver l'ARNr précurseur (pré-ARNr) (Li *et al.*, 2009b). La biogenèse démarre dans le nucléole et se termine dans le cytoplasme après l'export et enfin la maturation finale des sous-unités ribosomiques (Venema and Tollervey, 1999). En bref, les gènes codants les ARNr sont en tandem sur le chromosome XII et sont transcrits par deux ARN polymérases distinctes. Il y a synthèse d'un grand transcrit, le pré-ARNr 35S, par l'ARN polymérase I et synthèse de l'ARNr 5S par l'ARN polymérase III. Au cours de la biogenèse, le pré-ARNr 35S donne naissance aux ARNr 25S, 5,8S et 18S grâce à l'intervention de nombreux facteurs. En effet, le pré-ARNr 35S est d'abord clivé pour donner les espèces 20S et 27SA₂. Le pré-ARNr 20S est traité dans le cytoplasme pour former l'ARNr 18S, alors que le pré-ARNr 27SA₂ est traité dans le noyau par deux voies différentes ; la majorité des produits de clivage forme le pré-ARNr 27SB_s tandis qu'une petite quantité forme le pré-ARNr 27SB_L. Les deux pré-ARN donnent ensuite l'ARNr 25S mature et le pré-ARNr 7S qui mature en un ARNr 5,8S suite à d'autres événements de clivage (Li *et al.*, 2009b, Woolford and Baserga, 2013). Les facteurs intervenants dans la maturation de l'ARNr sont des petits ARN nucléolaires, dites ARNsno (*small nucleolar*) et de nombreuses protéines non ribosomales incluant les nucléases, les pseudouridines synthases, les méthyltransférases et les hélicases qui vont faciliter le repliement des ARNr (Kressler *et al.*, 1999). Chez la levure, au moins 15 hélicases à boîte DEAD sont nécessaires pour la formation du ribosome 80S. Ce dernier possède 2 sous-unités : la grande sous-unité 60S et la petite sous-unité 40S (**Figure 12**). La grande sous-unité est composée d'environ 46 protéines ribosomiques et trois ARNr (5S, 5,8S et 25S). Elle possède une poche de liaison à l'ARNt composée d'un centre peptidyltransférase qui catalyse la formation de la liaison peptidique lors de l'élongation des protéines. La petite sous-unité est composée d'environ 32 protéines ribosomiques et d'un ARNr (18S) (Schäfer *et al.*, 2003). Elle possède un centre de décodage qui sélectionne le bon ARNt sur le codon de l'ARNm. Enfin, l'interface entre les deux sous-unités forme un sillon où passe l'ARNm en cours de traduction ainsi qu'un tunnel de sortie de la protéine en cours de formation (Ben-Shem *et al.*, 2010).

Dans une étude portant sur la biogenèse de la petite sous-unité du ribosome, Ded1 a été trouvée associée à des protéines de la sous-unité précurseur 40S (pré-40S) et mature se trouvant respectivement dans le noyau et cytoplasme, suite à des expériences de purification par immunoprécipitation (Schäfer *et al.*, 2003). Une autre étude, utilisant la même technique, a soutenu ce résultat en montrant que Ded1 est associée au pré-ARNr 20S dans le cytoplasme et 7S dans le noyau, ce qui correspond respectivement à la sous-unité pré-40S et pré-60S

(Yarunin *et al.*, 2005). De plus, Ded1 a été identifiée dans une étude prédisant les gènes susceptibles de participer à la biogenèse du ribosome à travers une analyse informatique d'un réseau de gènes fonctionnels de levure reconstruit à partir de diverses données génomiques et protéomiques. La validation expérimentale a été réalisée en examinant l'effet de l'absence de Ded1 en utilisant une souche de levure où le gène *DED1* est sous le contrôle d'un promoteur qui est inhibé par l'ajout de doxycycline (Li *et al.*, 2009b). L'absence de Ded1 a entraîné une accumulation du pré-ARNr 27SA ainsi que le pré-ARNr 20S (Li *et al.*, 2009b).

Cependant toutes ces études ne permettent pas de conclure sur le rôle exact de Ded1 dans la biogenèse du ribosome. Il peut s'agir d'un effet indirect de Ded1, c'est pourquoi une étude plus approfondie est nécessaire.

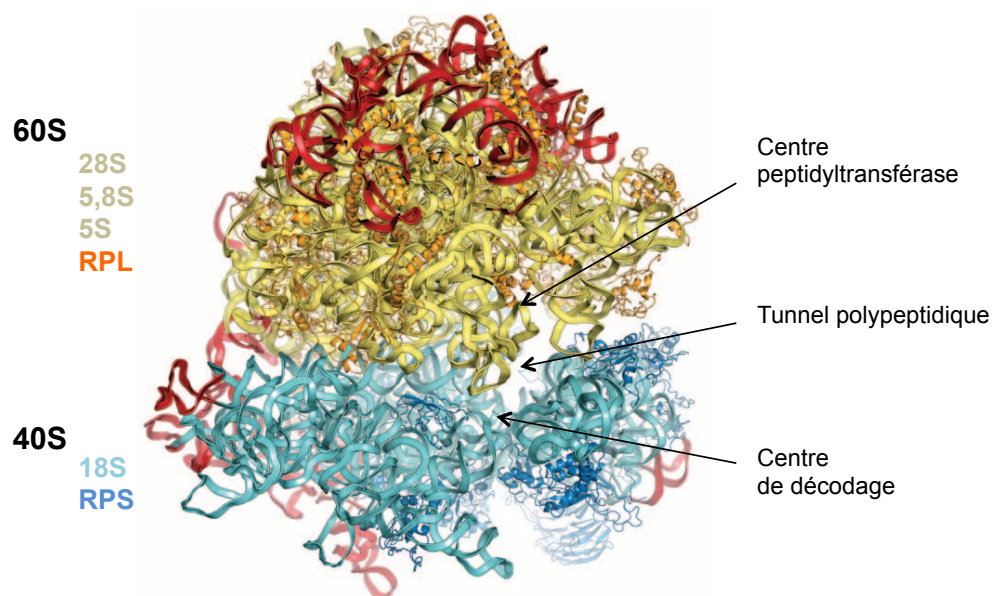


Figure 12 : Structure cristalline du ribosome 80S chez la levure *S. cerevisiae*

Les protéines de la grande sous-unité ribosomale 60S (RPL, *Ribosomal protein of the large subunit*) sont colorées en jaune foncé, l'ARNr en jaune clair. Les protéines de la petite sous-unité ribosomale 40S (RPS, *Ribosomal protein of the small subunit*) sont colorées en bleu foncé, les ARNr en bleu clair. Les segments d'extensions des ARNr sont représentés en rouge. PDB : 3O2Z. Figure adaptée de l'article de Ben-Shem et ses coll, 2010.

2.3.4. Rôle dans la traduction

La traduction commence après le passage de l'ARNm du noyau vers le cytoplasme. Il s'agit d'un processus hautement régulé qui permet le décodage de l'information génétique contenue dans l'ARNm en protéine grâce à une machinerie complexe pilotée par le ribosome. La traduction est un mécanisme bien conservé dans tous les domaines de la vie et comporte quatre phases principales : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage (Choi *et al.*,

2018). La très grande majorité des études qui a été réalisée jusqu'à maintenant montre que Ded1 est une hélicase impliquée dans l'initiation de la traduction. C'est pourquoi cette sous-partie concernera plus particulièrement l'étape initiale de la traduction.

Caractéristiques de l'ARNm

Un ARNm eucaryote comprend une coiffe et une région non traduite en 5', dite 5' UTR (*untranslated transcribed region*), une phase ouverte de lecture, dite ORF (*open reading frame*), commençant par un codon d'initiation et se terminant par un codon stop, et une deuxième région non codante en 3', dite 3'UTR, accompagnée d'une queue poly(A). La région 5'UTR a un rôle important dans la formation du ribosome 80S et la synthèse des protéines d'un point de vue de sa taille, de la présence d'éléments régulateurs et de structure secondaire. En effet, une analyse à l'échelle du génome chez la levure a permis de caractériser la région 5'UTR d'environ 80% des gènes (Nagalakshmi *et al.*, 2008) et de révéler une longueur moyenne de 53 nucléotides. Chez l'homme, elle est de 218 nucléotides (Hernández *et al.*, 2010). De façon intéressante, les ARNm avec des 5'UTR courts (<12 nucléotides) sont sujet à une dégradation non-sens (NMD, *nonsense-mediated decay*) qui dégrade des ARNm portant des codons stop prématurés afin d'éviter la production de protéines tronquées, en raison des ribosomes qui contournent le premier codon de départ, initiant la traduction sur des sites en aval (Arribere and Gilbert, 2013). En plus de l'ORF principale, il a été montré que certains ARNm contiennent une ou plusieurs phases codantes appelées uORF dans leurs 5'UTR, qui vont avoir un rôle dans la régulation de la traduction. Ces uORF sont également la cible du NMD (Arribere and Gilbert, 2013). Pour finir, selon un modèle établi dans les années 80, la présence de structures stables dans la région 5'UTR influence la traduction par au moins deux mécanismes différents; les structures secondaires près de la coiffe pourraient empêcher l'association du ribosome. Il en est de même pour les structures secondaires plus loin de la coiffe qui empêchent le balayage du ribosome (Kozak, 1989, Baim and Sherman, 1988). Malgré le fait que le ribosome possède une activité ARN hélicase constitutive (Takyar *et al.*, 2005), il a largement été établi que les structures secondaires riches en nucléotides G et C dans la région 5'UTR de l'ARNm peuvent bloquer l'initiation de la traduction (Berthelot *et al.*, 2004, Sen *et al.*, 2015, Kozak, 2005).

Etapes de l'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction est l'étape la plus complexe de la synthèse des protéines. Chez les eucaryotes, elle démarre avec le recrutement de la petite sous-unité ribosomique 40S et des facteurs d'initiation sur le CBC, se situant dans la région 5'UTR de l'ARNm, afin d'assembler un complexe ribosomique 80S (Hinnebusch and Lorsch, 2012). Elle peut être divisée en 5 étapes ; **(i)** le facteur eIF2 lie le GTP et l'ARNt initiateur méthionine (ARNt^{met})

pour former un complexe ternaire (TC). Ce dernier s'associe sur le ribosome 40S accompagné des facteurs eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 pour former le complexe de pré-initiation 43S (PIC), **(ii)** parallèlement, il y a l'activation de l'ARNm grâce à la liaison du complexe eIF4F composé de eIF4E, eIF4A et eIF4G. Le facteur eIF4E est une protéine qui se lie à la coiffe de l'ARNm. La protéine eIF4A est une hélicase à ARN à boîte DEAD importante pour résoudre des structures qui empêcheraient la fixation du ribosome sur l'ARNm, enfin eIF4G est une protéine d'échafaudage hébergeant 3 sites de liaison à l'ARN (RNA1, RNA2 et RNA3). La protéine de liaison à la queue poly(A) en 3', Pab1, interagit avec eIF4G au niveau de la coiffe circularisant ainsi l'ARNm (Wells *et al.*, 1998), **(iii)** le PIC 43S est recruté sur l'ARNm par l'intermédiaire de eIF4G qui interagit avec eIF3 et forme le PIC 48S. Ce dernier est dit « ouvert » (*P in*) et est compétent pour scanner l'ARNm à la recherche d'un codon de départ AUG de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (Kozak, 1984), **(iv)** une fois le codon de départ sélectionné par l'ARNt^{met}, il y a éjection de eIF1 à partir du PIC et recrutement du facteur eIF5B-GTP qui favorise l'hydrolyse du GTP par eIF2 ; cela entraîne le passage d'un état « ouvert » à « fermé » (*P out*) qui arrête le balayage du ribosome. Parallèlement, il y a libération et recyclage de nombreux facteurs d'initiation, **(v)** enfin, l'hydrolyse de eIF5B entraîne sa libération et la liaison de la grande sous-unité ribosomique 60S pour former le 80S. Le ribosome est alors compétent pour l'étape d'élongation de l'ARNm (**Figure 13**). Cependant, le ribosome doit souvent naviguer à travers des régions qui contiennent des structures secondaires ou des protéines liées, et de l'énergie doit être fournie pour surmonter ces barrières. Dans la plupart des cas, cela nécessite l'action des hélicases (Parsyan *et al.*, 2011).

Ded1 dans l'initiation de la traduction

En 1988, Linder et ses coll. ont identifié la protéine eIF4A impliquée dans l'initiation de la traduction chez la levure (Linder and Slonimski, 1988). L'analyse de sa séquence a permis de la définir comme « membre fondateur de la famille à boîte DEAD » (Linder et al., 1989, Rogers *et al.*, 2002). Cependant, l'activité enzymatique de eIF4A est relativement faible, *in vitro*, par rapport aux autres hélicases à ARN (Andreou and Klostermeier, 2013) et elle est stimulée par les protéines eIF4B et eIF4G (Parsyan et al., 2011, Sen, 2016, Andreou and Klostermeier, 2014). Il a été proposé que l'activité hélicase de eIF4A est nécessaire pour dissocier des interactions ARN-ARN de faible complexité et permettre le recrutement efficace du PIC 43S (Svitkin *et al.*, 2001, Sokabe and Fraser, 2017). Toutefois, les ARN présentant de long 5'UTR avec des structures secondaires complexes sont pris en charge par une deuxième hélicase impliquée dans l'initiation de la traduction, Ded1 (Berthelot et al., 2004). Il a été montré que ces deux hélicases sont essentielles et non interchangeables suggérant qu'elles vont avoir des rôles distincts et importants dans la traduction (Linder and Slonimski, 1989, Struhl, 1985, Chuang et al., 1997).

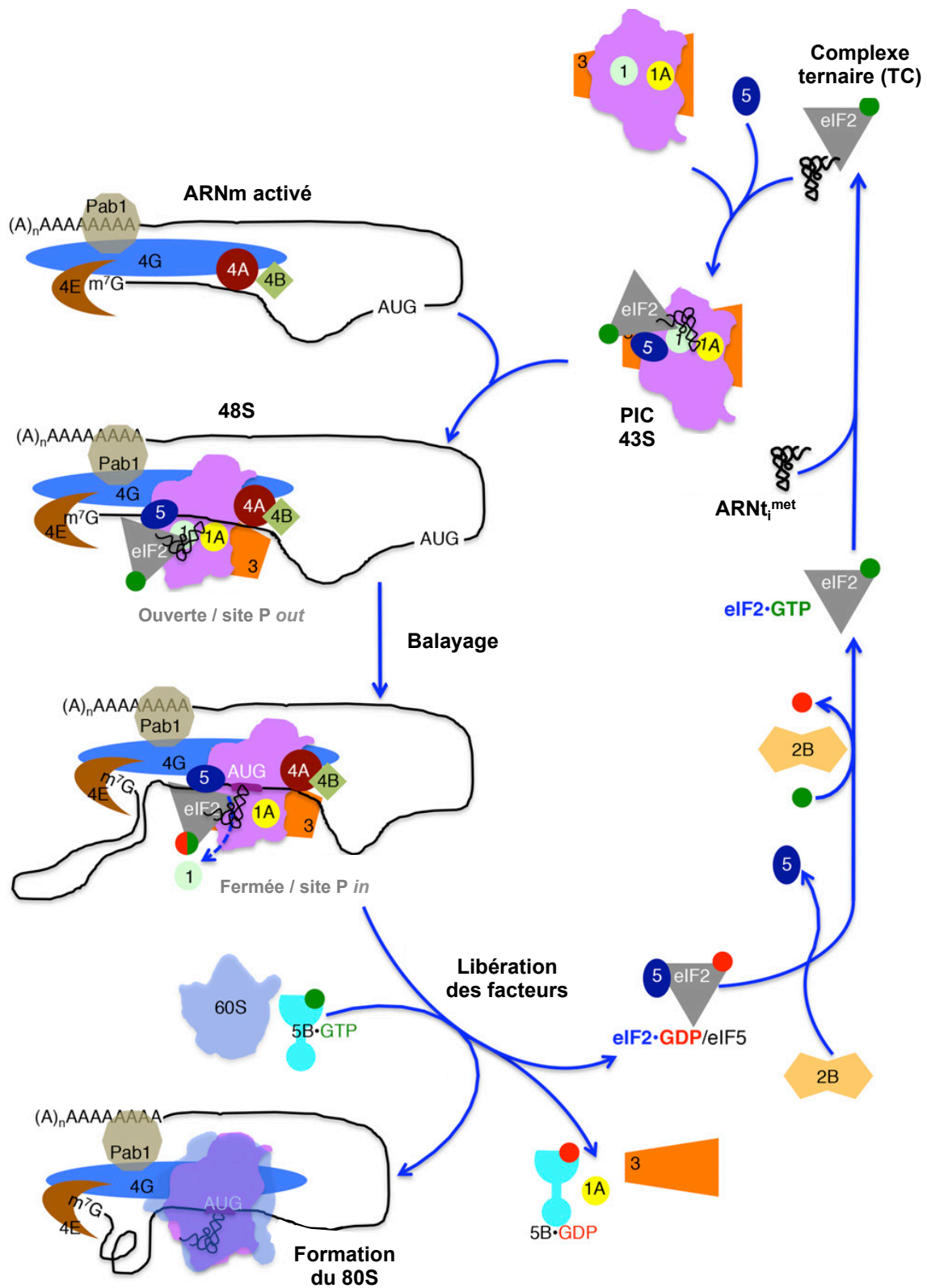


Figure 13 : Représentation schématique de l'initiation de la traduction chez les eucaryotes

Facteurs d'initiation eucaryotes (eIF) 1, 1A, 2, 2B, 3, 4A, 4B, 4E, 4G, 5, 5B. P *out* ou P *in* : l'ARNt_i^{met} est ou n'est pas entièrement apparié dans le site P de la sous-unité ribosomique 40S. Figure adaptée de la revue de Dever et ses coll, 2016.

Depuis sa découverte, Ded1 a été associée à pratiquement toutes les voies faisant intervenir l'ARN sans qu'on puisse lui attribuer pour autant un rôle clair. Cette incertitude sur le rôle que peut réellement avoir Ded1 a même été évoquée par Hayashi N. en 1996 par cette phrase : « Il est clair que Ded1 est une protéine mystérieuse impliquée dans de nombreux processus ». Un an plus tard, cette incertitude a été levée par deux études qui ont apporté une clarification quant au rôle de Ded1 dans la cellule. Ces études ont conjointement conclu que Ded1 est un deuxième facteur de traduction essentiel, en plus de la protéine eIF4A (Chuang et al., 1997, de la Cruz *et al.*, 1997). En effet, ces études montrent que (i) la déplétion de Ded1 inhibe la synthèse des protéines, qui peut être sauvée par l'ajout de Ded1 recombinante, (ii) la mutation de Ded1 entraîne une accumulation rapide du ribosome 80S accompagnée d'une réduction importante des polysomes, (iii) Ded1 est principalement localisée dans le cytoplasme, au lieu du noyau comme on pourrait s'y attendre pour son rôle dans l'épissage et l'export de l'ARNm et (iv) une surexpression de Ded1 entraîne une inhibition de la traduction. De plus, il a été démontré par plusieurs laboratoires, dont le mien, que Ded1 interagit génétiquement et physiquement avec le complexe eIF4F (Hilliker *et al.*, 2011, Senissar et al., 2014).

D'un point de vue génétique, elle agit comme un suppresseur multicopie de l'allèle mutant *CDC33* qui code la protéine eIF4E. De plus, des mutations cryosensibles des gènes de *DED1* et de *TIF1* (codant pour la protéine eIF4A) entraînent une létalité lorsqu'elles sont exprimées ensemble suggérant qu'elles jouent deux rôles indépendants dans la traduction. Cette hypothèse a été renforcée par le constat que la surexpression de eIF4A ne supprime pas les défauts de croissance de l'allèle mutant *DED1* (Chuang et al., 1997, de la Cruz et al., 1997). Plus tard, Hinnebush et ses coll. ont cherché à déterminer si eIF4A et Ded1 remplissent des fonctions redondantes dans l'initiation de la traduction. Pour cela, ils ont utilisé deux mutants sensibles à la température (affectant la traduction) des deux protéines et ont réalisé un « *ribosome profiling* » à l'échelle du génome afin d'identifier les ARNm ayant une traduction altérée. Les résultats de cette étude, assez intéressante, ont montré que eIF4A est essentielle pour la traduction de pratiquement tous les ARNm *in vivo* et que Ded1 est nécessaire pour surmonter les effets inhibiteurs de structures secondaires sur le 5'UTR de certains messagers (Sen et al., 2015). D'autres études ont confirmé ces résultats (Yourik *et al.*, 2017, Sen et al., 2019, Gupta *et al.*, 2018, Guenther *et al.*, 2018). Une analyse de la traduction à l'échelle du transcriptome montre que Ded1 se lie sur pratiquement tous les ARNm exprimés, principalement sur les 5'UTR sans avoir un site de fixation précis, mais aussi sur l'ARNr, en particulier sur l'hélice 16 (canal d'entrée de l'ARNm) de l'ARNr 18S de la sous-unité ribosomique 40S (Guenther et al., 2018). Cette dernière étude est cohérente puisque Ded1 se lie sur le PIC. De manière concordante, il en est de même pour son orthologue humain DDX3X (Oh *et al.*, 2016, Calviello *et al.*, 2019). Par conséquent, les orthologues Ded1 et DDX3X ont probablement une fonction conservée dans la régulation de la traduction en

remodelant les 5'UTR des ARNm pendant l'initiation de la traduction. De même, la protéine eIF4B se lie également sur l'hélice 16 de l'ARNr 18S et induit des changements structuraux au niveau du canal d'entrée du ribosome 40S (Walker *et al.*, 2013). Ceci est cohérent avec les observations selon lesquelles eIF4B et Ded1 coopèrent dans l'initiation de la traduction (Walker *et al.*, 2013).

D'un point de vue physique, Ded1 interagit avec eIF4G via son domaine C-terminal (Hilliker *et al.*, 2011, Senissar *et al.*, 2014, Aryanpur *et al.*, 2019, Gao *et al.*, 2016). Des études montrent que la protéine eIF4G recrute des facteurs ayant des motifs RGG pour réprimer la traduction en empêchant la fixation du PIC 43S (Rajyaguru *et al.*, 2012, Thandapani *et al.*, 2013). De façon intéressante, Ded1 possède deux motifs RGG dans son domaine C-terminal probablement important dans la fixation avec eIF4G et la régulation de la traduction. De plus, Ded1 interagit avec eIF4A via son domaine N-terminal et augmente l'activité de déroulement de Ded1 (Hilliker *et al.*, 2011, Senissar *et al.*, 2014, Gao *et al.*, 2016). Enfin, il a été montré par mon laboratoire que Ded1 interagit avec eIF4E (Senissar *et al.*, 2014). Plus récemment, les endroits exacts des interactions avec les différentes protéines de eIF4F ont été déterminés (Gulay *et al.*, 2020). Les liaisons de eIF4A et 4E ne se chevauchent pas sur Ded1 et semblent être importantes pour l'initiation de la traduction. Étonnamment, le site de fixation de eIF4E est différent du site de fixation putative qui avait été déterminé auparavant (**Figure 8**) (Floor *et al.*, 2016). Des systèmes reconstitués de traduction *in vitro* ont permis de mettre la lumière sur le rôle de Ded1 dans ce processus, même si ce n'est toujours pas clair. De plus, Hinnebush et ses coll. ont montré que Ded1 est important pour l'assemblage du PIC 48S sur des ARNm (Gupta *et al.*, 2018). En effet, des perturbations dans l'association avec les protéines eIF4A et 4E dans le domaine N-terminal de Ded1 réduit l'assemblage du PIC 48S (Gulay *et al.*, 2020). Les données résumant les résultats précédents ont été représentées sur la **Figure 14**.

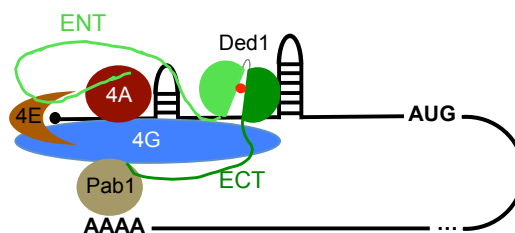


Figure 14 : Partenaires protéiques de Ded1 dans l'initiation de la traduction

Le rôle de l'orthologue humain DDX3X dans la traduction est contradictoire. Tout d'abord, deux études ont montré que DDX3X est un facteur général de l'initiation de la traduction (Lee *et al.*, 2008, Geissler *et al.*, 2012). Puis, d'autres études ont montré le contraire, (i) une mutation de DDX3X sensible à la température n'affecte pas la synthèse des protéines

(Fukumura *et al.*, 2003) et (ii) l'inhibition de DDX3X par l'utilisation d'ARN interférant n'a pas non plus affecté la synthèse des protéines mais affecte la croissance cellulaire (Lai *et al.*, 2008, Lai *et al.*, 2010). Une explication à ce phénomène a été amenée par plusieurs études qui montrent que DDX3X ne joue pas un rôle clé dans la traduction générale mais est nécessaire pour la traduction d'un sous-ensemble d'ARNm cellulaires et viraux qui ont une structure secondaire dans leurs 5'UTR (Soto-Rifo *et al.*, 2012, Soto-Rifo *et al.*, 2013, Valentin-Vega *et al.*, 2016) ou encore au niveau de la séquence codante ou du 3'UTR (Oh *et al.*, 2016, Calviello *et al.*, 2019).

Etapas de l'élongation et terminaison de la traduction

Jusqu'à maintenant Ded1 n'a pas été associée à l'élongation ou à la terminaison de la traduction. Mais compte tenu de son rôle crucial dans l'initiation, il ne faut pas écarter la possibilité qu'elle peut également être impliquée dans les autres étapes de la traduction. Brièvement, une fois que le ribosome s'assemble sur le codon de départ AUG, il y a une translocation qui s'opère jusqu'à ce qu'un codon d'arrêt, dit codon stop (UAA, UAG ou UGA), atteigne le centre de décodage du ribosome. Le ribosome possède 3 sites de liaison à l'ARNt : A (aminoacyl ou accepteur), P (peptidyl) et E (*exit*). Au cours du cycle d'élongation de la synthèse des protéines, l'ARNt aminoacylé, c'est-à-dire portant un acide aminé sur l'extrémité 3', se lie sur le site A du ribosome accompagné du facteur d'élongation eEF1A et GTP. L'hydrolyse du GTP entraîne la libération de eEF1A et la liaison de l'acide-aminé du site P avec celui du site A. Cette liaison se fait grâce au centre peptidyltransférase de la sous-unité 60S. Ensuite, une deuxième GTPase, eEF2, entraîne la translocation du ribosome. Suite à cela, l'ARNt « libre » se retrouve sur le site E, le site P se retrouve avec l'ARNt accompagné de l'enchaînement d'acides aminés et le site A est libre pour accueillir un nouvel ARNt aminoacylé, et ce jusqu'à ce que le ribosome rencontre un des trois codons de terminaison (Dever *et al.*, 2018). Enfin, la terminaison de la traduction est catalysée par les protéines eRF1 et la GTPase eRF3. La protéine eRF1 est un homologue structural de l'ARNt et contient un motif qui reconnaît le codon stop sur l'ARNm au niveau du site A (Dever *et al.*, 2016). L'hydrolyse de la GTP de eRF3 entraîne le positionnement de eRF1 sur le codon stop (Pisarev *et al.*, 2007). Ensuite, le facteur Rli1 recruté sur le ribosome entraîne sa dissociation en deux sous-unités 60 et 40S (Dever *et al.*, 2018).

2.3.5. Rôle dans la formation de foci cellulaires

Les cellules sont souvent soumises à des changements environnementaux, tels qu'une carence en nutriment, un choc osmotique ou encore un changement de température. Parmi les réponses au stress développées par la cellule, la traduction et la stabilité de l'ARNm sont parmi les premières réponses contribuant à l'ajustement rapide du protéome. Les ARNm réprimés pour la traduction sont principalement regroupés dans les foci cellulaires (FC)

comme les granules de stress (GS) et les *P-bodies*, qui sont conservées de la levure à l'homme (Ivanov *et al.*, 2019). Il s'agit de granules cytosoliques dépourvus de membranes qui se forment dynamiquement par séparation de phase de ribonucléoprotéines composés d'ARNm et de protéines liant l'ARN, appelés mRNP. L'assemblage de ces granules fournit un moyen de contrôle de l'expression des gènes. La composition en ARNm et protéines diffère entre les deux types de granules, même si un certain nombre de composants semblent être partagés, mais leur rôle précis dans la réponse au stress est toujours un sujet de débat (Ivanov *et al.*, 2019, Wang *et al.*, 2018). Les granules de stress par exemple hébergent des protéines impliquées dans la traduction de l'ARNm, tandis que les *P-bodies* contiennent, en plus, des protéines impliquées dans la dégradation de l'ARNm (Wang *et al.*, 2018).

Plusieurs études ont montré que Ded1 colocalise avec des composants des *P-bodies* (Dcp2 et Edc3) et des granules de stress (Pub1) : lorsque les cellules sont privées de glucose, en présence de mutants de Ded1, lorsque Ded1 est surexprimée ou encore lorsque la cellule est stressée à haute température (**Annexe 1**) (Beckham *et al.*, 2008, Hilliker *et al.*, 2011, Iserman *et al.*, 2020). Les mêmes résultats ont été obtenus pour son orthologue DDX3X (Lai *et al.*, 2008). De plus, la surexpression de Ded1 entraîne également une accumulation d'autres facteurs de l'initiation de la traduction (eIF4F et eIF4B) dans des FC mais pas des facteurs du PIC 43S (Hilliker *et al.*, 2011).

Récemment, le principe de séparation de phase « liquide-liquide » est apparu comme un moyen de décrire l'assemblage de FC. Il s'agit d'un processus par lequel une solution homogène de composants, telles que les protéines, se sépare pour former une phase. Ces protéines ont des domaines de faible complexité (LCD) et/ou des régions intrinsèquement désordonnées (IDR) qui permettent la formation d'interactions faibles entre protéines et ARN facilitant la formation de maillage dynamique et ainsi permettre la séparation de phases (Banani *et al.*, 2016). Hondele et ses coll. ont montré que plusieurs protéines à boîte DEAD qui ont des LCD, dont Ded1 et DDX3X, contrôlent la liaison et la libération de l'ARN à travers leurs activités ATPases et participent à la régulation de l'assemblage et du renouvellement des FC (Hondele *et al.*, 2019). Il a été proposé que les protéines contenant des domaines MIF4G contrôlent le renouvellement des compartiments par séparation de phase. Il a été montré par exemple que l'interaction de Ded1 avec la protéine eIF4G qui a un domaine MIF4G (cf. 1.3.3), serait importante pour dissoudre la formation de condensat.

Après avoir passé en revue les différentes fonctions de Ded1, je vais poursuivre avec un dernier chapitre qui présente rapidement la SRP, pour laquelle j'ai mis en évidence un lien avec Ded1.

3. La particule de reconnaissance du signal

3.1. Introduction

Une cellule de levure contient environ 5000 protéines qui sont en grande majorité synthétisées par des ribosomes cytosoliques. La compartimentation des protéines nouvellement synthétisées est cruciale pour le maintien de l'homéostasie. En règle générale, beaucoup de protéines restent dans le cytoplasme alors qu'au moins la moitié est transférée soit dans un compartiment cellulaire (noyau, mitochondrie ou peroxyosome) soit pris en charge par le système de trafic cellulaire connu sous le nom de « voie sécrétoire » pour rejoindre un organite (RE, Golgi, lysosome), une membrane ou y être sécrétées. Le point de départ de cette dernière voie chez les eucaryotes est le RE, un vaste organite subcellulaire. La principale voie de ciblage co-translationnel des peptides naissants, portant une séquence signal en N-terminal, est médiée par un grand complexe de ribonucléoprotéines très conservé, la particule de reconnaissance du signal (SRP). Il existe deux autres voies post-translationnelles qui ciblent les protéines ayant une séquence signal plutôt en C-terminal dans le RE, indépendamment de la SRP : la voie SND (*single targeting pathway*) et la voie GET (*tail-anchored proteins pathway*) (TRC chez les mammifères) (Aviram and Schuldiner, 2017, Strzyz, 2017). Ensuite, une fois qu'une protéine sécrétoire atteint la membrane du RE, elle doit passer par un canal dit translocon, un complexe hétérotrimérique constitué de la protéine Sec61 α et de deux protéines accessoires Sbh1 et Sss1 (Sec61 β et Sec61 γ chez les mammifères, SecY chez les bactéries) pour y rester (protéines membranaires) ou passer dans la lumière du RE (protéines solubles) (Görlich and Rapoport, 1993, Voorhees and Hegde, 2016). Le passage du peptide naissant à travers le canal induit son changement de conformation qui est nécessaire à la translocation (Voorhees *et al.*, 2014). Finalement, la protéine transférée peut soit rester dans le RE, soit continuer à travers le complexe de Golgi (si il existe) jusqu'à son site de fonction (Geva and Schuldiner, 2014).

La suite de ce chapitre sera axée sur la présentation de la principale voie de ciblage co-translationnelle sur le RE, la voie dépendante de la SRP.

3.2. Organisation de la SRP

Découverte en 1979, la SRP est une RNP conservée dans tous les domaines du vivant. Cependant, sa taille et sa structure secondaire varient considérablement d'un organisme à l'autre (**Figure 15A**) (Rosenblad *et al.*, 2009, Pool, 2009, Blobel *et al.*, 1979). De manière

surprenante, chez la bactérie le récepteur de la SRP (SR) et la SRP peuvent remplacer leurs homologues mammifères pour assurer un ciblage efficace vers le RE. Ceci démontre la conservation évolutive remarquable de cette voie, et a longtemps permis à la SRP bactérienne de servir de système modèle pour la dissection mécanique du noyau fonctionnel de la SRP (Zhang and Shan, 2014).

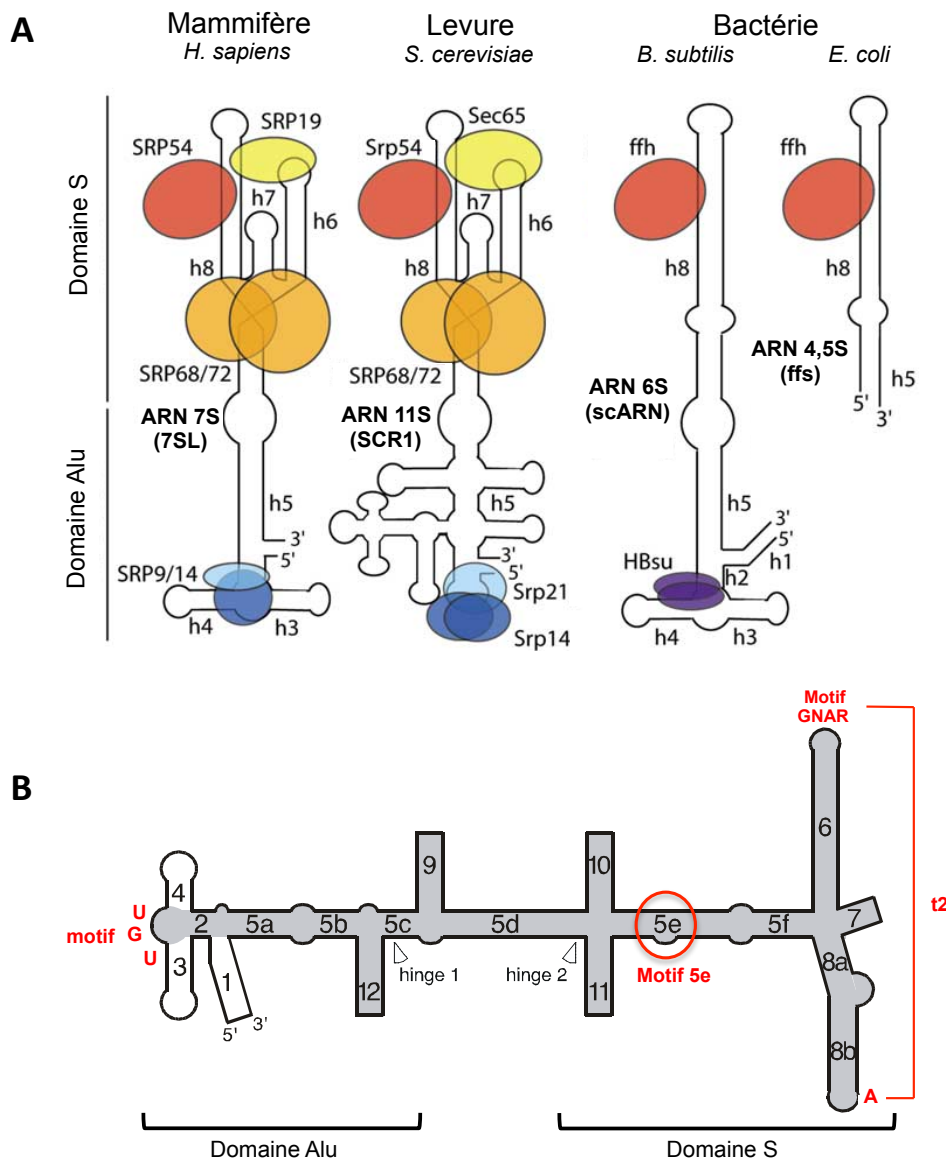


Figure 15 : Représentation schématique de l'organisation de la SRP

A. Schéma illustrant la composition et l'organisation de la SRP dans différents domaines de la vie. Les hélices (h) sont plus détaillées sur la figure B. La Srp14 et HBSu de levure *S. cerevisiae* et de *B. subtilis*, respectivement, se lient sur l'ARN comme homodimère. Figure adaptée de la revue de Pool et ses coll, 2009. **B.** Nomenclature de l'ARN SRP proposée par Zwieb et ses coll, 2005. La structure secondaire de l'ARN SRP de la levure est esquissée en gris. Les hélices sont numérotées de 1 à 12 avec des sections hélicoïdales étiquetées avec les lettres a-f. Les caractéristiques conservées de l'ARN de la SRP sont représentées en rouge. L'interaction tertiaire (t2) de deux adénines entre l'hélice 6 et 8 est indiquée. *Hinge* : charnière, région flexible. Figure adaptée de la revue de Zwieb et ses coll, 2005.

La SRP de mammifère est composée de 6 protéines associées à un ARNnc 7SL (~300nt) et peut être divisée en deux domaines fonctionnels ; le domaine Alu, responsable de l'arrêt de l'élongation de la traduction, est composé de l'hétérodimère SRP9/14 et des extrémités 5'-3' terminales de l'ARNnc. Le domaine S, universellement conservé, est composé de la SRP19, SRP54, de l'hétérodimère SRP68/72, et de la partie centrale de l'ARNnc. Il participe à la reconnaissance du peptide signal (Walter and Blobel, 1981, Beckert *et al.*, 2015, Voorhees and Hegde, 2015).

La SRP de levure diffère de son homologue humain ; à l'heure actuelle, le plus grand variant de SRP caractérisé se trouve chez la levure avec trois hélices d'ARN supplémentaires de structures et de fonctions inconnues (**Figure 15B**). En effet, l'ARNnc SCR1 est beaucoup plus long (~522nt) avec un domaine Alu composé uniquement de l'hélice 2 et contient des épingles à cheveux supplémentaires entre le domaine Alu et S (Hann and Walter, 1991, Zwieb *et al.*, 2005). La SRP19 est remplacée par la protéine Sec65 (Hann *et al.*, 1992) et l'hétérodimère SRP9/14 est remplacé par un homodimère Srp14 (Strub *et al.*, 1999). De plus, la SRP de levure possède une protéine supplémentaire, la Srp21, qui a une faible similarité de séquence avec la SRP9, suggérant une origine commune (Mason *et al.*, 2000, Rosenblad *et al.*, 2004). Zwieb et ses coll. ont suggéré que ces deux protéines sont des orthologues fonctionnels ce qui impliquerait qu'un hétérodimère Srp21 et Srp14 existerait chez la levure. Cependant, aucune étude ne l'a démontré et le rôle de la Srp21 n'est pas clair.

La SRP chez la bactérie *E. coli* est beaucoup plus petite que celle des eucaryotes et possède un homologue de la SRP54, appelé Ffh ou P48, associée à un ARNnc 4,5S (~114nt) qui contient l'hélice 8 (très conservée). Cependant, d'autres bactéries telles que *Bacillus*, *Clostridium* et *Staphylococcus*, possèdent un ARNnc 6S (~270nt) plus grand avec la présence du domaine Alu, qui, dans le cas de *Bacillus* est associé à un homodimère, HBSu (Pool, 2009).

Cette introduction a pour objectif de montrer la conservation de la SRP dans tous les règnes de la vie soulignant son rôle important dans la cellule. Cependant, notre objet d'étude concerne la SRP chez la levure, c'est pourquoi la suite du chapitre sera plus particulièrement axée sur cet organisme.

3.3. Biogenèse de la SRP

De manière générale, une RNP, composée d'une ou plusieurs protéines et d'un ARN, doit traverser plusieurs barrières énergétiques pour devenir fonctionnelle. Et souvent, l'assemblage doit se faire dans un ordre très spécifique pour atteindre un état actif. C'est le cas de plusieurs RNP, dont la SRP (Flores and Ataïde, 2018). Tout d'abord, l'ARNnc de la SRP est transcrit par l'ARN polymérase III dans le noyau, qui, par l'action de divers facteurs de

type chaperonne et nucléase, arrive à maturité dans le nucléole (Leung and Brown, 2010). SCR1 subit une adenylation conservée au niveau de l'extrémité 3', importante pour l'export du complexe dans le cytoplasme (Perumal *et al.*, 2000, Leung *et al.*, 2014). Il a été proposé que l'assemblage initial de la SRP est nucléolaire (Ciuffo and Brown, 2000, Grosshans *et al.*, 2001). En effet, il a été montré chez la levure que les protéines Srp14, 21, 68 et 72 entrent dans le noyau par l'intermédiaire des importines Kap123 et Pse1 et se localisent dans le nucléole, alors que Sec65 entre par l'importine Srp1 et se situe dans le nucléoplasme. On ne sait toujours pas clairement comment la SRP-précurseur (pré-SRP) se forme mais selon le modèle proposé par Simos et ses coll. les protéines Srp14, 21, 68 et 72 sont nécessaires pour avoir un noyau « stable » avec SCR1 auquel Sec65 se lie ultérieurement. En effet, l'absence de l'une des 4 protéines affecte le niveau de SCR1 et inhibe l'export du complexe précurseur (Brown *et al.*, 1994, Grosshans et al., 2001). La pré-SRP est ensuite exportée vers le cytoplasme, par la voie médiée par Xpo1, ou il s'associe à la Srp54 pour former la SRP mature et fonctionnelle (Figure 16).

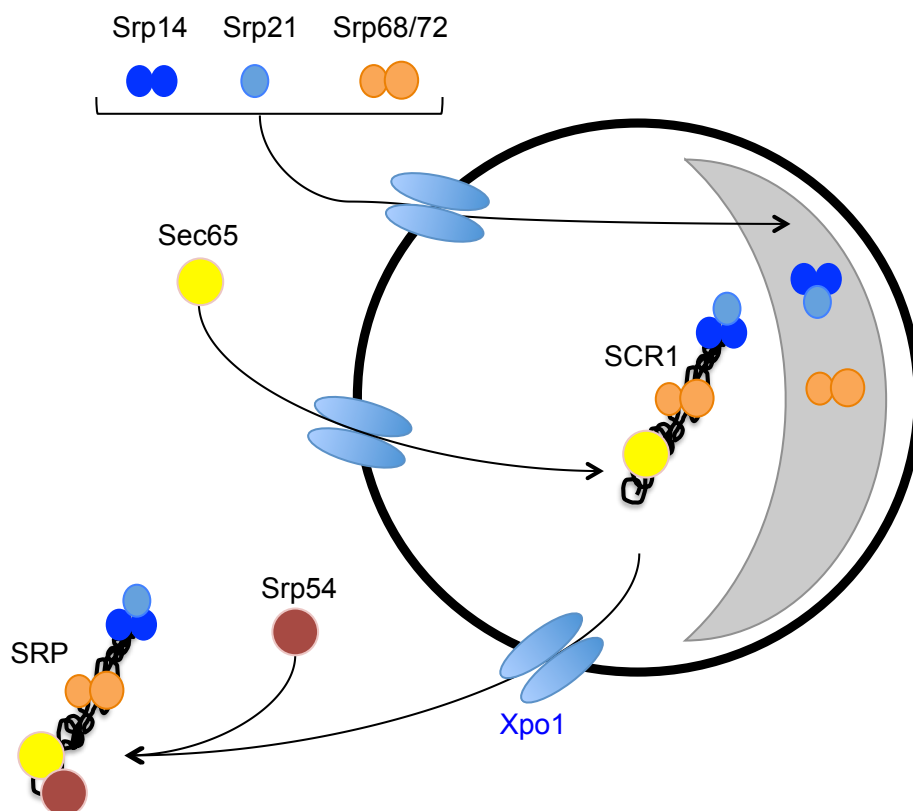


Figure 16 : Modèle de l'assemblage de la SRP chez la levure

Les protéines de la SRP nouvellement traduites, à l'exception de Srp54, sont importées dans le nucléole (croissant gris) d'une manière dépendante de Kap123 et Pse1 et forment la pré-SRP. Sec65 est importée via Srp1 et s'associe sur la pré-SRP dans le nucléoplasme. La particule est ensuite exportée vers le cytoplasme par le biais de l'exportine Xpo1, et se lie sur la Srp54 pour former une SRP mature.

Ovales bleus : complexes de pores nucléaires. Rond noir : noyau.

Pour démontrer le mécanisme de l'export de la SRP, Simos et ses coll. ont utilisé une souche de levure qui contient une copie du gène *XPO1* codant un variant T539C sensible à la leptomycine (Neville and Rosbash, 1999). Cette drogue bloque un résidu de cystéine conservé dans le site de liaison à la séquence NES de la protéine à transporter. Avec l'addition de la leptomycine, les auteurs ont montré une très forte accumulation nucléaire de SCR1 suggérant que la pré-SRP utilise cette voie pour rejoindre le cytoplasme (Grosshans et al., 2001). Les mêmes observations ont été faites chez les mammifères soulignant la conservation du mécanisme (Jacobson and Pederson, 1998, Politz *et al.*, 2000, He *et al.*, 1994, Alavian *et al.*, 2004). Cependant, le mécanisme d'export est plus complexe chez les mammifères. En effet, alors que plusieurs études ont montré un export de la SRP médié par la voie CRM1 (Xpo1 chez la levure), une étude plus récente a montré que c'est l'exportine 5 qui est impliquée dans ce processus (Alavian et al., 2004, Takeiwa *et al.*, 2015).

Par ailleurs, comme mentionnée précédemment, la chronologie de la fixation des différentes protéines sur l'ARN est importante pour aboutir à une particule fonctionnelle. Par exemple, (i) chez la levure la liaison de l'homodimère de Srp14 sur le domaine Alu est cruciale pour l'activité d'arrêt de l'élongation de la traduction (Mason et al., 2000). Il a été également montré chez les mammifères, que la liaison de l'hétérodimère SRP14/9 induit un changement de conformation du domaine Alu et forme une poche d'interaction avec l'ARNnc 7SL (Strub and Walter, 1990, Bui *et al.*, 1997) et (ii) la liaison de Sec65 sur la pré-SRP est importante pour une liaison efficace de la Srp54 (Hann et al., 1992). De plus, l'homologue de Sec65 chez les mammifères, SRP19, induit un réarrangement des hélices 6 et 8 de l'ARNnc 7SL qui forme une plateforme de liaison pour la SRP54 (Rose and Weeks, 2001). En ce basant sur cette chronologie, la totalité de la SRP humaine a pu être complètement reconstituée *in vitro* (Wild *et al.*, 2019).

3.4. Fonction

Une fois que la SRP devient mature dans le cytoplasme, elle se lie sur le ribosome en cours de traduction (RNC, *ribosome-nascent chain*) à la recherche d'un peptide signal (Massenet, 2019). Les séquences signal sont très différentes en longueur, structure et composition en acides aminés et sont généralement hydrophobes. D'une manière générale, la SRP s'associe sur tous les ribosomes, même ceux qui ne traduisent pas les protéines destinées aux RE, en formant des complexes transitoires avec des protéines ribosomiques (Pool *et al.*, 2002, del Alamo *et al.*, 2011, Chartron *et al.*, 2016). Pour expliquer ce phénomène, Frydman et ses coll. ont suggéré que des éléments présents sur la région non codante d'un ARNm ou encore la présence de cofacteurs protéiques peuvent favoriser ce pré-recrutement de la SRP indépendamment du peptide signal (Chartron et al., 2016). Des études chez les bactéries

soutiennent également le modèle de liaison précoce de la SRP sur le ribosome soulignant l'importance du mécanisme (Denks *et al.*, 2017, Jomaa *et al.*, 2016).

Le peptide signal est reconnu par la Srp54, protéine conservée dans toutes les SRP, qui a également un rôle dans l'interaction de la SRP avec le ribosome et le ciblage de la SRP-RNC vers le récepteur SR d'une manière dépendante du GTP. La Srp54 est une GTPase composée de deux domaines : un domaine régulateur NG (N : faisceau de 4 hélices, G : GTPase) dans la partie N-terminale et un domaine C-terminal riche en méthionine qui lie le peptide signal. Si le peptide naissant possède une séquence signal, alors l'affinité de la SRP augmente et devient un complexe à haute affinité avec le RNC (Voorhees and Hegde, 2015). Le récepteur SR est composé de deux sous-unités : la SRP101 (SR α chez les mammifères), une protéine membranaire périphérique, et la SRP102 (SR β), qui est une protéine membranaire intégrée dans la membrane du RE. La SRP101 possède un domaine GTPase dans sa partie C-terminale structurellement homologue au domaine NG de la Srp54. De façon intéressante, il a été montré chez les eucaryotes que la reconnaissance d'un peptide signal par le domaine M de la SRP54 entraîne un changement de conformation de la SRP accompagné de deux événements : (i) le domaine NG de la SRP54 interagit avec SR α (Freymann *et al.*, 1997, Rose and Weeks, 2001) et (ii) il y a un basculement du domaine Alu vers le canal d'entrée de l'ARNm entre les ribosomes 40 et 60S (**Figure 17**) (Halic *et al.*, 2004).

(i) D'un point de vue cinétique, dans leurs états dissociés, les domaines GTPases de la SRP54 et du SR α (SRP101) se lient au GTP avec une affinité faible et s'assemblent initialement dans une conformation ouverte pour former un intermédiaire dit « précoce ». Suite à la reconnaissance d'un peptide signal, des réarrangements entraînent la formation de plusieurs contacts entre les domaines GTPases des deux protéines et forme un complexe dit « fermé », stabilisé par le GTP. Ce dernier état positionne plusieurs résidus catalytiques près du GTP lié, ce qui entraîne une activation réciproque des domaines GTPases puis une hydrolyse du GTP qui provoque finalement la libération de la séquence signal et le désassemblage du complexe (Nyathi *et al.*, 2013).

(ii) En ce qui concerne le basculement du domaine Alu, il s'agit d'une caractéristique unique de la SRP chez les eucaryotes, qui est responsable de l'arrêt (ou ralentissement) de la traduction. La Srp14 a été directement impliquée dans cet arrêt suite à deux études qui ont montré qu'une délétion de la partie C-terminale de la SRP14 de levure et de mammifère n'entraîne pas l'activité d'arrêt de l'élongation (Mason *et al.*, 2000, Thomas *et al.*, 1997). Une explication à ce phénomène a été apportée grâce à des analyses par cryomicroscopie de la SRP de mammifère liée à des ribosomes arrêtés où le domaine Alu entre en compétition avec le site de liaison du facteur d'élongation du ribosome, eEF2 (Halic *et al.*, 2004, Bousset *et al.*, 2014). En effet, le domaine Alu interagit avec le ribosome à l'étape de translocation de l'ARNt catalysée par eEF2 du site A vers le site P. Il a donc été spéculé que le domaine Alu pourrait retarder le cycle d'élongation de la traduction en empêchant la liaison de eEF2 et

ainsi donner le temps au complexe de ciblage de trouver et d'engager le translocon. Cependant aucun rôle n'a été attribué à la Srp21 chez la levure qui pourrait également jouer un rôle majeur dans l'activité d'arrêt de l'élongation.

Finalement, le complexe SRP-RNC s'associe au translocon Sec61 sur la membrane du RE et la traduction se poursuit dans la lumière ou membrane du RE (Nyathi et al., 2013).

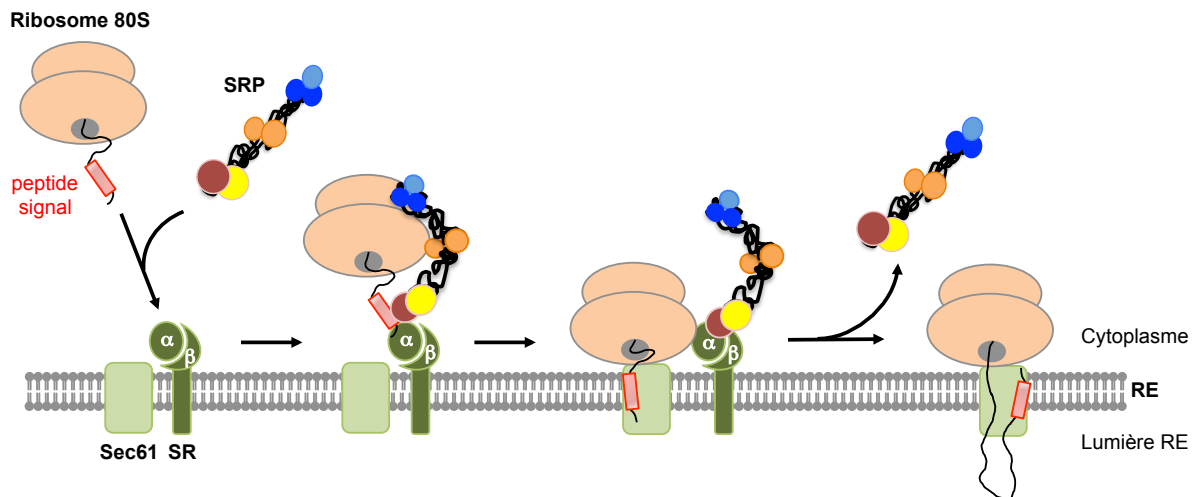


Figure 17 : Schéma illustrant la translocation co-translationnelle chez la levure

La SRP lie le peptide signal (en rouge) lorsqu'elle émerge du ribosome, change de conformation et forme le complexe RNC-SRP. Ceci entraîne l'arrêt/ralentissement de la traduction qui augmente l'efficacité de la translocation des protéines. Le complexe RNC-SRP se lie sur le récepteur SR constitué de deux sous-unités (α : SRP101, β : SRP102). Le transfert du complexe RNC sur le translocon Sec61 entraîne l'intercalation du peptide signal dans le pore du translocon et la dissociation de la SRP du RNC. Au fur et à mesure que la chaîne peptidique s'allonge, elle passe à travers le translocon dans la lumière du RE, où le peptide signal est clivée par la signal peptidase. Une fois que la traduction est terminée, le ribosome est libéré et le reste de la protéine gagne la lumière du RE ou reste dans la membrane.

4. Objectif de travail

Cette synthèse bibliographique montre que Ded1 et ses orthologues sont impliqués dans une variété de processus nucléaires et cytoplasmiques, en passant de l'épissage à la formation de foci cellulaires. Dans le noyau, son rôle n'est pas très clair, mais des données génétiques et biochimiques indiquent qu'elle est associée avec la machinerie de l'épissage, de la biogenèse du ribosome et de l'export de l'ARNm. Dans le cytoplasme, des données plus solides indiquent que Ded1 est requise pour l'initiation de la traduction. Elle aiderait à dérouler des structures secondaires présentes sur le 5'UTR des ARNm. Par ailleurs, d'autres données sous-tendent que Ded1 se situe dans des foci cellulaires, contenant des RNP non traducteurs, et que son activité ATPase est requise pour favoriser la progression de ces RNP vers la traduction. Les mêmes observations ont été faites pour son homologue humain DDX3, ce qui place les hélicases de la sous-famille Ded1/DDX3 à un stade de régulation clé dans l'initiation de la traduction. Cependant, les spécificités de substrats et les partenaires protéiques de liaison sur l'activité de Ded1 n'ont pas été entièrement explorés et restent énigmatiques. Pour mieux comprendre cela, la stratégie adoptée par mon laboratoire a été d'identifier ses partenaires protéiques et les ARN qui lui sont associés, ce qui permettrait ainsi de mieux comprendre le rôle de la protéine humaine DDX3.

L'hypothèse de départ a été de spéculer que Ded1 s'associerait probablement très tôt sur un sous-ensemble d'ARNm ayant un 5'UTR long et structuré, dans le noyau. L'ARNm serait alors traité et exporté dans le cytoplasme ou il serait stocké en tant que RNP inactive dans des foci cellulaires ou être impliqué dans le transport d'ARNm localisé. Si nécessaire, l'activité ATPase de Ded1 « libérerait » l'ARNm en remodelant sa structure et en la rendant accessible pour la traduction.

Avant mon arrivée au laboratoire, mon équipe a découvert que Ded1 a une localisation nucléo-cytoplasmique et s'associe aux complexes de liaison à la coiffe et la queue poly(A). Ils ont également visualisé Ded1 dans des foci cellulaires, contenant des ARN inactivés pour la traduction, et associés sur le pore nucléaire et le réticulum endoplasmique. Pour compléter cette étude, mon projet de recherche a été d'identifier les substrats ARN de Ded1. Durant ma thèse, 3 études ont été publiées sur la recherche des ARN dépendants de Ded1 (Sen, 2016, Sen et al., 2019, Guenther et al., 2018). Ces études ont été menées avec la technique du *ribosome profiling* en utilisant des mutants de Ded1 sensibles à la température afin d'identifier l'impacte de Ded1 sur l'initiation de la traduction. La conclusion de ces articles était la même : Ded1 est impliquée dans l'initiation de la traduction d'ARNm présentant un 5'UTR long et structuré. De plus, Jankowsky et ses collègues ont remarqué que la répression de l'activité de Ded1 conduisait à l'accumulation de ribosomes sur des codons d'initiation apparentés (*near cognate codon*) en amont du codon principal ATG et ont conclu que Ded1

aurait un impact sur l'initiation de la traduction en contrôlant l'utilisation de codon apparenté (Guenther et al., 2018).

Cependant, plusieurs questions ne sont toujours pas résolues :

- Quels sont les substrats ARN de Ded1 ?
- Ded1 se fixe-t-elle uniquement sur le 5'UTR des ARNm ?
- D'autres classes d'ARN sont-elles ciblées par Ded1 ?
- Ded1 reconnaît-elle un motif ou une structure sur l'ARN ?
- Quel est le rôle de Ded1 dans la cellule ?

Afin d'y répondre, nous avons articulé ce projet autour de deux grands axes.

Le premier axe a porté sur le choix et l'utilisation d'une technique à haut débit de réticulation (*crosslink*) adaptée pour l'identification des ARN associés à Ded1. Pour cela, j'ai montré dans un premier temps que la technique de réticulation et immunoprécipitation (CLIP, *crosslinking and immunoprecipitation*), classiquement utilisée, n'était pas adaptée pour notre étude. Pour ce faire, j'ai utilisé et surtout apporté des modifications majeures à une variante de la technique de CLIP, le PAR-CLIP (*Photoactivable ribonucleoside-enhanced CLIP*) ; Il s'agit d'une technique de CLIP améliorée par l'ajout d'un ribonucleoside photoactivable. Cette étude nous a conduit à la rédaction d'un article de méthode qui sera soumis au journal *Nature Methods _ Brief Communication*, très prochainement. Cette partie se situe dans la partie 1 du chapitre « Résultats », ou je présente la nouvelle méthode utilisée, l'article qui sera soumis ainsi que certains résultats n'apparaissant pas dans l'article.

Dans le deuxième axe, j'ai combiné différents outils de génétique, de biochimie, d'enzymologie et de localisation *in situ* qui m'ont permis de valider un des substrats ARN de Ded1, identifié par la méthode de l'axe 1, et surtout j'ai pu apporter des éléments de réponse quant au rôle physiologique de Ded1. Cette partie se situe dans la partie 2 du chapitre « Résultats », ou j'introduis les différents résultats obtenus ainsi que l'article scientifique que nous avons soumis au journal *eLife* en novembre 2020, et déposé sur la plateforme BioRxiv.

Résultats

*Il y a de l'espoir après le désespoir
et de nombreux soleils après l'obscurité*

Rûmî

1. Identification des ARN associés à Ded1

1.1. Approche expérimentale et résultats principaux de l'article

Le premier objectif de ce projet a été l'identification des substrats ARN de Ded1. Pour cela, nous avons utilisé, dans un premier temps, la technique de CLIP. Cette méthode est classiquement utilisée sur des cellules vivantes pour identifier les interactions directes entre un ARN et une protéine, préservant ainsi les interactions physiologiquement pertinentes, suite à l'exposition des cellules aux rayonnements ultraviolet-C (UV-C, 254 nm) (Brimacombe *et al.*, 1988, Ule *et al.*, 2005). Classiquement, l'irradiation des cellules à 254 nm entraîne un *crosslink* entre la protéine et l'ARN si ces deux sont en contact direct au moment de l'irradiation. Cette réticulation entraîne la formation d'une liaison covalente qui persiste lors des étapes de purification (dénaturation et lavage stringent). Le complexe ARN-protéines formé est purifié par immunoprecipitation (IP). Ensuite, les ARN associés à la protéine d'intérêt sont extraits, amplifiés par RT-PCR pour générer une bibliothèque d'ADN complémentaire (ADNc) et soumis à un séquençage à haut débit (Lee and Ule, 2018). Cependant, il est connu que les UV-C émettent une longueur d'onde courte très énergétique et nocive, avec de faible rendement de réticulation (Meisenheimer and Koch, 1997, Wheeler *et al.*, 2018). C'est pourquoi nous avons d'abord vérifié l'impact des UV-C sur la stabilité de Ded1, protéine d'intérêt de notre étude, avant de réaliser la méthode.

La procédure de réticulation utilisée dans la technique de CLIP, et de la majorité de ses variantes, est d'irradier les cellules à 254 nm trois fois (parfois une fois, cela dépend de la variante) entre 100-400 mJ/cm², ce qui correspond à environ 4-9 minutes (Ule *et al.*, 2005). A notre grande surprise, la protéine Ded1 purifiée commence à être dégradée après une minute, pour l'être totalement après 5 minutes d'irradiation. L'énergie à 100 mJ/cm² permet de capturer un instantané de la liaison avec un rendement de réticulation faible de moins de 5% (Darnell, 2010). L'utilisation de l'énergie à 400 mJ/cm², ou encore à 1,6 J/cm², utilisée dans la technique de CRAC (une variante du CLIP adaptée aux protéines étiquetées (Granneman *et al.*, 2009)), augmente le rendement de réticulation, mais aussi peut provoquer une rupture du squelette phosphodiester (Pashev *et al.*, 1991b). Ceci peut induire une réponse cellulaire induit par les UV et biaiser la génération de la bibliothèque d'ADNc pour le séquençage. Nous avons également vérifié l'effet des UV-C sur la croissance cellulaire. De façon surprenante, même à 10 secs d'irradiation, la croissance cellulaire a été complètement abolie, soulignant les

effets destructeurs des UV-C. Pour finir, nous avons complété nos expériences en vérifiant si la protéine Ded1 se retrouve « retardée » sur un western blot, après irradiation à 254 nm. Comme attendu, la migration de Ded1 est retardée à partir de 15 min d'irradiation, puis finit par « disparaître ». Ceci est également observé pour la protéine Pdk1, protéine de contrôle ne liant pas l'ARN, suggérant que les UV-C affectent également la stabilité des protéines *in vivo*. La méthode de CLIP à 254 nm n'était clairement pas adaptée pour notre étude. Pour contourner cela, nous avons tenté d'utiliser une variante du CLIP qui utilise un ribonucléoside photoactivable, le PAR-CLIP (Hafner *et al.*, 2010, Benhalevy *et al.*, 2017).

En effet, au lieu de réticuler les acides nucléiques naturels avec des UV-C, un analogue de l'uracile, le 4-Thiouridine, est ajouté dans le milieu de culture, qui est absorbé par les cellules et finalement incorporé au sein des molécules d'ARN nouvellement synthétisées. Ce ribonucléoside est activé à une longueur UV-A de 365 nm (Favre *et al.*, 1998). Le protocole a initialement été développé sur des cellules en culture humaines (Hafner *et al.*, 2010), et a été adapté chez la levure par l'utilisation du 4-thiouracile (4TU), plus facilement absorbable par la cellule (Creamer *et al.*, 2011, Beckmann, 2017). Comme pour les UV-C, nous avons d'abord vérifié l'effet des UV-A sur Ded1. Même à 30 min d'irradiation ($\sim 7 \text{ J/cm}^2$) aucune dégradation n'a été visualisée ; Ded1 est stable aux UV-A. Nous avons ensuite comparé l'effet de la présence du 4TU sur la croissance cellulaire. Ceci a déjà été vérifié par d'autres, sans que cela n'ait été montré expérimentalement chez la levure (Creamer *et al.*, 2011, Duffy *et al.*, 2019). Comme prévu, le 4TU n'a pas affecté la croissance cellulaire.

Ainsi, nous avons choisi la technique de PAR-CLIP pour tenter d'identifier les ARN associés à Ded1. Cependant, la méthode n'a pas été utilisée telle qu'elle. Afin de rationaliser et raccourcir la procédure de PAR-CLIP classique, nous avons développé un protocole modifié, en omettant certaines étapes compliquées et en l'adaptant chez la levure. La **Figure 18** représente une comparaison des deux techniques. Des informations complémentaires se trouvent dans le manuscrit.

Dans le PAR-CLIP classique, les complexes ARN-protéines sont réticulés à 365 nm de manière covalente dans les cellules vivantes. Les cellules sont lysées et traitées avec la RNase T1 générant des extrémités 5'OH et 3'P. Les complexes ARN-protéines sont immunoprécipités et rigoureusement lavés pour enlever toutes traces d'ARN ou protéines contaminantes. Les ARN des complexes purifiés sont déphosphorylés en 3', phosphorylés et radiomarqués en 5', puis sont séparés sur gel SDS-PAGE. L'ARN lié est isolé soit directement à partir de l'excision du gel, soit après transfert sur une membrane de nitrocellulose (Garzia *et al.*, 2017). Finalement, les protéines sont éliminées par la protéinase K et l'ARN restant est ligaturé aux adaptateurs 5' et 3', reverse transcrit, l'ADNc résultant est amplifié par PCR, purifié sur gel et soumis à un séquençage à haut débit.

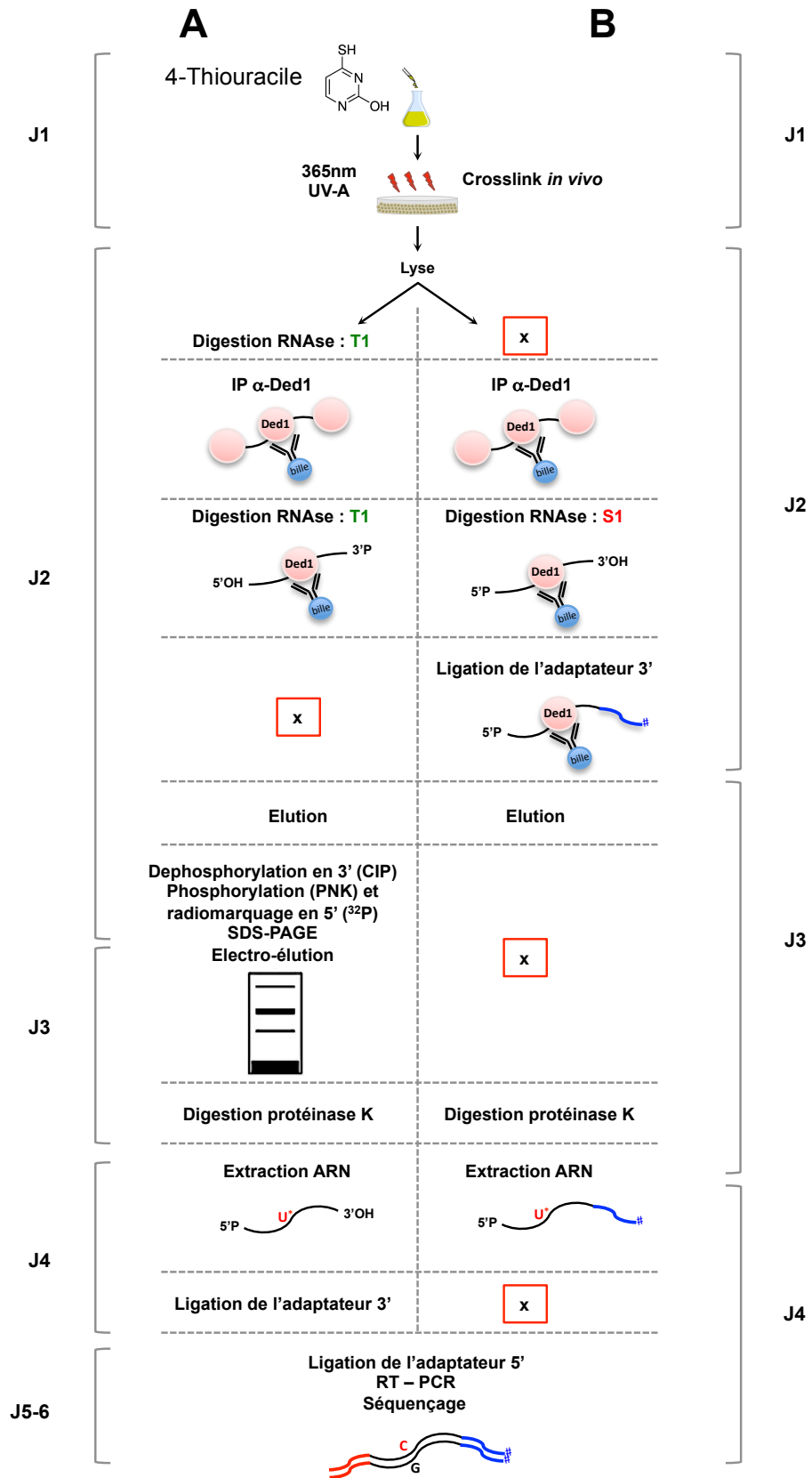


Figure 18 : Vue d'ensemble de la technique de PAR-CLIP classique (A) ainsi que la version modifiée (B).

IP : immunoprécipitation, CIP : phosphatase d'intestin de veau, PNK : polynucléotide kinase T4.

Une des avantages de cette technique c'est que lors de la réticulation, le 4TU subit un changement structurel qui entraîne une modification du squelette de l'ARN. Cette modification conduit à une mutation T-C dans l'ADNc résultant la RT-PCR (Sontheimer, 1994). Ainsi, le lieu exact de la liaison entre l'ARN et la protéine peut être déterminé suite aux analyses bioinformatiques.

1.2. Manuscrit de l'article méthode

A novel and non-disruptive strategy for detecting protein-RNA interactions

Hilal Yeter-Alat^{1,2}, Josette Banroques^{1,2}, and N. Kyle Tanner^{1,2*}

¹ Expression Génétique Microbienne, UMR8261 CNRS, Université de Paris, Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

² PSL Research University, 75005 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 58 41 52 37; Fax +33 1 58 41 50 25; Email: kyle.tanner@ibpc.fr

Keywords: crosslink, irradiation, 4-thiouracil, wavelength, Ded1, CLIP, PAR-CLIP

Abbreviations:

RBP, RNA-binding proteins; CLIP, crosslinking and immunoprecipitation; PAR-CLIP, photoactivable-ribonucleoside-enhanced CLIP; UVA, ultraviolet A; UVC, ultraviolet C; IP, immunoprecipitation; 4TU, 4-thiouracil

ABSTRACTS

Short UV light used in CLIP (crosslinking and immunoprecipitation) techniques causes background noise, and it is detrimental for protein stability and cell growth. Here, we report a comparison between short UV light and long UV in the presence of the photoactivated analog 4-thiouracil. We apply this latter strategy in a modified photoactivable-ribonucleoside-enhanced (PAR-CLIP) technique for the identification of the RNA substrates of the DEAD-box helicase Ded1 in a specific way.

RNA-binding proteins (RBP) control all aspects of RNA biology in transcription and post-transcriptional regulation, including RNA processing, export, localization, translation and decay¹. Among these proteins, the functionally conserved DEAD-box RNA-helicase-subfamily Ded1/DDX3 plays important roles in cell cycle and developmental regulation, and they are considered translation-initiation regulators². Human DDX3 is implicated in viral replication, oncogenesis and intellectual disability; as a consequence it is a potential target for therapeutic agents³.

Several methods are used to identify the RNA substrates of RBPs, such as ultraviolet irradiation of living cells to form covalent bonds between the RNA and proteins^{4,5}. The most popular is the crosslinking and immunoprecipitation (CLIP) technique that enables the identification of proteins bound on RNA molecules under physiological settings⁶. Since then, about thirty variant protocols have evolved to improve on the efficiency of the original strategy. However, the general premise remains the same: (i) *in vivo* covalent protein-RNA crosslinking of tissues or cells with UV light; (ii) RNA fragmentation using various RNases, where a portion of the RNA is protected by the proteins of interest; (iii) purification of the protein-RNA complexes by stringent washes; (iv) protein digestion with proteases and RNA extraction; (v) adapter ligation on the RNA; and (vi) cDNA synthesis and high-throughput sequencing of multiplexed libraries⁷.

The majority of the CLIP techniques use short ultraviolet C (UV-C) irradiation centered at 254 nm due to the photoreactivity of RNA bases⁸. Nevertheless, this type of crosslinking can induce biases that affect the interpretations of the results. First, pyrimidines are more photoactivatable than purines and amino acids present highly variable reactivity. Second, long irradiation times may be required in order to achieve a reasonable yield of crosslinked products. Third, the UV-C irradiation may be absorbed by other chromophores in the complex that can lead to decreased quantum yields and impede the characterization of the crosslink. Finally, UV-C crosslinking can induce a cellular response to UV-induced damage⁹. Another CLIP variant, photoactivatable ribonucleoside CLIP (PAR-CLIP), avoids these problems by adding photoactivatable analogues of uracil or guanine, such as 4-thiouracil (4TU) or 6-thioguanosine, respectively, to the culture medium that is subsequently incorporated into newly transcribed RNAs; these analogs form crosslinks with proteins when irradiated above 330 nm with long ultraviolet A (UV-A)¹⁰. In particular, 4TU has high photoreactivity with aromatic aminoacid residues at wavelengths around 330–340 nm that allows selective excitation, increased crosslinking, minimum unwanted photodamage to the system, and that can be achieved with individual-nucleotide resolution of the binding sites^{9,11}.

We reasoned that the CLIP techniques using UV-C increased the risk of experimental artifacts. To verify this, we compared the effect of irradiation at 254 nm and 365 nm UV light on cell viability and protein stability. In addition, we modified the PAR-CLIP method by omitting a few steps, and we applied this approach to the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. To do

so, we irradiated yeast grown with and without 4TU with UV-A or UV-C for various times. Part of the liquid culture was subsequently serially diluted and spotted on minimal-medium agar plates (to retain plasmid-borne genes) and incubated at 30°C. The results showed a total abolition of growth when the cells were irradiated with UV-C even after a 10 sec irradiation (**Figure 1a**). In contrast, there was a small decrease in growth when cells were irradiated with UV-A in the presence of 4TU, showing that the presence of 4TU and the irradiation at this wavelength had little impact on the cell viability. Cells irradiated with UV-A in the absence of 4TU showed no altered growth, which indicated that the UV-A light by itself was benign. We also evaluated the effect of different concentrations of 4TU on cell growth over a period of ~24h. The growth curves of 4TU-treated cells were similar to those of untreated cells, indicating that the 4TU had little effect on cell viability (**Supplementary Figure 1**). Others have shown the same effect¹².

The other part of the liquid culture were lysed, the proteins were electrophoretically separated on a SDS, laemmli, polyacrylamide gel, and transferred to a nitrocellulose membrane. We performed a Western blot analysis with IgG antibodies against the DEAD-box protein Ded1. We observed a retardation of Ded1 on the membrane under both irradiation conditions that reflected the efficiency of the crosslinking (**Figure 1b**). However, the intensity of endogenous Ded1 decreased within 30 min with UV-C irradiation. However, it was possible that this was due to the formation of very large RNA-protein complexes that did not enter the gel after extensive crosslinking. To address this point, we looked at the level of PGK1, which is not a RBP; it also showed decreased intensity over the irradiation time. Thus, the diminishing band intensities seemed to reflect protein degradation that arose from the UV-C irradiation. In contrast, PGK1 showed no appreciable difference in band intensity when irradiated with UV-A (**Figure 1b**). Nevertheless, large, insoluble complexes probably formed in the case of 4TU cultures irradiated with UV-A over 30 min.

We completed this observation with *in vitro* experiments on the purified Ded1 protein. We found that Ded1 was rapidly degraded with the UV-C irradiation even over 1–3 min. Thus, short UV crosslinking rapidly degrades certain proteins (**Figure 1c**). We believe that it is important to check the stability of the protein of interest before undertaking CLIP experiments, and the method must be specifically optimized for each RBP. Thus, we have taken a different approach to identifying the RNA substrates of Ded1 by using a modified PAR-CLIP technique.

The original PAR-CLIP method requires digesting the RNA with RNase T1, which leaves a 5' hydroxyl and a 3' terminal phosphate. Consequently, a dephosphorylation step is required before the adapter oligonucleotide can be ligated onto the 3' end. Furthermore, the crosslinked RNA-RBP is separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and the region corresponding to the crosslinked RNA-RBP is excised, which increases the risk of experimental artifacts and loss of material. The material is then further purified by IP

with IgG against the protein of interest with further loss of material. To overcome this, we modified a few steps of the original protocol (**Figure 2a, Supplementary Table 1**). Briefly, cells containing 4TU-labeled RNA transcripts were crosslinked using UV-A light. After lysing the cells, we continued directly with an IP step to recover the RNA-Ded1 complexes. Typically, Ded1-specific IgG or nonspecific pre-immune serum are attached to Protein A coupled to Sepharose beads and then subjected to the lysate containing the crosslinked RNA-RBP. At this point, we have adopted two strategies that were previously used by the infrared-CLIP technique¹³. The RNA was digested directly on the beads during the IP to optimize the RNA-RBP recovery (**Figure 2b, Supplementary Figure 2**). At the same time, we digested the RNA with nuclease S1 that cleaves single-stranded RNA and leaves 5' phosphates and 3' terminal hydroxyls. This eliminated the additional steps of dephosphorylation of the 3' end and phosphorylation of the 5' end, typically with ³²P, after the RNase T1 digestion. Thus, the first oligonucleotide adapter was attached on the 3' end of the RNA directly after nuclease S1 digestion and while the RNA-protein complex was still attached to the IgG-ProteinA-Sepharose beads. The crosslinked RNA-Ded1 complexes were then eluted and proteins were removed by incubating the eluant with proteinase K. The resulting RNA was recovered and crosslinking efficiencies were estimated based on the intensity of ³²P-pCp-labeled RNA separated by electrophoresis on a denaturing polyacrylamide-urea gel (**Figure 2c**). Finally, the 5' adapter was ligated to the 5' end, and the RNA was amplified by RT-PCR with primers complementary to the ligated oligonucleotides and that contains unique barcodes.

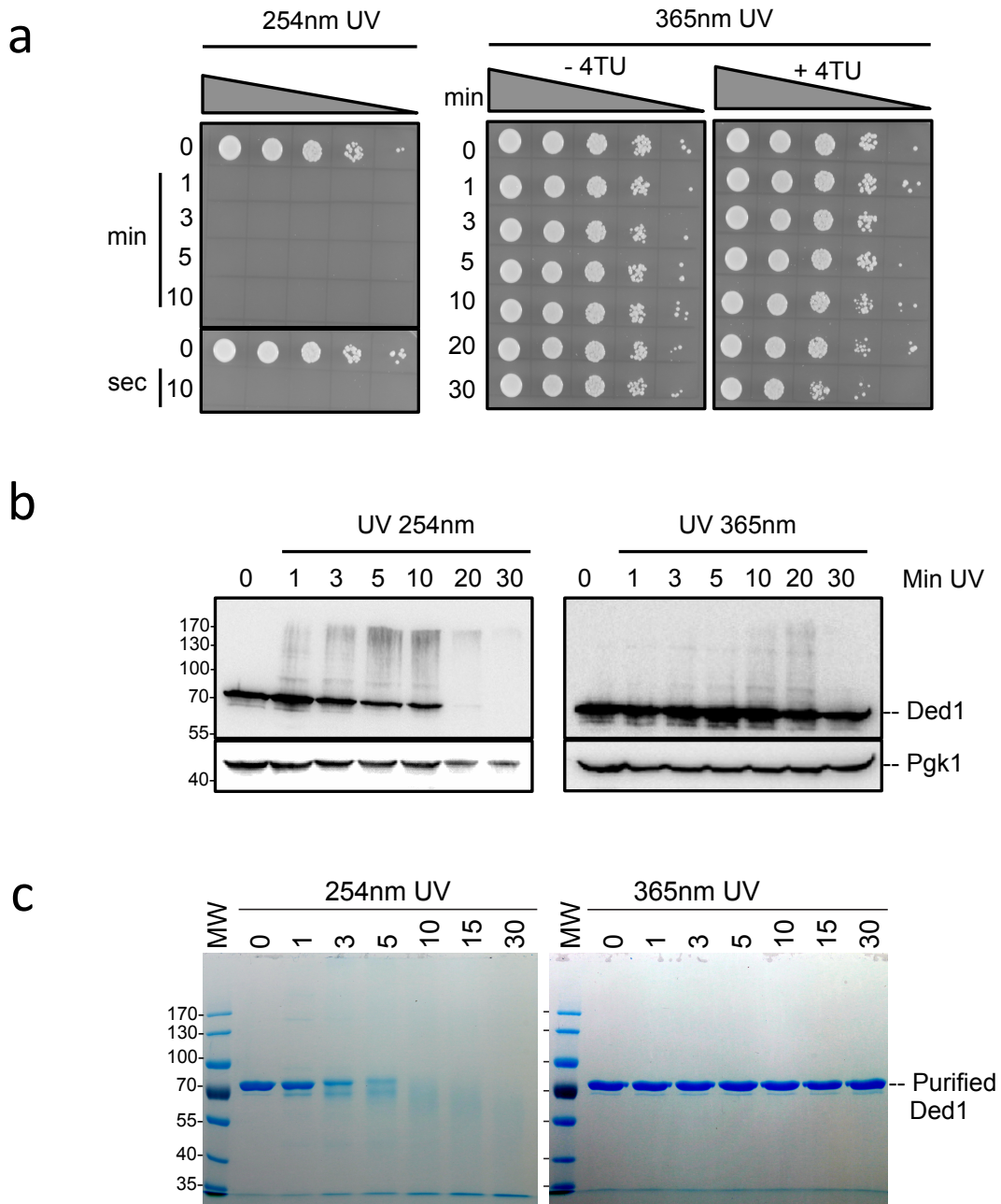


Figure 1: Effects of UV light at 254 nm and 365 nm on cell growth and protein stability

a. The wild type BY4742 yeast strain with the *DED1* gene under its own promoter and terminator in the YCplac111 plasmid was grown with shaking at 30°C until an OD_{600} of 0.4 in SD-LEU medium. The culture was then split into two parts: one portion was made 300 μ M in 4-thiouracil (4TU) and the other half had an equivalent volume of water added, and both were incubated for another 5 h. The cultures were aliquoted into culture plates and irradiated with UV light centered either at 254 nm or 365 nm for the indicated times in min. The lid of the culture plates was removed for the 254 nm radiation. A portion of the irradiated cells for each time point were serially diluted by a factor of 10 and spotted on SD-LEU agar plates that were incubated at 30°C for three days. **b.** The proteins from the remaining cells used in **a.** were extracted, separated on a 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and then probed with IgG specific for Ded1 or PGK1. **c.** Aliquots of 1.6 μ g of purified Ded1 were irradiated with either 254 nm (no lid) or 365 nm (with lid) UV light for the indicated times, the protein was separated on a 10% SDS-PAGE and then visualized with Coomassie blue.

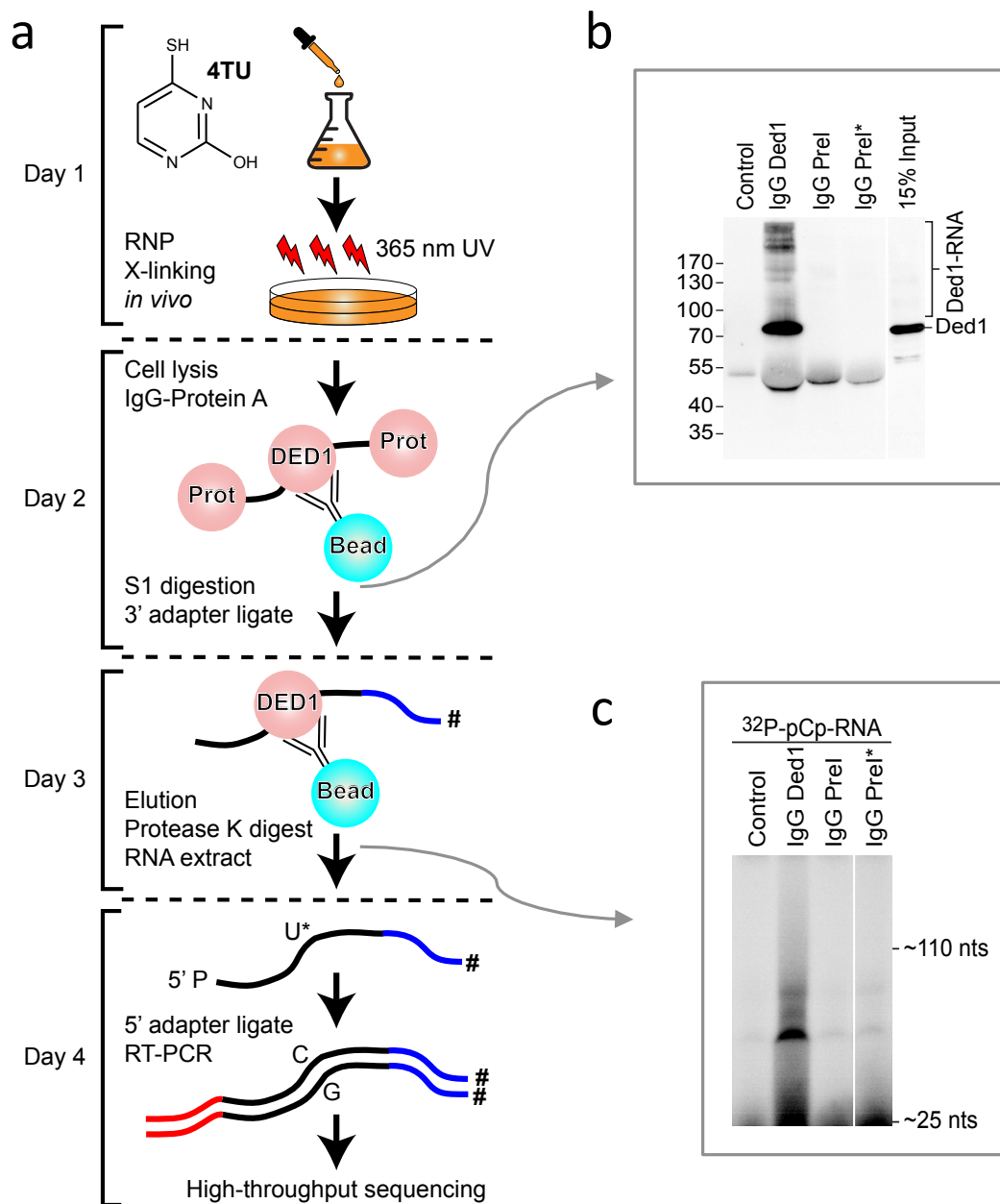


Figure 2: Ded1 interacts with RNA *in vivo* by using modified PAR-CLIP technique

a. Schematic representation of the modified PAR-CLIP technique. **b.** Crosslinked RNA-Ded1 complexes were isolated by immunoprecipitation (IP) with antibodies specific for Ded1 (IgG Ded1). The experimental fraction was compared to control fractions using two nonspecific pre-immune serums (IgG PreI; IgG-PreI*). Another control IP was performed without antibody (Control). The protein-RNA complexes were electrophoretically separated on a 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with IgG specific to Ded1. **c.** The RNA-Ded1 complexes were eluted from the IgG-Protein A beads, the protein removed with protease K, the RNA extracted, the recovered RNA was 3' ³²P-pCp-labeled, and then separated by electrophoresis on a 10% polyacrylamide gel containing 7 M urea. For experimental details, see the materials and methods section.

MATERIALS AND METHODS

Oligonucleotides used are listed in **Supplementary Table 2**.

Yeast strain

The wildtype BY4742 yeast strain (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ1*; Euroscarf) was transformed with a plasmid expressing the *DED1* gene under its own promoter and terminator in the YCplac111 plasmid, according to standard procedures¹⁴. This strategy enabled us to easily assay crosslinking on variant, including lethal, *DED1* genes without significantly perturbing the cells because the essential endogenous gene was always present. All experiments were done in triplicate starting with three independent cultures.

UV crosslinking

On living cell:

Yeast cells expressing Ded1 were grown at 30°C in 500 ml Synthetic Defined medium lacking leucine (SD-LEU) to an OD₆₀₀ of 0.4 (exponential phase). Cultures were split into two parts: one half was made 300 μM in 4-thiouracil that was added directly to the medium; the other half have the equivalent volume of water added. Both cultures were incubated to an OD₆₀₀ of 1.8–2.0 (~5 hours). Cells were harvested by centrifugation, quickly rinsed and then resuspended in 15 ml of ice-cold water to yield an OD₆₀₀ equivalent to ~32.

For the modified PAR-CLIP experiment, cells incubated with 300 μM 4TU in SD-LEU medium were placed in 8.5 cm polystyrene petri dishes cooled on ice and irradiated twice for 10 minutes with UV-A centered at 365 nm with shaking between irradiations. The polystyrene covers blocked irradiation below 290 nm⁸. Cells were then collected at 6,000 rpm at 4°C and the cell pellets were stored in -80°C until processed as described in the “modified PAR-CLIP” section.

For growth viability experiments, the equivalent of 2 ml of cells with an OD₆₀₀ of 1 were placed in 6 well culture plates cooled on ice and irradiated with 365 nm UV-A (with the polystyrene cover) or 254 nm UV-C (without cover) in a Stratalinker 2400 (Stratagene) for the indicated times. One hundred μl of crosslinked cells were then placed into a 96-well, sterile, microtiter plates, serially diluted by a factor of 10, spotted on SD-LEU agar plates and incubated at 30°C for 3 days.

On purified protein:

Aliquots of 1.6 µg purified Ded1¹⁵ in 20 µl 1X PBS were spotted on the rimmed wells of the low-evaporation lids of 96 well tissue culture plates (Falcon) and irradiated for various times with 365 nm UV-A or 254 nm UV-C. Samples irradiated with UV-A were covered with polystyrene petri dish lids. Samples were recovered and the wells rinsed with 10 µl of PBS and combined with the samples. SDS sample buffer was added and the proteins were resolved by electrophoresis on a 10% SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and then stained with Coomassie Blue (Instant Blue).

Modified PAR-CLIP

PAR-CLIP experiments were performed in triplicate as previously described with some modifications¹⁶. Briefly, on the second day of the experiment, after the culture incubation, 500 ml of cells were pooled, washed and lysed in the equivalent of two cell-pellet volumes of lysis buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT and 1X protease inhibitor cocktail (Roche cOmplete). One volume of 425–600 µm glass beads (Sigma) was added and the cells were lysed by vortexing in a FastPrep-24 (M.P. Biomedicals) at 4°C using four cycles of 30 sec on and 5 min rests. Beads and cell debris were removed by centrifugation in a Eppendorf 5415R centrifuge at 4°C at 6000 rpm, and then the lysates were further clarified by centrifugation at maximum speed for 15 min at 4°C. The protein concentration of the lysate was determined with the Bio-Rad Protein Assay using BSA as a standard.

The equivalent of 300 µg of protein from the clarified lysates was added to each of 12 individual tubes containing ~50 µl of Protein A-Sepharose CL-4B beads (GE healthcare) previously bound with anti-Ded1 IgG or with the pre-immune serum control. The volumes were adjusted to 500 µl with Ipp₃₀₀ buffer containing 20 mM Tris-base, pH 7.4, 300 mM NaCl, 0.1% Triton-X100, and 1mM MgCl₂ that was supplemented with 0.4 mg BSA, 0.4 mg heparin and 1M urea. The bead-lysates were rotated over 2 h on a turn wheel at 4°C. The bead-immunoprecipitates were washed 2–3 times with cold Ipp₃₀₀ buffer and then digested with 0.5 U/µl S1 nuclease (ThermoFisher Scientific #EN0321) in 100 µl of the included 1X S1 buffer containing 15% PEG₈₀₀₀ (Sigma-Aldrich) for 15 min at 30°C in an Eppendorf Thermomixer Comfort with a cycle of 15 sec mix at 1000 rpm and a 90 sec rest. The nuclease digestions were stopped by adding one volume of Ipp₁₂₀ buffer containing 20 mM Tris-base, pH 7.4, 120 mM NaCl, 5 mM EDTA, and 1% Triton-X100. Beads were then washed once with Ipp₁₂₀ buffer and twice with Ipp₃₀₀ buffer. The adapter oligonucleotide was ligated at the 3' end in a 100 µl reaction mix containing 10 units T4 RNA ligase (New England Biolabs), 1 pmole 3' DNA adapter (**Supplementary Table 2**), 1X manufacture's ligase buffer, 1 mM

ATP and 15% PEG₈₀₀₀ overnight at 16°C in a Eppendorf Thermomixer Comfort with a cycle of 15 sec at 1000 rpm and 90 sec rests.

On the third day, the ligation reactions were stopped and the Protein A-Sepharose beads washed once with Ipp₁₂₀ buffer and then twice with Ipp₁₅₀ buffer (same as Ipp₃₀₀ buffer except with 150 mM NaCl). The bound proteins with the crosslinked RNA were eluted twice with 300 µl of 0.1 M glycine, pH 2.3, for 15 min at 4°C with mixing. The 12 fractions were combined and the acidity of the eluant was then adjusted to pH ~7 with NaOH. The proteins were eliminated by the addition of 1 mg/ml proteinase K (Sigma) supplemented with 1% Triton X-100, 0.5% SDS and 5 mM CaCl₂, and incubated at 55°C for 35 min in an Eppendorf Thermomixer Comfort with a cycle of 15 sec at 1000 rpm and a 90 sec rest. The RNA was then recovered by making the solution 0.3 M in potassium acetate, extracting with an equal volume of water-saturated phenol, extracting twice with an equal volume of chloroform isoamyl alcohol (24:1), and then precipitating with 2.5 volume ethanol overnight at -20°C.

On the last day of the experiment, RNAs were collected by centrifugation in an Eppendorf 5415R for 20 min at 4°C at 13,000 rpm followed by two washes with cold 70% ethanol. The resulting RNAs pellets were allowed to dry and then resuspended in 9 µl nuclease free water and mixed with 21 µl RNA ligase reaction that contained 15 units T4 RNA ligase, 2 pmole DNA 5' adapter (**Supplementary Table 2**), 1X ligase buffer, 1 mM ATP and 15% PEG₈₀₀₀. The ligation was performed for 2 hours at 55°C in an Eppendorf Thermomixer Comfort (15 sec at 1000 rpm, 90 sec rest). RNAs were purified with a NucleoSpin RNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel) and eluted with 35 µl water. We used 4.6 µl of ligated RNA to synthesize the cDNA library. The RNA RT primer (**Supplementary Table 2**) at 1 pmole was added and the samples were heated at 50°C for 5 min. The reverse transcription reactions were done with a Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen) according to the manufacture's instructions and incubated for 90 min at 50°C. The RNAs were hydrolyzed by adding 40 µl of a solution containing 150 mM KOH, 20 mM Tris-HCl and incubating for 10 min at 90°C. The solution was then neutralized by adding ~40 µl of 150 mM HCl.

The PCR reactions were multiplexed with the Illumina PCR reverse primers RPI1, RPI2 and RPI4 (**Supplementary Table 2**). To reduce potential PCR artifacts, each cDNA reaction was divided into 7–8 tubes of 10 µl. The PCR reaction mix contained 1 unit of Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs), 1X HF Phusion buffer, 0.2 mM dNTP, 0.5 pmol of the respective gene-specific reverse and forward primers (**Supplementary Table 2**) in a final volume of 50 µl, and PCR reactions were carried out for 25 cycles in a Bio-Rad T100 Thermal Cycler. The PCR products were combined and concentrated with a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) according to the manufacture's instructions and eluted in 50 µl of Elution buffer. SDS loading buffer was

added and the samples were electrophoretically separated on a 6% acrylamide gel containing ethidium bromide. Material above the ligated primers (~120 bp) up to ~200 bp was recovered, and the cDNA was extracted by pulverizing the gel and incubating overnight with mixing at 4°C in a solution containing 500 mM ammonium acetate, 0.1% SDS and 0.1 mM EDTA. The supernatant was recovered by centrifugation with Poly-Prep Chromatography Columns (Bio-Rad) to remove the polyacrylamide gel debris, and then 2.5 volumes of 100% ethanol was added and the cDNA precipitated overnight at -20°C. The cDNAs were collected by centrifugation for 20 min at 4°C followed by two washes with cold 70% ethanol. The cDNA pellets were dried, resuspended in 14 µl nuclease free water and submitted to high-throughput sequencing using Illumina NextSeq sequencing at the Next Generation Sequencing (NGS) core facility at the Université Paris-Saclay/CNRS (<https://www.i2bc.paris-saclay.fr/spip.php?article399&lang=en>).

Protein characterization

For **Figure 1b**. Approximately 1.9 ml of crosslinked cells were recovered by centrifugation at maximum speed and the total proteins were rapidly extracted as previously described with minor modification¹⁷. The pellets were resuspended in 150 µl 1.85 N NaOH with 7.4% β-mercaptoethanol and incubated on ice for 10 min. Then 150 µl of 50% TCA was added and incubated 10 min on ice. Proteins were pelleted by maximum speed centrifugation at 4°C, washed twice with ice-cold 100% acetone and air dried. The samples were resuspended in SDS loading buffer and the proteins electrophoretically separated on a 10% SDS-PAGE. The proteins were subsequently electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes that was probed with IgG specific for Ded1 and PGK1.

For **Figure 2b**. Crosslinked protein-RNA complexes on the IgG-Protein A-Sepharose beads were digested with nuclease S1 and then directly eluted with 0.1 M glycine, pH 2.3, as described above (no adapter ligation step). The pH was adjusted to ~7 with NaOH, the solution was made 150 µg/ml, final, in sodium deoxycholate and then the proteins were precipitated with 15% TCA for 30 min on ice. The precipitant were recovered by centrifugation at maximum speed in an Eppendorf 5415R, the pellet washed twice with cold acetone, and then dried. The proteins were resuspended in SDS loading buffer, electrophoretically separated on a 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and then probed with Ded1-specific IgG.

3' end-labeling of the RNA

For **Figure 2c**. The optimization of the crosslinking conditions and the recovery of the RNA was monitored by 3' ^{32}P -pCp end-labeling of the RNA. After crosslinking, binding on IgG-Protein A Sepharose beads and S1 digestion, the protein-RNA complex was eluted with 0.1 M glycine, pH 2.3, as described above, and the pH adjust to ~ 7 with NaOH. The proteins were eliminated by the addition of proteinase K, the RNAs were extracted by phenol and chloroform-isoamyl alcohol, and then ethanol precipitated. The recovered RNAs were labeled with in 150 μl volumes with 10 units of T4 RNA ligase (New England Biolabs) in the provided reaction buffer with 250 μCi of ^{32}P -pCp (3000 Ci/mmol; American Radiolabeled Chemicals Inc) over night at 4°C . An equal volume of 10 M urea loading buffer was added that contained 20% sucrose, 0.02% xylene cyanol, 0.02% bromophenol blue, 0.5% SDS, 10 mM Tris-base, 8.3 mM boric acid and 0.1 mM EDTA, and the RNAs were electrophoretically separated on a 6% polyacrylamide gel containing 7 M urea. The image was visualized with a Typhoon FLA9500 phosphoimager (GE Healthcare) using a BAS MS imaging plate (Fujifilm).

Growth curves

Overnight cultures were diluted to an OD_{600} of 0.15 in minimal medium lacking leucine (SD-LEU) in the absence or presence of different concentration of 4-thioU (from 300 μM to 600 μM) and aliquoted into Tissue Culture Plates with low evaporation lids (Falcon). Cultures were grown for 28 h at 30°C in a Tecan Infinite M200Pro microplate reader with shaking. The absorption at 600 nm was measured every 10 min.

Supplementary Table 1: Outline and comparison of PAR-CLIP techniques

| | PAR-CLIP | Modified PAR-CLIP |
|--|---|---|
| 4TU | 100 μ M for 18h | 300 μ M for 5h |
| Irradiation | 365 nm (no lid) | 365 nm (with lid) |
| Lysate RNase digestion | Partial RNase T1 digestion of Lysate (1 U/ μ l) | NO. Less complex recovered (Supplementary Figure 2) |
| IgG-protein A Sepharose | Bind protein in lysate | Bind protein in lysate |
| Nuclease digestion of bound complexes | Second RNase T1 digestion (100 U/ μ l) | Single RNase S1 digestion (0.5 U/ μ l) |
| Elution of complexes | YES | NO |
| Dephosphorylation and 5' labelling of crosslinked RNA | RNA 3' dephosphorylated and 5' labeled using T4 polynucleotide kinase and [γ - ³² P-ATP] | NO. Nuclease S1 leaves a 3' hydroxyl. Dephosphorylation unnecessary |
| Purification of protein RNA-complexes | RNZ-protein complexes SDS-PAGE purified; RNA-protein extracted from gel | NO. Stringent washing of the IgG-bound protein-RNA; no loss due to gel extraction |
| On-bead 3' adapter ligation | NO | 3' adapter added; washing removes free adapter; no adapter concatemers |
| Elution of complexes | NO | YES |
| Protease K treatment | YES | YES |
| RNA extraction | YES | YES |
| 3' adapter ligation | YES | NO |
| 5' adapter ligation | YES | YES |
| RT-PCR | YES | YES |
| Duration | 6 days | 4 days |

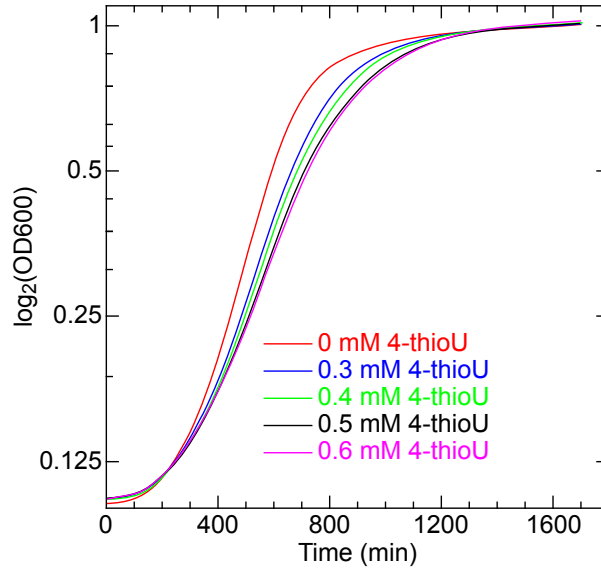
Supplementary Table 2: Oligonucleotides used in this study

| Name | Sequence |
|--------------|---|
| 3' adaptater | 5' -p-rNrNrN rNTG GAA TTC TCG GGT GCC AAG G-AaMO- 3' ^a |
| 5' adaptater | 5' -AmMC6-GT TCA GAG TTC TAC AGT CCG ACG ATC NrNrN rN- 3' ^b |
| RT primer | 5' -GCC TTG GCA CCC GAG AAT TCC A- 3' |
| RPI1 | 5' -CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT <u>CGT GAT</u> GTG ACT GGA GTT CCT TGG CAC CCG AGA ATT CCA- 3' |
| RPI2 | 5' -CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT <u>ACA TCG</u> GTG ACT GGA GTT CCT TGG CAC CCG AGA ATT CCA- 3' |
| RPI4 | 5' -CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT <u>TGG TCA</u> GTG ACT GGA GTT CCT TGG CAC CCG AGA ATT CCA- 3' |
| FP1 | 5'-AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC ACG TTC AGA GTT CTA CAG TCC GA- 3' |

^a: 3' end blocked with 2',3' dideoxy (cordycin)

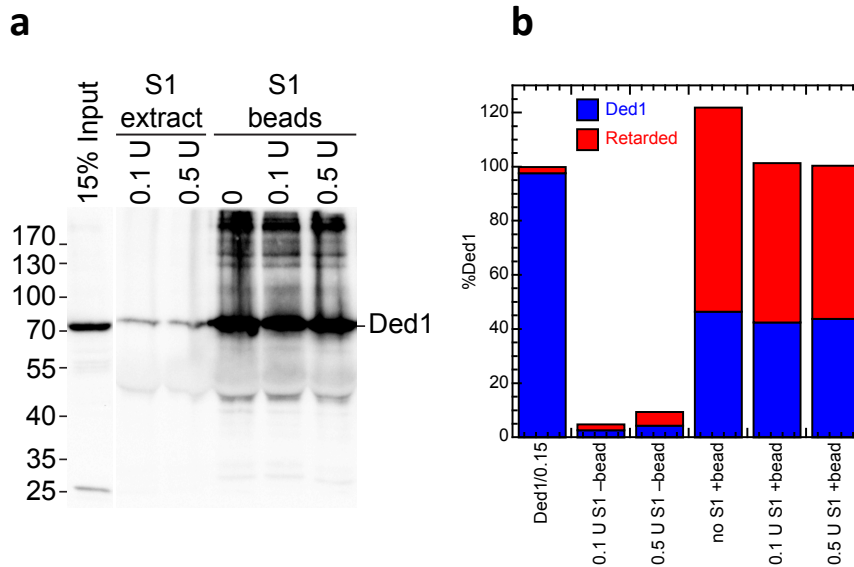
^b: 5' end blocked with 5' amino(CH₂)₆

RP: reverse primer; FP: forward primer. The index of 6 nucleotides was underlined.



Supplementary Figure 1: The 4-thiouracil has little affect on cell growth

Growth curves of the wildtype BY4742 *S. cerevisiae* strain cultured with five different concentrations of 4-thiouracil, from 0 to 600 μ M, in SD-LEU medium incubated at 30°C. Y-axis represent optical density at 600 nm (OD600) in logarithmic scale and X-axis the growth time in minutes. Experiments were made with two independent experiments for each 4-thioU concentration (n=2).



Supplementary Figure 2: Effect of S1 nuclease treatment before and during IP

a. Western blot analysis of Ded1-RNA complexes isolated with Ded1-specific IgG bound on Protein A-Sepharose beads that were treated with the indicated concentrations of nuclease S1 either before (extract) or after (beads) fixing on the Ded1-IgG-Protein A-Sepharose beads. The eluted RNA-Ded1 complexes were electrophoretically separated on a 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and revealed with IgG specific for Ded1. **b.** Quantification of bands shown in **a**.

REFERENCES

- 1 Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T. & Preiss, T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nature Chemical Biology*, 1-15, doi:10.1038/nrm.2017.130 (2018).
- 2 Sharma, D. & Jankowsky, E. The Ded1/DDX3 subfamily of DEAD-box RNA helicases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **49**, 343-360, doi:10.3109/10409238.2014.931339 (2014).
- 3 Soto-Rifo, R. & Ohlmann, T. The role of the DEAD-box RNA helicase DDX3 in mRNA metabolism. *WIREs RNA* **4**, 369-385, doi:10.1002/wrna.1165 (2013).
- 4 Lee, F. C. Y. & Ule, J. Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Molecular Cell* **69**, 354-369, doi:10.1016/j.molcel.2018.01.005 (2018).
- 5 Licatalosi, D. D., Ye, X. & Jankowsky, E. Approaches for measuring the dynamics of RNA-protein interactions. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **11**, e1565-e1565, doi:10.1002/wrna.1565 (2020).
- 6 Ule, J. *et al.* CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**, 1212-1215, doi:10.1126/science.1090095 (2003).
- 7 Lin, C. & Miles, W. O. Beyond CLIP: advances and opportunities to measure RBP-RNA and RNA-RNA interactions. *Nucleic Acids Research* **47**, 5490-5501, doi:10.1093/nar/gkz295 (2019).
- 8 Greenberg, J. R. Ultraviolet light-induced crosslinking of mRNA to proteins. *Nucleic Acids Res* **6**, 715-732, doi:10.1093/nar/6.2.715 (1979).
- 9 Meisenheimer, K. M. & Koch, T. H. Photocross-linking of nucleic acids to associated proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* **32**, 101-140, doi:10.3109/10409239709108550 (1997).
- 10 Hafner, M. *et al.* Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129-141, doi:10.1016/j.cell.2010.03.009 (2010).
- 11 Tanner, N. K., Hanna, M. M. & Abelson, J. Binding interactions between yeast tRNA ligase and a precursor transfer ribonucleic acid containing two photoreactive uridine analogues. *Biochemistry* **27**, 8852-8861, doi:10.1021/bi00424a025 (1988).
- 12 Creamer, T. J. *et al.* Transcriptome-wide binding sites for components of the *Saccharomyces cerevisiae* non-poly(A) termination pathway: Nrd1, Nab3, and Sen1. *PLoS Genet* **7**, e1002329, doi:10.1371/journal.pgen.1002329 (2011).
- 13 Zarnegar, B. J. *et al.* irCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions. *Nature methods* **13**, 489-492, doi:10.1038/nmeth.3840 (2016).
- 14 Iost, I., Dreyfus, M. & Linder, P. Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *The Journal of biological chemistry* **274**, 17677-17683 (1999).
- 15 Cordin, O., Tanner, N. K., Doère, M., Linder, P. & Banroques, J. The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity. *The EMBO Journal* **23**, 2478-2487, doi:10.1038/sj.emboj.7600272 (2004).
- 16 Spitzer, J. *et al.* PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation): a step-by-step protocol to the transcriptome-wide identification of binding sites of RNA-binding proteins. *Methods in enzymology* **539**, 113-161, doi:10.1016/B978-0-12-420120-0.00008-6 (2014).
- 17 Horvath, A. & Riezman, H. Rapid protein extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1305-1310, doi:10.1002/yea.320101007 (1994).

1.3. Résultats ne figurant pas sur l'article

Résumé rapide des étapes du PAR-CLIP modifiée

En résumé, les ARN ayant incorporés le 4TU ont été réticulés à 365 nm par la technique de PAR-CLIP modifiée, sur trois cultures indépendantes. Les cellules contenant les complexes Ded1-ARN ont ensuite été lysées et purifiées par IP avec l'utilisation de billes sépharose A préalablement associées à des anticorps anti-Ded1. Un sérum pré-immun a été utilisé comme contrôle de fixation non spécifique. Ensuite, les ARN associés à Ded1 ont été partiellement digérés avec la nucléase S1, ce qui a permis d'avoir des fragments d'ARN entre 20-100 nucléotides. Un adaptateur a été ligaturé à l'extrémité 3' de l'ARN durant l'IP. Après l'éluion, les protéines ont été éliminées par l'action de la protéinase K, puis un deuxième adaptateur a été ligaturé à l'extrémité 5' des ARN. L'ARN résultant a été reverse transcrit en ADNc¹, puis amplifié par PCR avec des amorces *reverse* contenant un index de 6 nucléotides (amorce Illumina) afin de préparer une bibliothèque d'ADNc pour le séquençage à haut débit (**Figure 18B**). Le séquençage a été réalisé en association avec l'équipe de Claude Thermes dans la plateforme de séquençage de Gif-sur-Yvette.

L'analyse a été réalisée avec trois cultures indépendantes : (i) de cellules exprimant Ded1 WT, (ii) de cellules exprimant un mutant de Ded1 (DQAD) qui s'accroche de façon irréversible aux ARN, (iii) de cellules exprimant Ded1 WT qui ont été privées de glucose, bloquant ainsi l'initiation de la traduction, (iv) de cellules exprimant Ded1 WT qui ont été traitées avec du cycloheximide, immobilisant les ribosomes en cours d'élongation, avant l'étape de *crosslink*, et (v) de cellules d'une souche Δ -pat1 ne pouvant plus former de *P-bodies*. Une partie des cultures, des conditions (i) et (ii), ont été récupérées pour l'analyse transcriptomique, afin de comparer le niveau de messager au moment du *crosslink*.

A la sortie du séquenceur, la plateforme nous a envoyé des fichiers volumineux contenant plusieurs millions de lectures (*reads*) au format « fastq ». Il s'agit de fichiers textes contenant pour chaque *read* : un identifiant unique, la séquence nucléotidique et la qualité du séquençage. Ils ont préalablement été prétraités par la plateforme : les adaptateurs ont été retirés informatiquement pour n'avoir que le *read* avec les index de part et d'autre. De plus, la qualité des fichiers a également été vérifiée par « fastqc » donnant un rapport complet sur la qualité de base, la taille moyenne et les défauts potentiels des *reads*. Par la suite, nous avons procédé à l'analyse bio-informatique (cf. matériels et méthodes) en vue de générer des tableaux de comptages (de *reads*) et effectuer une analyse différentielle entre les conditions

¹ Initialement, l'optimisation de la technique a été réalisée en ligaturant l'ARN avec un autre jeu d'adaptateurs contenant des sites de coupures pour deux enzymes de restrictions différentes, puis en sous-clonant l'ADNc résultant dans un vecteur d'expression pBlueScript II. L'utilisation de ce vecteur a permis la détection rapide de la présence ou non de l'insert par α -complémentation : s'il y a insert, les colonies restent blanches sinon elles deviennent bleues.

grâce à des logiciels disponibles sur le serveur de la plateforme FRIGG de l'IBPC. L'analyse bio-informatique de la condition (ii) Ded1-DQAD a donné un profil pratiquement similaire à celui de la condition WT, probablement en raison de la présence de Ded1 endogène en plus de la protéine Ded1-DQAD exprimée par un plasmide. L'analyse des conditions (iv) cycloheximide et (v) Δ -pat1 sont toujours en cours, c'est pourquoi je ne présenterai que les résultats préliminaires des conditions (i) WT et (iii) Δ -glucose. Il est prudent de rappeler que lorsque les cellules sont privées de glucose, il y a une inhibition de la traduction, une diminution de la teneur en polysomes cytosoliques, une augmentation de ribosomes uniques (monosomes) et une formation accrue de *P-bodies* et de GS après 15 min de carence (Janapala *et al.*, 2019).

Ded1 se lie sur toutes les classes d'ARN mais à des proportions variées

Environ 90000-200000 *reads* uniques ont été obtenus, pour chaque réplicats, et cartographiés sur le génome de levure (S288C), ce qui nous a permis de déterminer les substrats ARN de Ded1. L'analyse de la distribution des *reads* a fourni des informations sur le ciblage de Ded1 ; Nous avons obtenu ~84% du crosslink sur des ARNm et ~12% sur des ARNr, dont majoritairement sur le 18S qui fait partie de la sous-unité ribosomique 40S qui dans le cadre du PIC scanne le 5'UTR (**Figure 19**).

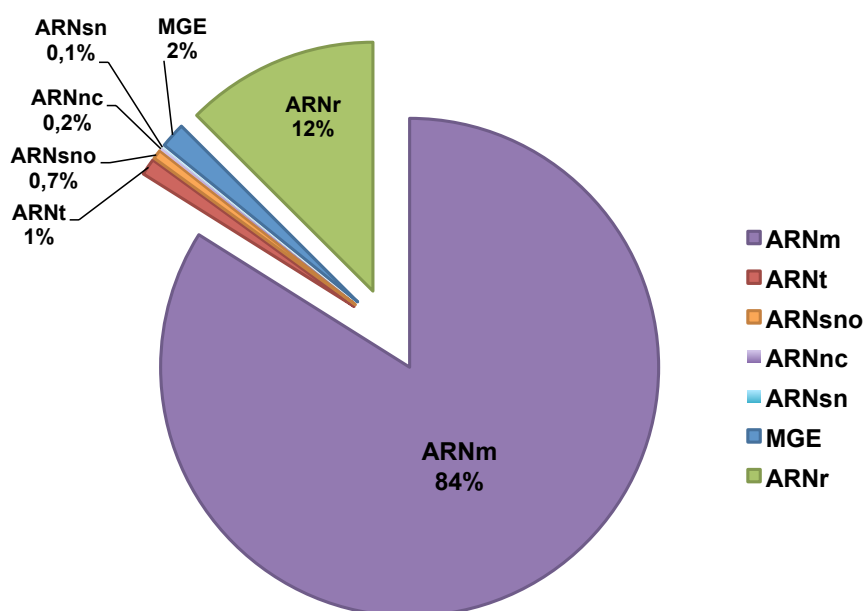


Figure 19 : Ded1 se lie principalement sur des ARNm

Les *reads* de deux réplicats biologiques de la condition WT ont été moyennés. Le « camembert » a été généré à partir des *reads* totaux de chaque catégorie d'ARN. MGE, *mobile genetic elements*.

Ce résultat est cohérent avec une étude publiée précédemment (Guenther et al., 2018). Des résultats similaires ont été obtenus pour l'orthologue humain DDX3X (Oh et al., 2016, Valentin-Vega et al., 2016, Calviello et al., 2019). Un profil similaire a été obtenu pour la condition Δ -glucose, avec moins d'ARNr. Nos analyses préliminaires indiquent que Ded1 *crosslink* un sous-ensemble d'ARNm codant pour des facteurs de traduction, et particulièrement ceux qui codent pour des facteurs d'élongation de la traduction (données non représentées). En ce qui concerne les ARNr, nous avons identifié un site de liaison sur l'hélice 16 de l'ARNr 18S (flèches, Figure 20A-B).

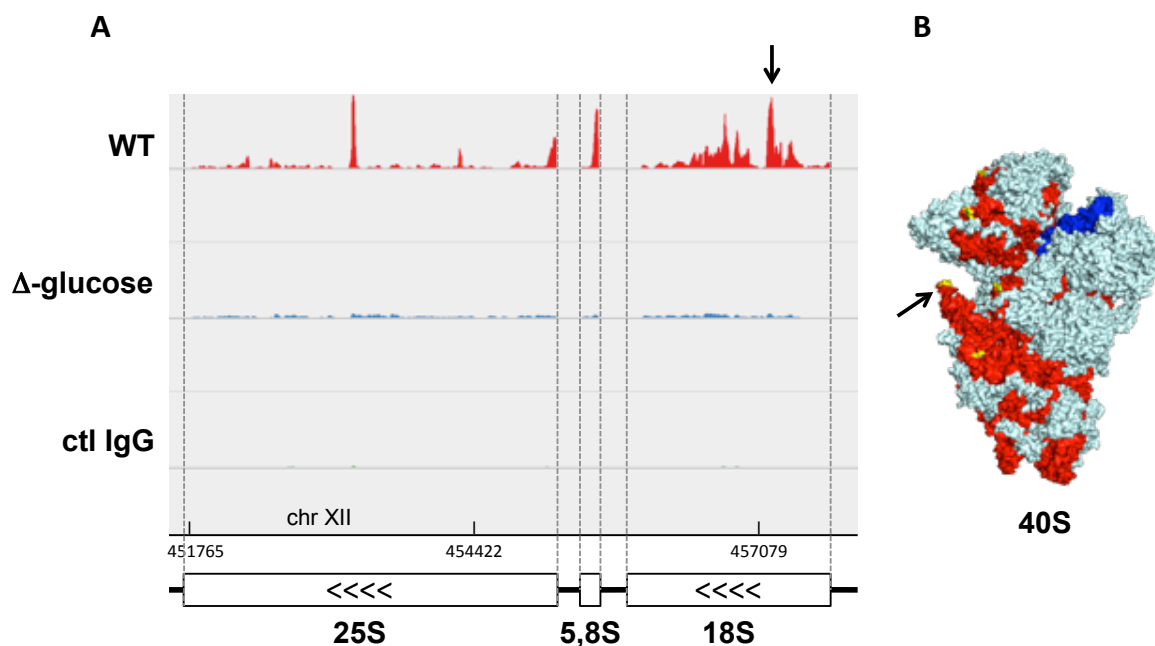


Figure 20 : Ded1 se lie principalement sur l'hélice 16 de l'ARNr 18S

A. Densité de *reads* de Ded1 sur le pré-ARNr 35S. Les *reads* de deux réplicats de chaque condition ont été mélangés pour être visualisés sur le logiciel IGV (*Integrated Genome Browser*). « Ctl IgG » correspond à la condition où l'IP a été réalisée avec un sérum pré-immun. Hauteur max. 1300 *reads*. **B.** Localisation des *reads* (rouge) sur la structure cristalline de la sous-unité ribosomique 40S, PDB : AJAQ. Les sites de mutation (T>C) ont été colorés en jaune, indiquant les sites de liaison de Ded1 sur l'ARNr 18S. L'image a été générée avec le logiciel Pymol.

Ceci a également été trouvé par d'autres pour Ded1 et DDX3X (Guenther et al., 2018, Oh et al., 2016). L'hélice 16 se trouve sur la petite sous-unité ribosomale au niveau du canal d'entrée de l'ARNm. La présence de Ded1 à cet endroit pourrait être liée à la résolution de structures secondaires de l'ARNm afin de faciliter le balayage par le 43S lors de l'initiation de la traduction, ou encore lors des étapes d'élongation (Hinnebusch, 2014). Ded1 *crosslink* également sur l'ARN 5,8S et deux sites de l'ARNr 25S. De façon intéressante, ce profil n'a pas été observé dans la condition Δ -glucose suggérant que le *crosslink* sur le ribosome a probablement eu lieu lors de la traduction (**Figure 20A**). Cependant, le résultat de la **Figure**

19 ne donne pas d'indication sur la quantité de gènes réticulés à Ded1. En effet, Ded1 a réticulé ~50% d'ARNm (3013 gènes sur 5995) dans la condition WT et ~37% d'ARNm dans la condition Δ -glucose (**Figure 21**).

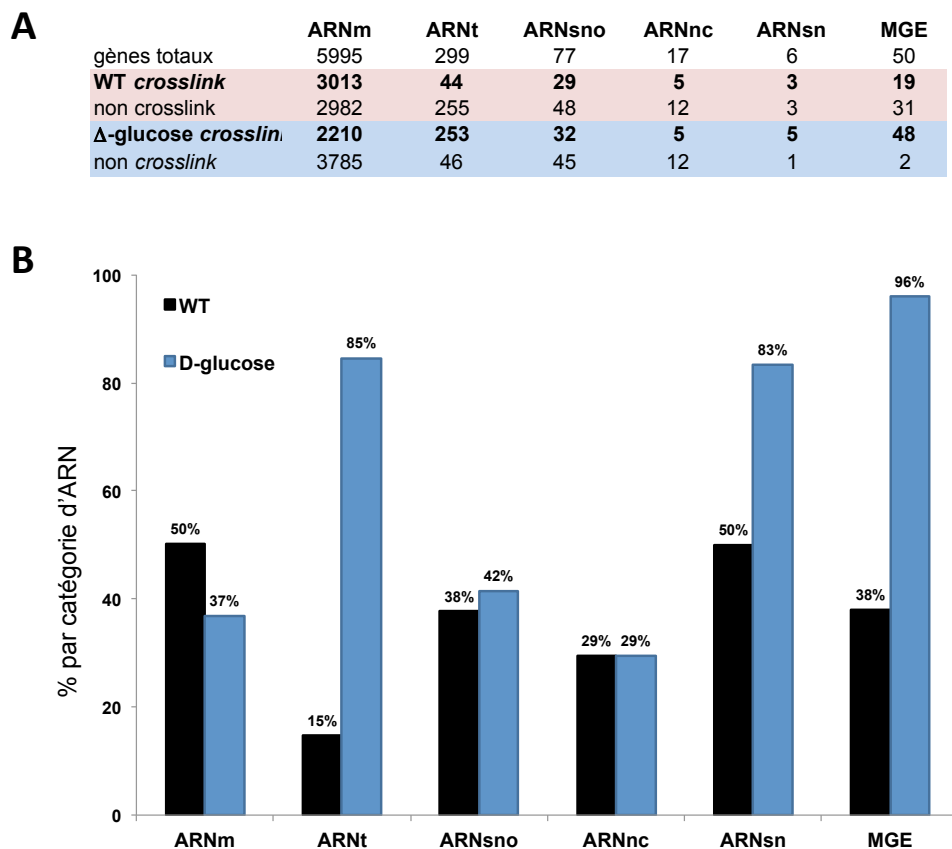


Figure 21 : Comparaison du niveau de *crosslink* obtenus au sein de chaque classe d'ARN dans les conditions WT et Δ -glucose

Le tableau du haut représente le nombre total de gènes, réticulés ou non, pour chaque classe d'ARN. Les données de ce tableau ont été converties en pourcentage pour être représentées dans le graphique du bas.

Ces résultats suggèrent tout d'abord que Ded1 ne se fixe pas sur tous les ARNm, contrairement à ce qui a été montré précédemment (Guenther et al., 2018). De plus, il n'y a pas de diminution importante quant à la récupération d'ARN réticulés à Ded1 dans la condition Δ -glucose, ce qui suggère que Ded1 est également liée à l'ARNm en dehors de l'initiation de la traduction. De façon intéressante, le pourcentage de réticulation a augmenté de presque 1,5 fois pour les ARNsn, 6 fois pour les ARNt et 2,5 fois pour les éléments génétiques mobiles (MGE). Cependant, les séquences de ces deux dernières classes d'ARN sont très similaires et sont présentes en plusieurs copies sur le génome. De ce fait, les *reads* obtenus pour ces deux classes ne sont pas « uniques » rendant l'interprétation difficile. Il n'y a pas eu de changement dans le *crosslink* des ARNsno et ARNnc.

Absence de corrélation entre l'abondance et la taille des ARNm liés à Ded1

Nous avons ensuite évalué l'abondance des ARNm réticulés à Ded1. Pour cela, nous avons utilisé les tableaux de comptage des données de transcriptomique et de PAR-CLIP afin de générer des valeurs dites RPKM (lecture par kilobase de transcrit par million de lectures alignées). La mesure en RPKM de la densité de *reads* reflète la concentration d'un transcrit dans l'échantillon de départ en normalisant la longueur de l'ARN et le nombre total de *reads* (cf matériels et méthodes). Malheureusement, nous n'avons pas généré la transcriptomique pour la condition Δ -glucose, c'est pourquoi seules les valeurs de transcriptomique de la condition WT ont été utilisées. La demi-vie des ARNm étant relativement longue, nous avons considéré que 20 min de carence en glucose ne devrait pas modifier le niveau de messagers dans la cellule (Miller *et al.*, 2011). Il a également été montré que le retrait de glucose n'entraîne pas une inhibition de la traduction en raison d'une instabilité accrue de l'ARNm ; il n'y a pas d'inhibition brutale de l'abondance d'ARNm et ARNr (Ashe *et al.*, 2000). De façon intéressante, Ded1 a réticulé les ARN de façon non aléatoire. Il n'y a pas de corrélation évidente entre l'abondance des ARNm (transcriptomique) et des ARNm obtenus après *crosslink* dans la condition WT ($R^2=0,27$) et Δ -glucose ($R^2=0,11$) (**Figure 22A-B**).

De plus, il n'y a pas de corrélation entre la taille des ARNm et le nombre de *reads* obtenus après le *crosslink* (**Figure 22C-D**). Ceci suggère que Ded1 peut très bien se fixer sur des ARNm peu abondants et petits, et suggère également qu'il existe très probablement un motif ou une structure reconnue par Ded1, d'où l'absence de fixation non spécifique. Afin d'identifier un motif, nous avons soumis plusieurs séquences très fortement enrichies dans un outil d'analyse de séquence, MEME (<http://www.mem-suite.org>). Hormis une préférence pour l'adénine et guanine, aucun motif de séquence n'a pu être identifié sur le site de *crosslink* de l'ARNm. Le même constat a été fait pour l'orthologue humain DDX3X (Oh *et al.*, 2016, Valentin-Vega *et al.*, 2016). Par ailleurs, d'après le dogme actuel, Ded1 se fixerait sur des ARNm ayant des 5'UTR longs et structurés. Cependant, l'analyse des *reads* sur le logiciel de visualisation IGV (*Integrated Genome Browser*) a montré que Ded1 se fixe principalement sur la région codante, puis sur les régions UTR, en particulier la région 3'UTR.

Ded1 se fixe sur son propre messager

Nous avons également vérifié les 15 « meilleurs » substrats de Ded1 en analysant directement les tableaux de comptages des conditions WT et Δ -glucose, sans passer par l'analyse différentielle dans un premier temps. Le but ici a été de vérifier si Ded1 se fixe sur les mêmes messagers dans les deux conditions.

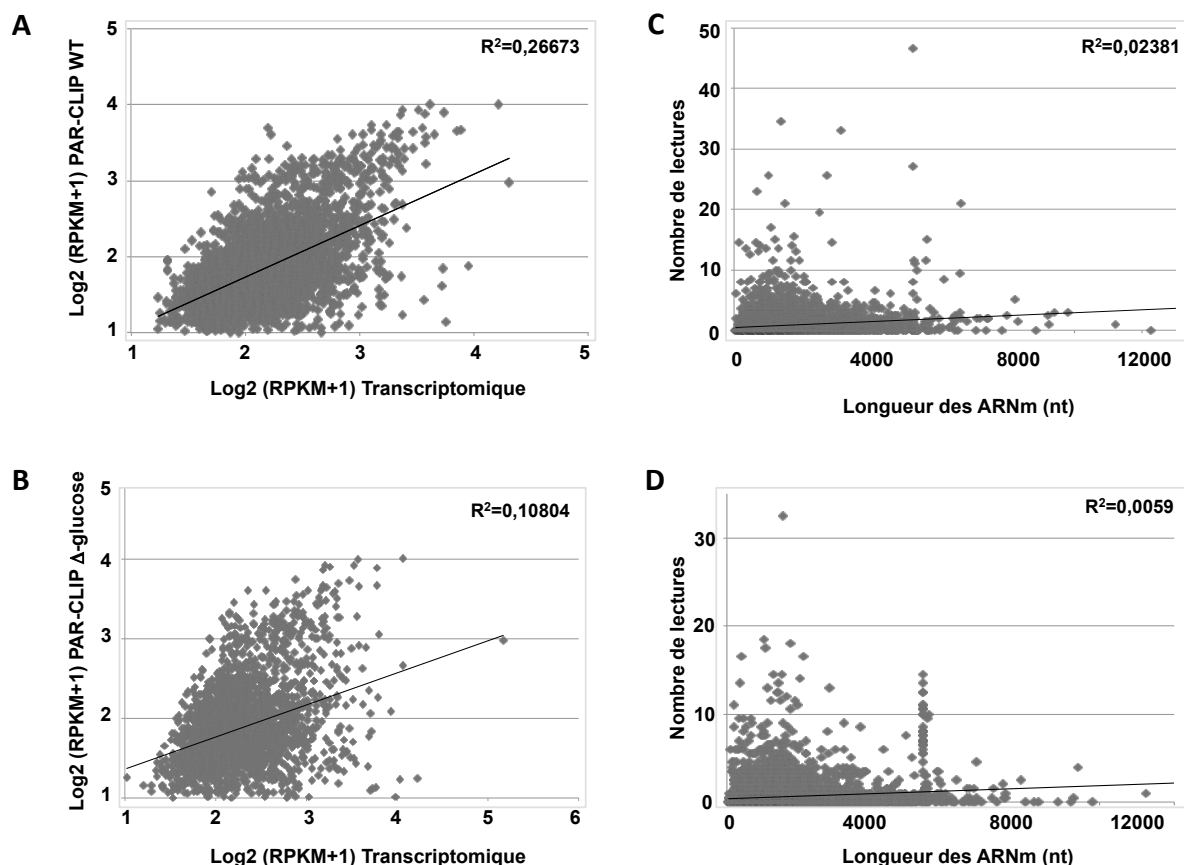


Figure 22 : Les ARNm réticulés ne présentent pas de corrélation avec le niveau de transcrits et la taille des ARNm.

Diagrammes de dispersion : (i) des niveaux d'expression de transcrits totaux en fonction de transcrits récupérés des conditions WT (A) et Δ -glucose (B), (ii) de la longueur des ARNm en fonction du nombre de lectures obtenues, après le PAR-CLIP modifiée, pour les conditions WT (C) et Δ -glucose (D).

Pour faciliter l'analyse, plusieurs paramètres ont été étudiés ; la demi-vie et le niveau de synthèse des ARNm, la quantité moyenne de protéines codées par ces ARNm/cellules, la longueur des 5' et 3' UTR, l'occupation ribosomique et le niveau d'ARNm/cellule. L'interprétation des résultats a été assez difficile, il n'y a eu aucune corrélation mise à part que ces ARN sont, pour la majorité, abondamment transcrits et présentent, des 5'UTR très courts par rapport à leurs 3'UTR. Pour compléter, nous avons soumis la liste de ces gènes pour une analyse GO (*Gene Ontology*) sur le site SGD (*Saccharomyces Genome Database*) (<http://www.yeastgenome.org/>). De façon intéressante, Ded1 semble se lier sur des ARNm codant pour des protéines impliquées dans les processus métaboliques. De plus, sur 15 ARNm, 7 étaient toujours présents dans la condition Δ -glucose (données non représentées).

De façon inattendue, l'ARNm de Ded1 figure parmi les substrats préférés de Ded1 dans les deux conditions, ce qui suggère que Ded1 peut réguler sa propre expression. Ce résultat est cohérent avec des résultats précédents publiés par notre laboratoire, et d'autres,

qui montrent que la surexpression de Ded1 inhibe la traduction et la croissance cellulaire (Senissar et al., 2014, Hilliker et al., 2011). Afin d'analyser les sites de fixation de plus près, nous avons vérifié la localisation des *reads* sur IGV. Ded1 se fixe sur deux grandes portions de la région codante mais également sur le 3'UTR (**Figure 23**). En condition de carence en glucose, Ded1 a très peu fixé l'ARNm de Ded1 suggérant que la liaison dans la région codante a probablement eu lieu pendant la traduction. De façon assez surprenante, Ded1 s'est fixée sur le 3'UTR d'un transcrite de Ded1 très peu abondant dans la cellule (flèche, **Figure 23**) renforçant l'hypothèse que Ded1 serait impliquée dans la régulation de son propre message. Il en est de même pour d'autres ARNm : ce constat suscite une analyse plus approfondie dans le futur (cf. Discussion).

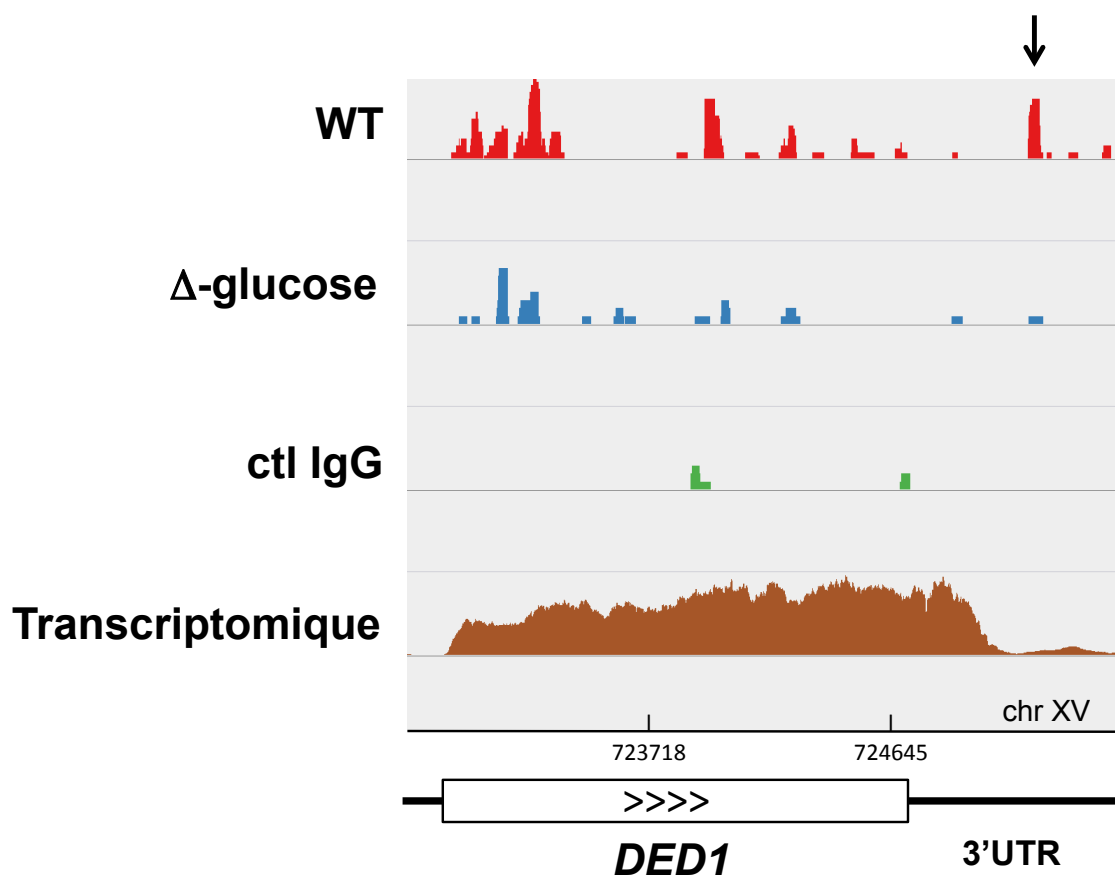


Figure 23 : Ded1 se lie sur son propre ARNm

Les *reads* de deux réplicats de chaque condition ont été mélangés pour être visualisés sur le logiciel IGV. « Ctl IgG » correspond à la condition où l'IP a été réalisée avec un sérum pré-immun. Hauteur max. 24 *reads* pour les 3 premières lignes, 1984 *reads* pour la transcriptomique.

Les substrats ARN de Ded1 changent en condition de carence en glucose

Pour finir avec la comparaison, nous avons recherché les gènes différentiellement exprimés et enrichis entre ces deux conditions. Pour cela, nous avons utilisé le package

DESeq2 sur R (cf. matériels et méthodes). Lorsque les cellules ont été privées de glucose, environ 150 gènes ont été significativement enrichis avec une force de changement (FC, *Fold Change*) supérieure à 2, alors qu'environ 12 gènes ont été sous-enrichis (FC inférieur à -2) (**Figure 24**). Les 10 premiers gènes avec un FC supérieur à 2 et inférieur à -2 ont été regroupés dans le **Tableau 3**. Toutefois, il est important de préciser que parmi les gènes enrichis ou non se trouvaient des ARNt et des MGE qui, comme mentionné précédemment, sont présents en plusieurs copies du fait de la duplication de ces gènes sur le génome de la levure. Seuls les ARNm et ARNnc ont été retenus parmi les 10 gènes sélectionnés (**Tableau 3**).

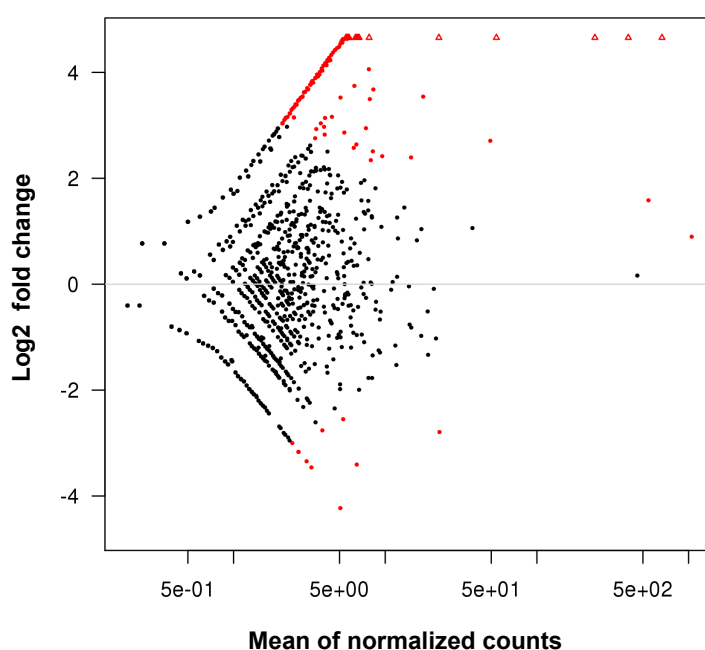


Figure 24 : Diagramme MA de l'analyse de l'expression différentielle des conditions WT et Δ -glucose

Les points rouges représentent les gènes présentant une régulation positive (haut) ou négative (bas). Seuil de fausses découvertes (FDR) $<0,1$, facteur de variation (FC, *Fold Change*) >2 .

Ces gènes ont été examinés plus en détail sur le logiciel de visualisation IGV, et une différence significative a été notée sur leur région 5'UTR. En effet, le 5'UTR des gènes enrichis en conditions Δ -glucose est riche en Alanine juste en amont du codon d'initiation. Ce résultat est assez intéressant puisqu'il a été proposé que des séquences riches en A pouvaient être importantes pour favoriser l'initiation de la traduction après une carence en glucose (Castelli *et al.*, 2011). Lorsque la cellule est privée de glucose, il est intéressant de noter que la perte de eIF4A, associée à la petite sous-unité ribosomale, inhibe l'initiation de la traduction. La cellule répond à ce stress en séquestrant la plupart des ARNm codant pour des

protéines non essentielles dans des foci cellulaires et en inhibant la traduction de gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme, alors que la traduction des ARNm qui code pour des protéines de réponse au stress se poursuit (Moore, 2005, Janapala et al., 2019). En effet, les résultats de la **Figure 24** et du **Tableau 3** indiquent que Ded1 est associée aux ARNm codant pour des protéines sollicitées durant le stress, et ceci indépendamment de la taille et structure de la région 5'UTR (ici riche en A, donc non structurée). Il est tentant d'affirmer qu'en condition de carence en glucose, Ded1 substituerait l'absence de eIF4A pour initier la traduction de ces ARNm.

| #ORF | Gène | taille (nt) | 5'UTR (nt) | 3'UTR (nt) | Fonction | Localisation |
|-----------|--------|-------------|------------|------------|---|------------------------------------|
| YJL111W | CCT7 | 1653 | 166 | 130 | chaperon, liaison sur des protéines dépliées | cytoplasme |
| YDL075W | RPL31A | 763 | 21 | 70 | protéine appartenant à la 60S | nucléole |
| YOR198C | BFR1 | 1413 | x | 200 | impliquée dans la localisation des ARNm | foci cellulaires |
| YBR127C | VMA2 | 1554 | 46 | 188 | enzyme | membrane périphérique |
| YGL173C | XRN1 | 4587 | 333 | 124 | Dégradation ARN 5'3' | cytoplasme, foci cellulaires |
| YKL082C | RRP14 | 1305 | 74 | 91 | biogenèse GSU | nucléole |
| snR40 | snR40 | 97 | x | x | methylation GSU | nucléole |
| YOR375C | GDH1 | 1365 | 57 | 81 | metabolisme | noyau |
| YGR145W | ENP2 | 2124 | 48 | 35 | biogenèse PSU | nucléole |
| YGR178C | PBP1 | 2169 | 215 | 101 | regulation de la traduction, formation de foci | foci cellulaire |
| YCL040W | GLK1 | 1503 | 31 | 180 | metabolisme glucose | membrane plasmique, cytoplasme |
| YOL052C-A | DDR2 | 186 | 34 | 244 | stress | vacuole, cytoplasme |
| snR17A | snR17A | 490 | x | x | biogenèse PSU | nucléole |
| YBR072 | HSP26 | 645 | 60 | 165 | chaperon, liaison sur des protéines dépliées | foci cellulaires cytoplasme, noyau |
| SCR1 | SCR1 | 522 | x | x | ARNnc de la particule de reconnaissance du signal | nucléole, cytoplasme, RE |
| YBR126W-A | MEO1 | 207 | x | x | fonction inconnue | RE |
| YBR286W | APE3 | 1614 | 33 | 50 | aminopeptidase | vacuole |
| YFR015C | GSY1 | 2127 | 70 | 112 | metabolisme du glucose | cytoplasme, mitochondrie |
| YBR117C | TKL2 | 2046 | x | x | metabolisme | cytoplasme, noyau |
| YIL155C | GUT2 | 1950 | x | 310 | metabolisme du glycérol | membrane externe mitochondrie |

Tableau 3 : Liste de gènes hypo- et hyperdependants de Ded1 en condition de carence en glucose

Les 10 premiers gènes du tableau (gris) ont été sous-enrichis : ces ARN, qui normalement étaient liés à Ded1 dans la condition WT, ne l'étaient plus en condition Δ -glucose. Inversement pour les 10 gènes suivants (orange). GSU : grande sous-unité ribosomique, PSU : petite sous-unité ribosomique, x : non défini.

Ded1 se lie sur l'ARNnc SCR1

Il est important de préciser que l'analyse des résultats de l'expression différentielle est très préliminaire et toujours en cours d'étude. Parallèlement à cette étude, nous avons focalisé notre attention sur l'ARNnc SCR1. En effet, parmi 17 ARNnc présents chez la levure, Ded1 a très bien réticulé l'ARNnc SCR1 de la SRP (**Figure 25A**) (cf. chapitre 3 de l'introduction). L'ARN de la SRP humaine (7SL) a également été récupéré lors d'une expérience de CLIP dirigée contre DDX3X soulignant l'homologie fonctionnelle de ces deux orthologues (Valentin-Vega et al., 2016). La réticulation a été principalement au niveau du domaine Alu et une partie du domaine S. Nous avons également cartographié les sites de mutation T>C sur le domaine Alu indiquant le site de fixation de Ded1 (**Figure 25B**). La liaison à l'ARN SCR1 a significativement augmenté lors de la carence en glucose (**Tableau 3**). De manière intéressante, les ARNm liés à Ded1 en condition Δ -glucose codent en majorité pour les protéines membranaires ou vacuolaires. La SRP est requise pour la traduction de ces

protéines lors de l'étape de l'élongation. En effet, il a été montré qu'en condition de carence en glucose, la cellule augmente la traduction de certains messagers codant des protéines de transport, membranaires et métaboliques (Castelli et al., 2011). Suite à ce résultat, nous avons décidé d'entreprendre une série d'expériences pour comprendre cette fixation et le rôle biologique de Ded1 dans l'étape de l'élongation de la traduction, nouvellement découverte.

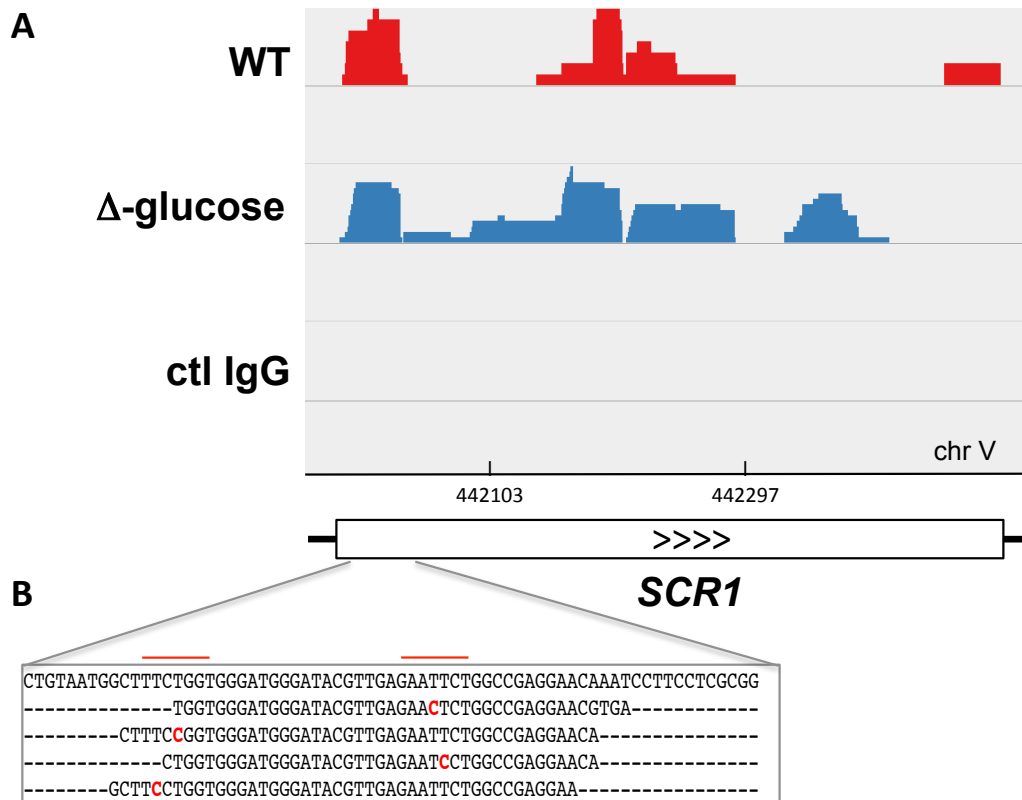


Figure 25 : Ded1 se lie sur l'ARNnc SCR1

A. Les *reads* de deux répliquats de chaque condition ont été mélangés pour être visualisés sur le logiciel IGV. « Ctl IgG » correspond à la condition où l'IP a été réalisée avec un sérum pré-immun. Hauteur max. 15 *reads*. **B.** Alignement des *reads* de la condition WT sur la séquence référence de *SCR1*. Les barres rouges indiquent les zones de mutations T>C.

2. L'hélicase à ARN Ded1 est associée à la particule de reconnaissance du signal et son activité est régulée par la Srp21

Nous avons utilisé la technique de PAR-CLIP, que nous avons modifiée, pour identifier les substrats ARN naturels de Ded1, *in vivo*. La majorité des *reads* se situaient sur des ARNm et ARNr, également identifiés par d'autres études pour Ded1 et DDX3X (Guenther et al., 2018, Valentin-Vega et al., 2016). Nous avons également obtenu beaucoup de *crosslink* sur l'ARNnc SCR1, qui fait partie de la SRP. Ce résultat était concordant avec une observation qui a déjà été faite au laboratoire : une analyse par spectroscopie de masse a indiqué que Ded1 cosédimente et est associée à des complexes contenant les protéines de la SRP sur un gradient de saccharose, suite à une IP dirigée contre Ded1 (Senissar et al., 2014). Etant donné que Ded1 est un facteur général impliqué dans l'initiation de la traduction, nous avons émis l'hypothèse que Ded1 pourrait être associée à la SRP durant l'élongation. Ce deuxième chapitre comprend un article qui a été soumis au journal *eLife*.

2.1. Approches expérimentales et résultats principaux de l'article

- > **Par une IP dirigée contre Ded1**, nous avons montré que Ded1 s'associe physiquement avec l'ARN SCR1 (par RT-PCR) et les 6 protéines de la SRP (par western blot), *in vivo*.
- > **Par un gradient de saccharose**, nous avons montré que tous les composants de la SRP cosédimentent dans une même fraction (vérifié par Western et Northern blot).
- > **Par l'utilisation de la génétique de la levure**, nous avons montré l'existence d'un lien génétique entre certaines protéines de la SRP et Ded1. Nous avons montré que l'expression de Ded1 supprime le défaut de croissance causé par l'absence des protéines de la SRP.
- > **Par une analyse *in situ* au microscope à fluorescence**, nous avons montré que Ded1 est localisée dans des foci cellulaires associée au RE.
- > **Par l'utilisation de protéines purifiées de la SRP et Ded1**, nous avons montré qu'il existe un lien physique entre Ded1 et les protéines de la SRP, *in vitro* (visualisé sur SDS-PAGE).
- > **Par des tests enzymatiques**, nous avons montré que l'activité ATPase de Ded1 est fortement stimulée avec son substrat authentique SCR1, *in vitro*. Nous avons également montré que l'activité ATPase de Ded1 est inhibée par la Srp21, protéine de la SRP.

> **Par des expériences de retard sur gel (EMSA)**, nous avons montré que la Srp21 ne bloque pas la liaison de Ded1 sur SCR1.

Dans cette étude, nous avons établi un nouveau mécanisme potentiel de traduction des protéines destinées à être secrétées ou associées à la membrane. Pour finir, nous proposons un modèle détaillé dans lequel l'ARN hélicase à boîte DEAD Ded1 est impliquée dans la régulation de la translocation co-translationnelle de ces protéines via la machinerie de la SRP.

2.2. Manuscrit de l'article

The RNA helicase Ded1 from yeast is associated with the signal recognition particle and is regulated by SRP21.

Hilal Yeter-Alat^{1,2}, Naïma Belgareh-Touzé³, Emmeline Huvelle^{1,2}, Molka Mokdadi^{1,2,4,5}, Josette Banroques^{1,2}, and N. Kyle Tanner^{1,2*}

¹ Expression Génétique Microbienne, UMR8261 CNRS, Université de Paris, Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

² PSL Research University, 75005 Paris, France

³ Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire des Eucaryotes, UMR8226 CNRS, Sorbonne Université, Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

⁴ Laboratory of Molecular Epidemiology and Experimental Pathology, LR16IPT04, Institut Pasteur de Tunis, Université de Tunis El Manar, Tunisia

⁵ Institut National des Sciences Appliquées et Technologies, Université de Carthage, Tunis, Tunisia

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 1 58 41 52 37; Fax +33 1 58 41 50 25; Email: kyle.tanner@ibpc.fr

Keywords: DDX3, SCR1, translocon, ATPase, Sec61

ABSTRACT

The DEAD-box RNA helicase Ded1 is an essential yeast protein involved in translation initiation that belongs to the DDX3 subfamily. The purified Ded1 protein is an ATP-dependent RNA binding protein and an RNA-dependent ATPase, but it lacks substrate specificity and enzymatic regulation. Here we demonstrate by yeast genetics, *in situ* localization and *in vitro* biochemical approaches that Ded1 is associated with, and regulated by, the signal recognition particle (SRP), which is a universally conserved ribonucleoprotein complex required for the co-translational translocation of polypeptides into the endoplasmic reticulum lumen and membrane. Ded1 is physically associated with SRP components *in vivo* and *in vitro*. Ded1 is genetically linked with SRP proteins. Finally, the enzymatic activity of Ded1 is inhibited by SRP21 with SCR1 RNA. We propose a model where Ded1 actively participates in the translocation of proteins during translation. Our results open a new comprehension of the role of Ded1 during translation.

INTRODUCTION

The DEAD-box family of RNA helicases are ubiquitous proteins found in all three kingdoms of life, and they are implicated in all processes involving RNA, from transcription, splicing, ribosomal biogenesis, RNA export, translation to RNA decay [reviewed by (1-3)]. They belong to the DExD/H superfamily 2 (SF2) of putative RNA and DNA helicases that contain catalytic cores consisting of two, linked, RecA-like domains containing conserved motifs associated with ligand binding and NTPase activity, where the majority of the proteins are ATPases. In addition, they often contain highly variable amino- and carboxyl-terminal domains [reviewed by (4,5)]. The DEAD-box proteins are ATP-dependent RNA binding proteins and RNA-dependent ATPases that have been shown to remodel RNA and ribonucleoprotein (RNP) complexes and to unwind short RNA duplexes *in vitro*, but they are not processive, and they generally have shown little or no substrate specificity (1-3). However, recent single-molecule studies of the DEAD-box protein Ded1 indicate that these properties may be secondary to their ability to form ATP-dependent clamps on RNA (6).

A number of crystal structures of DEAD-box proteins have been solved in the presence and absence of ligands [reviewed by (7)]. In the absence of ATP, the two RecA-like domains are unconstrained ("open" conformation) and the proteins have low affinity for RNA. In the presence of ATP, the two RecA-like domains are highly constrained ("closed" conformation) and have a high affinity for the RNA. RecA-like domain 2 binds the 5' end of the RNA as a single strand in the form of an A helix. In contrast, RecA-like domain 1 binds the 3' end of the RNA with a kink as a result of steric hindrance from residues from motifs Ib and GG that is incompatible with a duplex. This is considered the mechanism for the duplex unwinding activity, but it also effectively locks the protein onto the RNA and prevents sliding. Indeed, Ded1 in the presence of the nonhydrolyzable ATP analog ADP-BeF_x forms long-lived complexes on RNA *in vitro* (8).

Ded1 is a budding-yeast DEAD-box protein that is the functional homolog of mammalian DDX3 [reviewed by (9-12)]. It is an essential gene in *Saccharomyces cerevisiae* that can be rescued by the expression of its orthologs from other eukaryotes, including human DDX3 [(13) and references therein]. Thus, the functional activity of Ded1 is conserved throughout eukaryotes. Ded1 is considered a general translation-initiation factor that is important for 43S ribosome scanning to the initiation codon and formation of the 48S complex at the AUG codon [(14-16) and references therein]. We have shown that Ded1 is a cap-associated factor that actively shuttles between the nucleus and cytoplasm using both the XpoI/Crm1 and Mex67/TAP nuclear pore complexes (13). Moreover, it interacts with both the nuclear and cytoplasmic 3' polyA-binding proteins Nab2 and Pab1, respectively. We found that these cap-associated factors stimulate the RNA-dependent ATPase activity of Ded1 (13). The activity of Ded1 is also modulated by Gle1 and by the Xpo1-Ran[GTP]

complex (13,17,18). Other work has shown that Ded1 is sequestered in cytoplasmic foci (P-bodies or stress granules) with translation inactive mRNAs during conditions of stress [reviewed by (19-22)]. Human DDX3 has similar properties [reviewed by (23)].

We are interested in better understanding the role of Ded1 in the cell. To this end, we used a modified photoactivable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation (PAR-CLIP) technique to identify RNA substrates of Ded1 *in vivo* (24,25). We identified the Small Cytoplasmic RNA 1 (SCR1) as a major noncoding RNA that crosslinked to Ded1. SCR1 is the RNA component of the signal recognition particle (SRP) that is important for the co-translational translocation of polypeptides into the lumen and membrane of the endoplasmic reticulum [ER; reviewed by (26-29)]. SRP-dependent translation is conserved across all organisms, from prokaryotes to eukaryotes, including a highly reduced version for chloroplasts (30-32). It seemed possible that Ded1 was implicated in SRP-dependent translation.

SRP-dependent translation is a complicated and multi-step process that is still incompletely understood and that involves a number of still controversial elements. In eukaryotes, the SRP consists of the noncoding RNA (7S or 7SL in metazoans) and six SRP proteins (SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 and SRP72). The SRP RNA consists of two functional elements called the Alu and S domains (33,34). The yeast SRP complex consists of the SCR1 RNA and the equivalent proteins except Sec65 substitutes for the smaller SRP19 and the novel SRP21 protein replaces SRP9 [reviewed by (35)]. Moreover, in yeast, SRP14 forms a homodimer on the Alu domain of SCR1, which is in contrast to the heterodimer of SRP14-SRP9 in metazoans (35-37). The role of the yeast SRP21 protein is unclear, although it is considered the structural homolog of SRP9 (38). SRP54 and Sec65 interact with the extremity of the S domain of SCR1, and SRP68 and SRP72 interact at the junction between the Alu and S domains (27,35). Yeast lacks the "classical" structure of the Alu domain that includes helices 3 and 4, and it contains additional hairpins between the Alu and S domains; it is about 75% bigger (33,34). The structure and role of these additional hairpins are largely unknown. Eukaryotes lack helix 1 that is found in prokaryotes.

In the classical interpretation, the SRP associates with the ribosome during translation when the SRP54 GTPase binds the hydrophobic signal peptide as it emerges from the exit channel of the 60S ribosomes as a ribosome nascent-chain complex [RNC; reviewed by (26-28)]. This causes the ribosomes to pause translation and permits the SRP-ribosome complex to associate with the SRP receptor (SR) on the ER that consists of the membrane associated SRP101 and the integral membrane protein SRP102 (SR α and SR β , respectively, in metazoans). In yeast and metazoans, SRP14 and the Alu domain of the SRP RNA play an important role in this "pausing" by blocking the GTP-dependent elongation factor eEF2 from binding at the GTPase-associated center near the mRNA entry channel at the interface between the 40S and 60S ribosomes (37,39,40). The interactions with the ribosomes depend

on the SRP proteins; human 7SL RNA does not bind the ribosomes by itself (41). The SRP-ribosome complex eventually associates with the Sec61 translocon on the ER membrane, the SRP dissociates from the ribosome and translation continues with the polypeptide inserted into the ER lumen or membrane. Ded1 could be intimately associated with this process.

We find that Ded1 is an SRP-associated factor. Ded1 is genetically linked to the SRP proteins, and it associates with SRP complexes in pull-down experiments and sucrose gradients. The purified recombinant SRP proteins physically interact with Ded1 *in vitro*. Moreover, fluorescence microscopy shows that Ded1 is associated with mRNAs at the ER membrane in the cell. RNA binding assays show that Ded1 has a high affinity for SCR1 RNA. Finally, the ATPase activity of Ded1 is inhibited by SRP21, and it is inhibited much more when SRP21 is associated with SCR1 than with other RNAs. We propose a model where Ded1 plays an important role in the SRP-dependent translation of proteins.

RESULTS

Ded1 associated with SRP factors *in vivo*

We have been using a modified photoactivable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation (PAR-CLIP) technique to identify RNA substrates of Ded1 *in vivo* (24,25). This is an ongoing project, but in the process we recovered significant crosslinks to the noncoding RNA SCR1 that is part of the SRP involved in co-translational transport of polypeptides into the membrane and lumen of the ER (**Figure 1**).

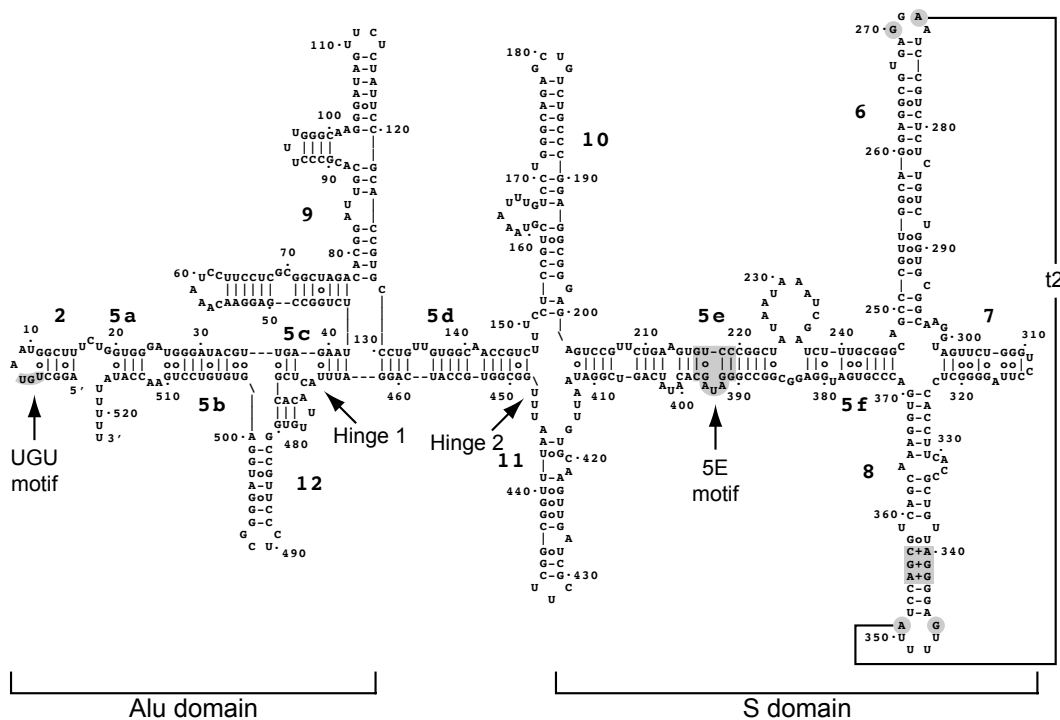


Figure 1. Secondary structure model of yeast SCR1 of Zwieb *et al.* The model is based on phylogenetically conserved features found in SRP RNAs and on structural probing experiments (33,34). Yeast and other fungal SRP RNAs are unusual in that they are much larger than in other organisms, and they lack the characteristic structure consisting of hairpins 3 and 4 of the Alu domain. Yeast has the additional hairpins 9, 10, 11 and 12 that are poorly characterized and that have other proposed secondary structures. Conserved sequence motifs and tertiary interactions are shown in gray.

Although unanticipated, this result was consistent with our previous observations that Ded1 cosediments and associates with complexes containing SRP proteins on polysome sucrose gradients, as determined by pull-down experiments and mass spectroscopy analyses (13). These data show that Ded1 and SRP proteins SRP14, SRP21, SRP54 and SRP68 sediment at a position corresponding to ~26S (**Table 1**). Moreover, SRP14, SRP21, Sec65 and SRP68 are in stable complexes associated with Ded1 on the sucrose gradients that are pulled down with Ded1-specific IgG (**Table 2**). These results indicated that Ded1 might be associated with ribosomes translating mRNAs encoding ER proteins.

Table 1. Sucrose gradients fractions; nano-LC ESI MS/MS analysis^a

| Protein ^b | Fraction(s) ^c | Meta Score ^d | #Spectres ^e | SC% ^f | RMS (ppm) ^g |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Ded1 | 6 | 213.4 | 7 | 14.2 | 6.60 |
| Ded1 | 7 | 1455.7 | 50 | 50.8 | 8.04 |
| SRP14 | 7 | 80.7 | 4 | 13.0 | 5.25 |
| SRP21 | 7 | 255.5 | 10 | 28.7 | 7.30 |
| SRP54 | 7 | 229.4 | 6 | 8.9 | 6.40 |
| SRP68 | 7 | 88.2 | 2 | 2.2 | 8.01 |
| ENO2 | 6 | 5771.5 | 639 | 96.6 | 5.68 |
| ENO2 | 7 | 4741.5 | 359 | 94.7 | 6.50 |
| SSA2 | 6 | 4335.6 | 280 | 84.4 | 10.24 |
| SSA2 | 7 | 3999.2 | 226 | 74.5 | 8.37 |
| FBA1 | 6 | 2125.7 | 186 | 80.5 | 6.52 |
| FBA1 | 7 | 1653.2 | 116 | 79.7 | 6.32 |

^a Data was collected and analyzed as previously described (13). In brief, 0.5 ml fractions were collected starting from the top of the gradient and subjected to nano-liquid-chromatography electron-spray mass spectrometry analysis

^b ENO2, SSA2 and FBA1 are reference proteins; they showed the strongest signals in the fraction at the top of gradient.

^c Fractions correspond to those shown in Supplemental Figure S7 of Senissar *et al.* (13).

^d Mascot probably-based scoring.

^e Spectral counting; the same peptide is fragmented up to six times over a mean elution time of 30 seconds.

^f Percentage of the protein sequence covered.

^g Mean error in ppm.

Table 2. Ded1-IgG Pull-down of sucrose gradients fractions; Nano-LC ESI MS/MS analysis^a

| Protein ^b | Fraction(s) ^c | Meta Score ^d | #Peptides ^e | SC% ^f | RMS (ppm) ^g |
|----------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| Ded1 | 6 | 413.4 | 25 | 40.6 | 3.51 |
| Ded1 | 7 | 368.2 | 8 | 15.6 | 1.73 |
| SRP14 | 6 | 387.0 | 9 | 51.4 | 2.54 |
| SRP14 | 7 | 88.2 | 2 | 13.0 | 2.32 |
| SRP21 | 6 | 385.5 | 6 | 50.3 | 3.15 |
| SRP21 | 7 | 95.4 | 2 | 13.2 | 1.99 |
| Sec65 | 6 | 345.1 | 7 | 31.9 | 2.69 |
| SRP68 | 6 | 66.4 | 1 | 2.2 | 0.94 |
| ENO2 | 6, 7 | — | — | — | — |
| SSA2 | 6 | 395.9 | 9 | 21.3 | 2.83 |
| SSA2 | 7 | — | — | — | — |
| FBA1 | 6, 7 | — | — | — | — |

^a Data was collected and analyzed as previously described (13). Equivalent fractions as shown in Table 1 were subjected to IgG-Ded1 pull-downs with protein-A Sepharose beads and subjected to mass spectrometry analysis.

^b ENO2, SSA2 and FBA1 are reference proteins; they showed the strongest signals in Table 1.

^c Fractions correspond to those shown in Supplemental Figure S7 of Senissar *et al.* (13).

^d Mascot probably-based scoring.

^e Number of peptide fragments recovered.

^f Percentage of the protein sequence covered.

^g Mean error in ppm.

To elaborate on these observations, we did pull-down experiments of yeast extracts with IgG against Ded1 and then subjected the recovered material to Northern blot analysis with a ^{32}P -labeled DNA probe against SCR1. We used a probe against PGK1 mRNA as a positive control because it also was found to crosslink efficiently to Ded1, and a probe against RPL20B mRNA as a negative control as we obtained little crosslinking on this RNA, even though it is a highly expressed mRNA (42). However, the resulting signals were insufficiently sensitive. This was not unexpected as Ded1 interacts with a large number of mRNAs, and the RNAs of interest represented a small fraction of these total RNAs (14,43). Hence, we performed RT-PCR on the samples using oligonucleotides specific for the three RNA. Both SCR1 and PGK1 RNAs were amplified much more in the fractions pulled down with Ded1-specific IgG than in the control fractions that were pulled down with pre-immune IgG (**Figure 2A**). In contrast, RPL20B mRNA was weakly amplified in both cases. Hence, Ded1 associated with SCR1 RNA *in vivo*.

It was possible that Ded1 interacted with the SCR1 RNA independently of the SRP proteins. To test this, we did Ded1-IgG pull-down experiments, SDS-PAGE separation and Western blot analyses of the recovered proteins. However, we were only able to obtain antibodies against Sec65 [generously provided by Martin R. Pool; (44)]. (We later made IgG against SRP21.) Hence, we cloned all the *SRP* genes with amino-terminal HA tag, and we did Ded1-IgG pull-downs with strains independently expressing each tagged protein (**Figure 2B**). We recovered a significant amount of SRP14, SRP54, Sec65 and SRP101. Likewise, we digested the Ded1-IgG-bound complexes with RNase A prior to elution to determine if these complexes depended on SCR1 RNA; in all cases, the signals for the SRP proteins were reduced, but the signals were still more than for the pre-immune-IgG control (**Figure 2B**). Oddly, we detected little HA-tagged SRP21 even though it was prominent in our previous mass spectrometry analyses [**Tables 1 & 2**; (13)]. Moreover, we detected little HA-SRP21 in yeast extracts even though it is of similar size and has similar expression levels as SRP14 (**Figure 2B**; **Table 3**). It was possible that the HA tag increased the proteolytic degradation of the protein during extraction or that the HA tag by itself was proteolytically removed. Thus, these results showed that Ded1 interacted with complexes containing the SRP proteins, and that these complexes were stabilized by SCR1 RNA (**Figure 2B**). Notably, the bound complexes also contained the SR receptor SRP101, which binds with SRP complexes associated with the ER during translation (26,35). We did not detect SRP102, but it contains an integral membrane domain that could limit its recovery. Thus, Ded1 physically associated with the SRP complex *in vivo*.

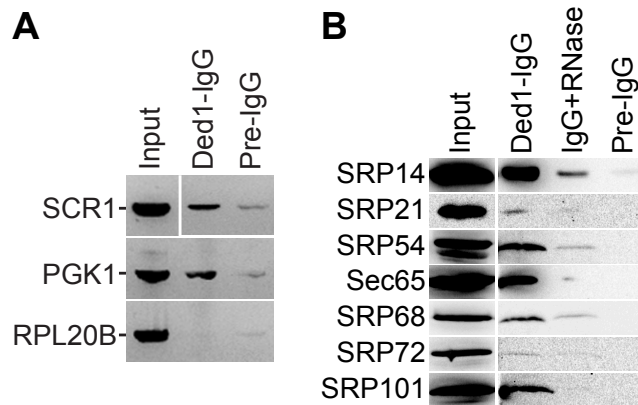


Figure 2. Ded1-IgG pull-downs of yeast extracts. Ded1-specific IgG (Ded1-IgG) or IgG from pre-immune serum (Pre-IgG) were used to recover the associated factors. Input, a fraction of the yeast extract used in the pull-down experiments was directly loaded onto the gel or RT-PCR amplified. **(A)** Purified RNA from yeast extracts (~20% of input) or from IgG pull-downs was reverse transcribed and PCR amplified for 25 cycles with gene-specific oligonucleotides. The resulting products were electrophoretically separated on a 2% agarose gel containing ethidium bromide, and the products visualized with a Gel Doc XR+ (Bio-RAD). **(B)** Western blot analysis of HA-tagged SRP proteins. Proteins were electrophoretically separated on a 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and then revealed with anti-HA IgG. Input, 40 μ g (~10%) of the yeast extract was directly loaded on the gel. Ded1-IgG, Ded1-specific IgG was used to pull-down Ded1 associated proteins. IgG+RNase, complexes bound to Ded1-IgG-protein A beads were digested with RNase A (1mg/ml) prior to washing and elution.

Table 3. Protein characteristics^a

| Protein | Gene | Length (aa) | MW (gm/mole) | pK _i | Abundance ^b | Half life (hr) ^c |
|---------|---------|-------------|--------------|-----------------|------------------------|-----------------------------|
| Ded1 | YOR204W | 604 | 65554.7 | 7.98 | 25034 \pm 5043 | 9.1 |
| SRP14 | YDL092W | 146 | 16442.1 | 10.38 | 5858 \pm 1306 | 9.6 |
| SRP21 | YKL122C | 167 | 18451.7 | 11.14 | 4248 \pm 1211 | 7.9 |
| SRP54 | YPR088C | 541 | 59630.3 | 9.04 | 8411 \pm 2308 | 7.0 |
| Sec65 | YML105C | 273 | 31177.3 | 9.62 | 5632 \pm 2232 | 9.7 |
| SRP68 | YPL243W | 599 | 69014.7 | 9.15 | 8214 \pm 1962 | 9.9 |
| SRP72 | YPL210C | 640 | 73568.8 | 10.0 | 6363 \pm 1828 | 9.4 |
| SRP101 | YDR292C | 621 | 69276.8 | 7.19 | 4444 \pm 2444 | 9.9 |
| SRP102 | YKL154W | 244 | 26975.3 | 8.02 | 5274 \pm 1935 | 10.1 |

^a Data taken from

<https://www.yeastgenome.org>.

^b Median abundance (molecules/cell).

^c Data from (97).

Ded1 cosedimented with SRP factors

In our previous work, we found that Ded1 migrated at a position corresponding to ~26S on sucrose gradients, but the Ded1-containing fractions were only partially resolved from the protein peak at the top of the gradient (13). Hence, we modified the previous sucrose

gradient conditions to better resolve the different complexes. In both cases, we used 5 mM MgCl₂ because Ded1 was found to dissociate from higher molecular weight complexes at higher Mg²⁺ concentrations and sediment within the protein peak at the very top of gradient. We did sucrose gradients of yeast strains independently expressing each HA-tagged SRP protein under identical conditions.

The polysome profile (**Figure 3A**) showed well-resolved ribosome peaks that corresponded to the expected distribution of ribosomal RNAs (**Figure 3B**). Northern blot analyses with a SCR1-specific ³²P-labeled probe showed that the vast majority of the SCR1 RNA migrated as a narrow peak centered at fraction 4 (arrow), but RNA was detected throughout the gradient (**Figure 3C**). Western blot analyses showed a very heterogeneous distribution of the proteins (**Figure 3D**). Ded1 and Sec65 were concentrated near the top of the gradients while the other SRP proteins were more widely distributed. SRP54 migrated as two bands that probably represented different modified forms of the protein. Oddly, we did not detect HA-tagged SRP21 even though it was prominent in our previous mass spectrometry analyses [**Tables 1 & 2**; (13)]; however, this result was consistent with the IgG pull-down experiments. Moreover, all of the detected proteins were found in fraction 4 that had the most SCR1 RNA.

It is known that constitutive over-expression of the SRP proteins can cause them to accumulate in the nucleus, which may affect their distribution on the sucrose gradients (45). Consequently, we did sucrose gradients of the endogenously-expressed Sec65 and probed the membranes with Sec65-specific IgG; it showed a similar distribution as the HA-tagged protein, but it was present as a doublet (**Figure 3E**). Likewise, we made SRP21-specific IgG to detect endogenous SRP21 in the gradients (**Figure 3F**). The vast majority of the protein was stuck in the well of the gel or migrated only a short distance into the gel that indicated that SRP21 formed large, partially insoluble aggregates. We obtained similar results with recombinant SRP21 in the presence of RNA (see below section: **SRP21 did not block Ded1 binding to SCR1**). Nevertheless, the majority of both Sec65 and SRP21 sedimented at the position corresponding to the bulk of the SCR1 RNA in the gradients.

The data were consistent with Ded1 interacting with the SRP complex. However, the vast majority of the material was not associated with translating ribosomes, although there was a smaller peak of Ded1 and most of the SRP proteins in fraction 12 that corresponded to the 80S complex (arrow). These results indicated either that most of Ded1 and the SRP complex were not actively involved in translation or that the complexes were not stably associated with the ribosomes under the conditions used. Thus, it was unclear as to the functional role of the Ded1-SRP interactions.

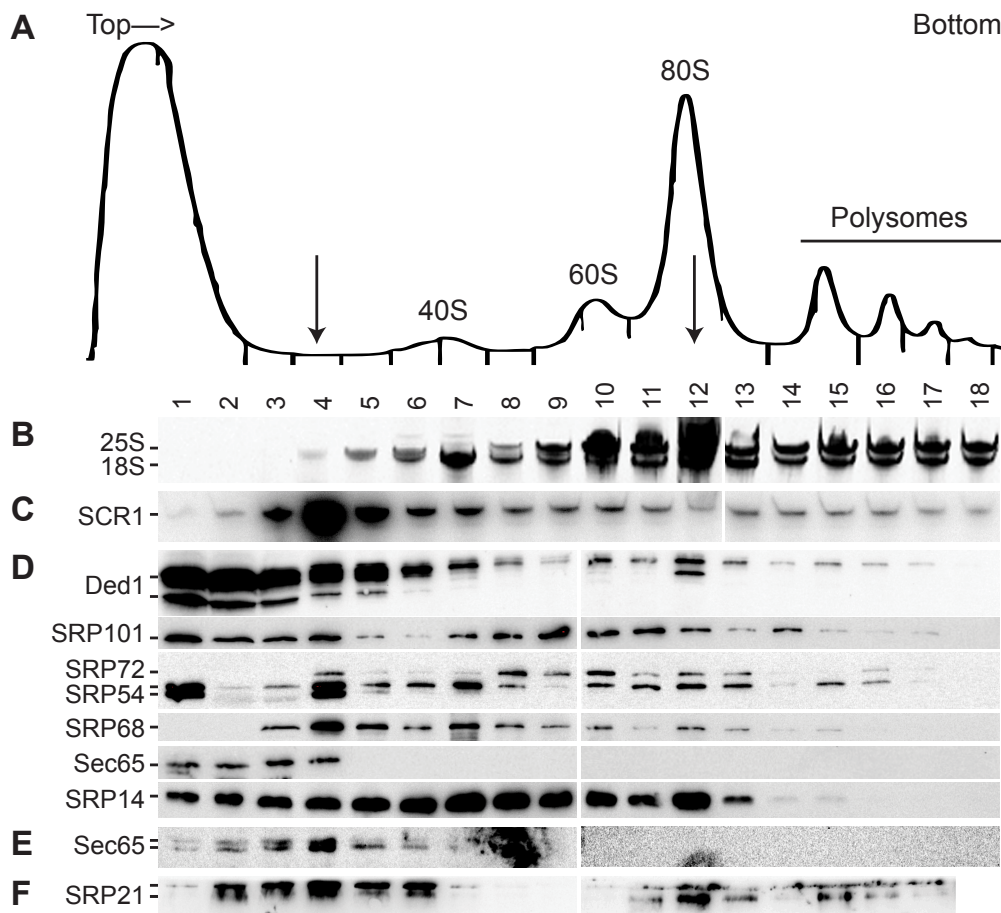


Figure 3. Polysome sucrose gradient of cell extracts. Extracts of cell cultures individually expressing HA-tagged proteins were treated with cycloheximide and separated on 10–50% sucrose gradients. Note that conditions were modified from those previously used to better separate lower molecular-weight complexes (13). **(A)** Trace of a representative sucrose gradient monitored spectroscopically at 254 nm with 0.5 ml fractions collected from the top of the gradient. **(B)** Extracted RNAs from different fractions were electrophoretically separated on a 6% polyacrylamide gel containing 7 M urea and the separated RNAs were visualized with ethidium bromide. **(C)** Northern blot analysis of the material separated as shown in B and transferred to nitrocellulose membranes. The RNA was detected with a ^{32}P -labeled DNA oligonucleotide specific for SCR1. **(D)** Western blot analysis of HA-tagged proteins. Precipitated proteins from different fractions were electrophoretically separated on a 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with IgG against the HA tag and Ded1. **(E)** Western blot analysis of endogenous Sec65 probed with IgG against Sec65. **(F)** Western blot analysis of endogenous SRP21 probed with IgG against SRP21.

Ded1 was genetically linked to SRP proteins

We next tested to see if there was a genetic link between Ded1 and the SRP proteins as we previously demonstrated for the nuclear and cytoplasmic cap-associated proteins (13). We used the same cold-sensitive mutant F162C of Ded1 in the *ded1::HIS3* deletion strain and over-expressed the SRP proteins and SCR1 RNA from the pMW292 and pM299 plasmids (44,46). Liquid cultures were serially diluted and spotted on 5-FOA plates that were incubated at 18°C, 30°C and 36°C (**Figure 4**). The results showed a slight enhancement of growth at

18°C that was consistent with a genetic interaction between Ded1 and the SRP complex, but the signal was too weak to demonstrate a clear link. The weak multicopy suppression was not unexpected because Ded1 is implicated in the expression of multiple mRNAs that are not associated with SRP complexes (14,43); expression of these mRNAs would be insensitive to the over-expressed SRP factors. Thus, it was possible that the SRP complex would be more sensitive to the level of Ded1 expression than vice versa.

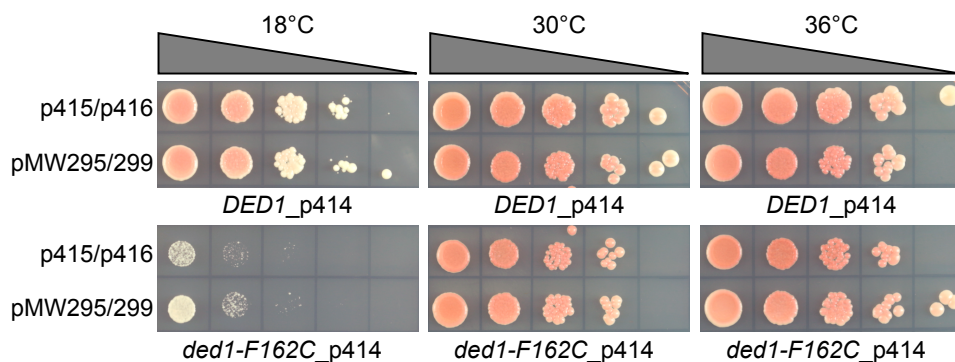


Figure 4. Multiple-copy suppression of the *ded1-F162C* cold-sensitive phenotype. The *ded1::HIS3* deletion strain containing the *DED1 URA* plasmid were transformed with plasmids expressing Ded1 wild type or Ded1-F162C mutant proteins. They were subsequently transformed with pMW295 and pMW299 plasmids expressing the SRP components or with the empty plasmids. Liquid cultures were then serially diluted by a factor of 10 and spotted on synthetic defined (SD) medium plates containing 5-FOA and incubated for 3 days at 30°C and 36°C and for 5 days at 18°C

Previous work has shown that loss of any SRP component leads to a slow-growth phenotype (47-49), although yeast cells are eventually able to adapt to this loss (50,51). Thus, we obtained yeast strains with the *DED1*, *SRP14*, *SRP21*, *SEC65*, *SRP68*, *SRP72* and *SRP101* genes under the control of a tetracycline-regulated promoter that could be suppressed with doxycycline (52). Unfortunately, SRP54 under the tetracycline promoter was not available. Cultures of the different strains were grown in liquid culture, serially diluted and spotted on agar plates in the presence or absence of 10 µg/ml of doxycycline. All the strains except SRP101 showed reduced growth with the constitutive expression of the proteins, which was most apparent at 18°C (**Figure 5**). In the presence of doxycycline, all the strains show strongly reduced growth except SRP21, Sec65 and SRP101, which showed a slight reduction. Western blot analysis of liquid cultures of *TET-SRP21* and *TET-SEC65* grown for up to 24 h in the presence of 10 µg/ml of doxycycline showed no diminution in protein level when probed with SRP21-IgG or Sec65-IgG, respectively (data not shown). This indicated that either the *TET* promoter was not completely shut down with doxycycline in these strains or that the proteins were particularly stable. Interestingly, *TET-SRP21* actually grew slightly better in the presence of doxycycline, which further indicated that constitutive

expression of the proteins was detrimental (**Figure 5**). Constitutive and overexpression of Ded1 was previously shown to inhibit cell growth (53,54).

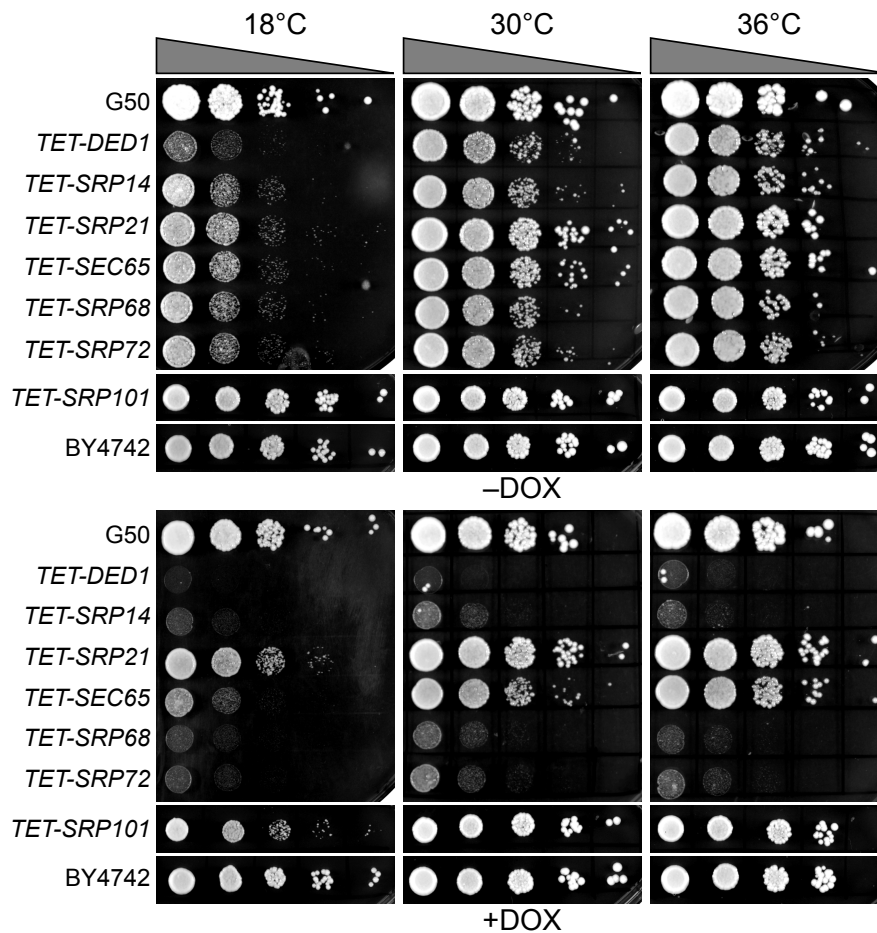


Figure 5. Phenotypes of proteins expressed with tetracycline promoters. Liquid cultures of the indicated strains were serially diluted by a factor of 10 and plated on YPD (yeast extract, peptone, dextrose) rich-medium agar plates, except for *TET-SRP101* and BY4742 that were plated on SD medium agar plates, in the presence (+DOX) or absence (-DOX) of 10 $\mu\text{g/ml}$ of doxycycline. The G50 and BY4742 strains show wildtype growth. Plates were incubated for 2 days at 30°C and 36°C, and for 4 days at 18°C for the YPD plates, and for 4 days and 7 days, respectively, for the SD plates.

We transformed the different *TET* strains with a plasmid containing *DED1* under control of the very strong *GPD* promoter and compared it with cells transformed with the empty plasmid and with wildtype yeast cells (55). We likewise transformed the cells with a plasmid expressing the mutant Ded1-F162C protein that had reduced ATP binding and enzymatic activity (46). As expected, the yeast strains *TET-SRP21* and *TET-SEC65*, which continued to express the SRP proteins, showed reduced growth on the plates due to the inhibitory effects of the overexpressed Ded1 (**Figure 6**). In contrast, SRP14, SRP68 and SRP72 showed enhanced growth despite the inhibitory effects of Ded1 (**Figure 6**). The Ded1-F162C mutant showed little or no stimulatory effect, which indicated that the

enzymatic function of Ded1 was important for the enhanced growth. Thus, high expression of Ded1 partially suppressed the slow-growth phenotype of strains depleted for SRP proteins, and this result established a genetic link between Ded1 and the SRP complex.

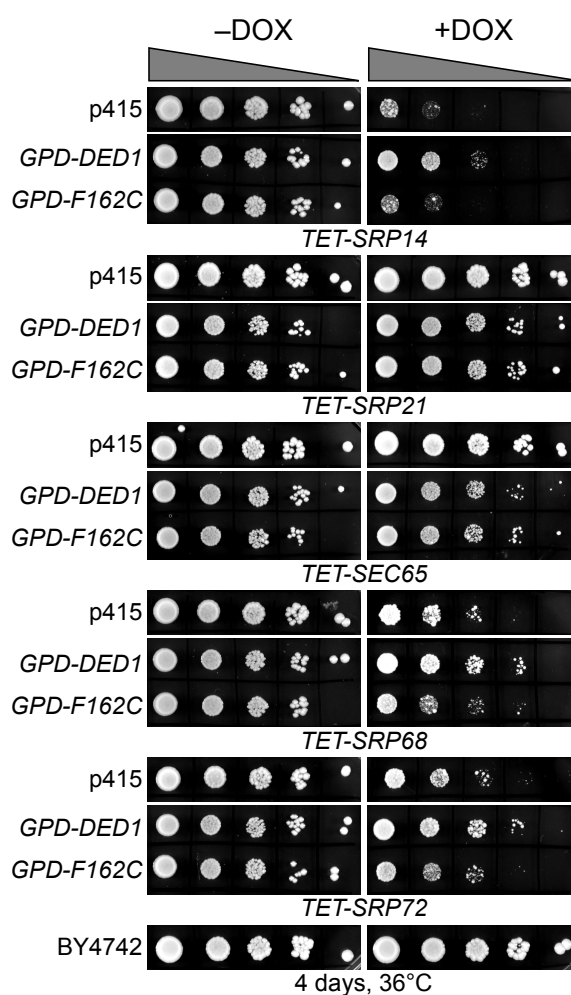


Figure 6. Ded1 multicopy suppression of SRP protein depletions. Cells of the indicated strains with the *TET* promoter were grown in SD-LEU medium, serially diluted by a factor of 10 and spotted on SD-LEU agar plates with (+DOX) or without (-DOX) 10 µg/ml of doxycycline. Cultures were grown 4 days at 36°C. p415, empty *LEU* plasmid; *GPD-DED1*, Ded1 in p415 with the high expression *GPD* promoter and *CYC1* terminator; *GPD-F162C*, a Ded1 mutant with reduced ATP binding and enzymatic activity (46). BY4742, a wildtype yeast strain showing unimpeded growth. The phenotypes were most apparent at 36°C, but similar effects were obtained at 30°C.

Ded1 was in cellular foci associated with the endoplasmic reticulum

The next question we asked was whether Ded1 co-localized with the ER as would be expected if it was associated with SRP-ribosome complexes that were translating mRNAs encoding polypeptides translocated into the ER. However, we and others have shown that Ded1 has a diffuse location within the cytoplasm under normal growth conditions (13,53,56). Nevertheless, some of the Ded1 protein is sequestered with translation-inactive mRNAs in

cellular foci when the translation conditions are altered (53,57,58). We reasoned that if polypeptide import into the ER was transiently blocked then Ded1 would form foci associated with the ER. We used temperature-sensitive (ts) mutants of the Sec61 and Sec62 proteins that form the translocon pore in the ER for the import of SRP-dependent polypeptides during translation (59,60). At the non-permissive temperature, these mutants block or disrupt the Sec61 channel and ER-associated translation is terminated. As a marker, we used the integrated red-fluorescent-tagged amino-terminal domain of Kar2 fused to the HDEL ER retention signal (YIPlac204TKC-DsRed-Express2-HDEL; Addgene, Watertown, MA) in the two *sec* strains; Kar2 is an ATPase that functions as a protein chaperone for refolding proteins within the lumen of the ER [(61) and reference therein], and consequently the Kar2 chimera serves as a marker of the ER lumen. We also used an ATPase-inactive Ded1-E307Q mutant (Ded1-DQAD) that has a high propensity to form cellular foci with sequestered mRNAs that are no longer undergoing translation.

We first looked at the distribution of proteins under permissive conditions (**Figure 7A**). The distribution of Kar2-RFP around the nuclear envelope (central cisternal ER), as interconnected tubules (tubular ER) and as a cortical halo inside the plasma membrane of the cell wall (PM-associated ER) was consistent with the locations of the ER in yeast; actively translating ribosomes are associated with all these ERs (62). Ded1-DQAD-GFP was uniformly distributed in the cytoplasm, largely excluded from the nucleus, and it formed occasional foci that were distributed at various positions in the cytoplasm (**Figure 7A**). Both the *sec61-ts* and *sec62-ts* strains showed equivalent phenotypes. The intensity of the fluorescence signals of both Kar2-RFP and Ded1-DQAD-GFP was highly variable between cells, which probably reflected different levels of protein expression between cells.

At 37°C, Kar2-RFP showed a similar cellular distribution as at 24°C for both *sec61-ts* and *sec62-ts* mutants, although it showed an increased frequency of aggregates with the ER (**Figure 7B**). In contrast, Ded1-DQAD-GFP showed a pronounced increase in the number of foci that were highly variable in size (**Figure 7B**). Many of these foci were closely associated with Kar2-RFP, particularly as a chain of foci on the cytoplasmic side of the ER around the plasma membrane, where the PM-associated ER was expected to be located, and as a chain of foci corresponding to tubular ER (arrowheads, **Figure 7B**). Both the *sec62-ts* and *sec61-ts* strains showed similar phenotypes. In some cases, the Kar2-RFP aggregates and Ded1-DQAD-GFP foci were near each other. Thus, Ded1 was associated with mRNAs that were no longer undergoing translation in close proximity to the ER at the non-permissive temperature. This result was consistent with previous work that showed that Ded1 is recovered with membrane-associated ribosomal-protein complexes (63).

We next asked if the SRP proteins showed similar properties. We used GFP-tagged SRP14 and SRP21 proteins that were expressed off the chromosome (GFP bank, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and the plasmid-encoded Ded1-DQAD-mCh mutant. The

SRP14-GFP showed a weak but uniform signal in all the cells, where the protein was concentrated on the ER (**Figure 7C**). SRP21-GFP showed a similar profile (data not shown). In contrast, the plasmid-expressed Ded1-DQAD-mCh showed highly variable expression. We used cells grown under wildtype conditions or depleted for glucose, which promoted the formation of cellular foci. However, depending on the cellular growth we obtained a significant number of foci associated with the ER even under wildtype growth (arrowheads, **Figure 7C**). Thus, Ded1 was in close proximity to both the ER and the SRP proteins in the cell.

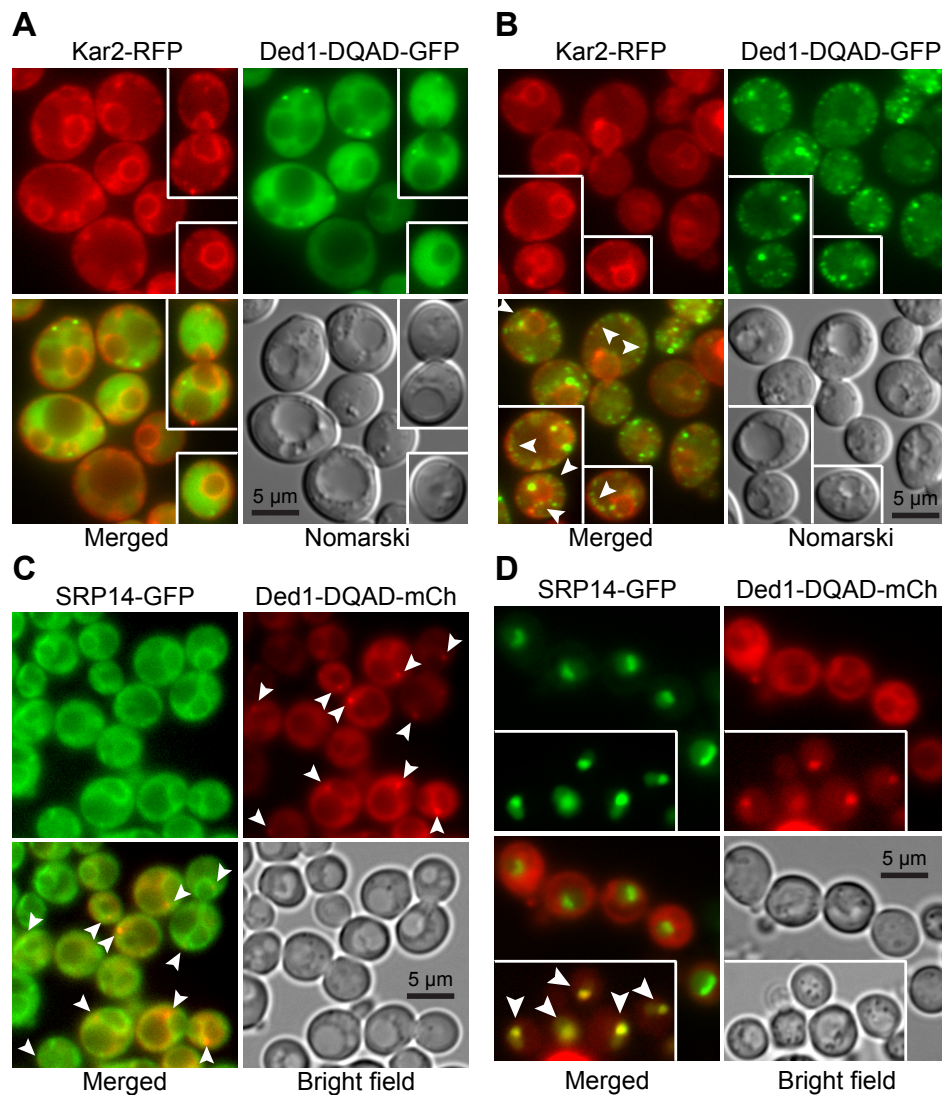


Figure 7. Cellular location of Ded1 relative to the ER and SRP proteins. (A) Ded1-DQAD-GFP was expressed in the *sec62* temperature-sensitive mutant with the integrated *KAR2-RFP* plasmid and grown to an OD_{600} of 1.0 at 24°C. (B) The same cells as in A were incubated for 15 min at the non-permissive temperature of 37°C prior to visualization. The arrowheads indicate positions where chains of Ded1-DQAD-GFP foci co-localized or co-associated with Kar2-RFP. (C) SRP14-GFP expressed from the chromosome and Ded1-DQAD-mCh expressed off the p415 plasmid were grown to an OD_{600} of 0.95 at 30°C. (D) SRP-GFP was overexpressed off the p413-PL plasmid and Ded1-DQAD-mCh was overexpressed off the p416-PL plasmid until an OD_{600} of 0.4 at 30°C in the *xpo1-T539C* yeast strain. Cells in the insert were treated with 10 µg/µl (~200 nM) of leptomycin b for 1 h.

Overexpressed SRP proteins accumulated in the nucleus and nucleolus

The biogenesis and metabolic pathway of the SRP RNP is complex, and it involves a large number of different steps [reviewed by (32,64,65)]. In yeast, the SRP proteins SRP14, SRP21, SRP68 and SRP72 are assembled on the SCR1 RNA probably in the nucleolus. Sec65 is in the nucleus, but there is some ambiguity about whether it accumulates in the nucleolus as well, although the equivalent mammalian SRP19 protein is found there (32,45,66). The partially assembled SRP complex is then exported to the cytoplasm through the XpoI/CrmI nuclear pore complex whereupon it binds with SRP54, which subsequently associates with the signal sequence of the partially translated polypeptide and causes the SRP to assemble on the 80S ribosomes. We previously showed that Ded1 actively shuttles between the nucleus and cytoplasm using the XpoI and Mex67 nuclear pores (13). Thus, it was possible that Ded1 associated very early with the SRP complex within the nucleus, and that it was important for the biogenesis or export of the complex.

The XpoI nuclear pore is known to export multiple cargoes, including ribosomal subunits, certain small nuclear RNAs, some viral RNAs and the assembled SRP complex (45,66-68). We used a yeast strain with a mutant *xpoI* allele that is sensitive to the bacterial toxin leptomycin b from *Streptomyces* to test whether Ded1 was involved in the XpoI-dependent export of the SRP (69); this strain contains a single mutation (XpoI-T539C) that makes the yeast protein sensitive to the drug (70). We previously showed that both the Mex67 and XpoI nuclear pore complexes must be disrupted to see a significant accumulation of Ded1 in the nucleus (13). We transformed this strain with plasmids expressing Ded1-mCh and with plasmids expressing either SRP14-GFP or SRP21-GFP, and we determined the locations of the tagged proteins.

The plasmid-encoded SRP14-GFP had highly variable expression between cells, but it showed a strong nuclear location that was often concentrated in crescent-shaped regions even in the absence of leptomycin b (**Figure 7D, Figure 8A & 8B**). In contrast, SRP21-GFP showed a diffuse location throughout the nucleus, which indicated that the overexpressed protein was not able to assemble or accumulate in the nucleolus (**Figure 8C & 8D**). However, it occasionally formed nuclear foci (arrowheads, **insert Figure 8C**). The expression of the plasmid-encoded Ded1-DQAD-mCh was likewise highly variable, and it was largely excluded from the nucleus even in the presence of leptomycin b (**Figure 7D, Figure 8**). However, in some instances with leptomycin b, where Ded1-DQAD-mCh was lightly expressed, we found that the protein accumulated in crescent-shaped regions with SRP14-GFP (arrowheads, **insert Figure 7D**). The Ded1-DQAD mutant binds RNA with a high affinity in the presence of ATP but it cannot hydrolyze the ATP to recycle the complex. Thus, Ded1 could co-localize with the SRP complex in the nucleolus but only under conditions where Ded1 export was blocked. The absence of Ded1-DQAD in the nucleus and

crests in the absence of leptomycin argued that Ded1 was not needed for SRP assembly and export, but the data could not rule out this possibility.

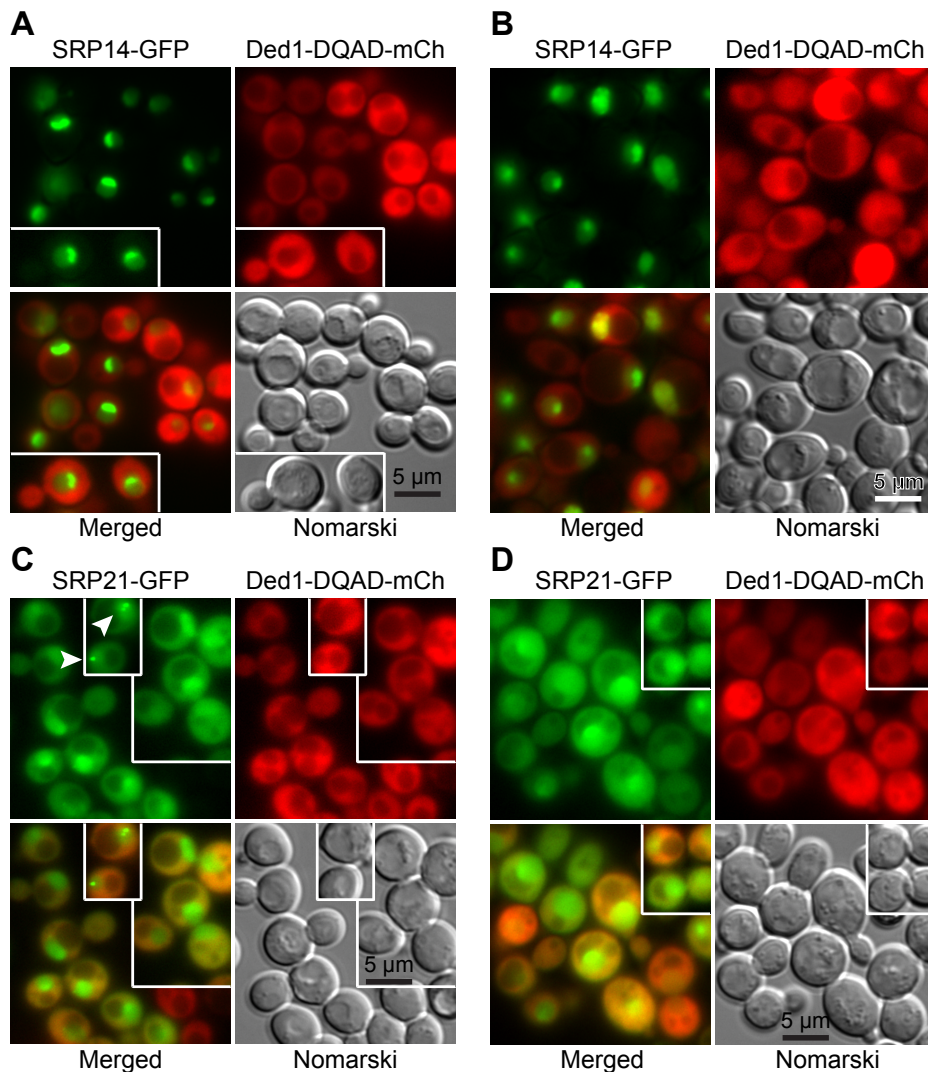


Figure 8. Over-expressed SRP14 and SRP21 accumulate in the nucleus. (A) SRP14-GFP was expressed off the p413 plasmid and Ded1-DQAD-mCh was expressed off the p416 plasmid in the *xpo1-T539C* yeast strain (70) and grown to an OD_{600} of 0.45 at 30°C. (B) The same as in A except that the cells were incubated for 60 min in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of leptomycin b. (C) Same as A but with cells expressing SRP21-GFP. (D) Same as C but with cells incubated for 60 min with leptomycin b.

Ded1 physically interacted with SRP factors

Our data indicated that Ded1 could bind SCR1, associate with the SRP complex and co-localize with the ER. Moreover, we obtained a genetic link between Ded1 and SRP proteins. However, it was unclear whether Ded1 physically interacted with the SRP proteins or indirectly through the SCR1 RNA (Figure 1). The metazoan SRP14 and SRP9 are known to bind 7SL in the Alu domain, SRP54 and SRP19 bind helices 6 and 8, and SRP68 and SRP72 bind around the junction between helices 5e, 5f, 6, 7 and 8 (27,35). However, yeast SRP14 is

thought to bind the Alu domain as a homodimer and the role of SRP21 to date is largely speculative, although it is considered a structural homolog of SRP9 (36,38). Yeast Sec65 serves a similar role as SRP19, but it is considerably larger (47,49,71). The SRP bound on the 80S ribosomes shows an extended structure where the S-domain interacts with the exit channel containing the signal peptide and the Alu domain interacts with the entry region of the mRNA (37,39,40). However, SCR1 contains two hinge regions (**Figure 1**); it was possible that the SCR1 RNA was folded upon itself in its free form and that this brought the different regions of the SRP in close proximity. Thus Ded1 might interact with multiple different SRP proteins.

To test this, we subcloned the genes encoding the different proteins into pET22 and pET19 plasmids and then purified the recombinant proteins expressed in *Escherichia coli* on nickel-agarose columns. We then incubated the purified individual proteins or combination therein with purified Ded1, recovered the complexes with Ded1-IgG-Protein-A-Sepharose beads and separated the recovered proteins by SDS-PAGE (**Figure 9**).

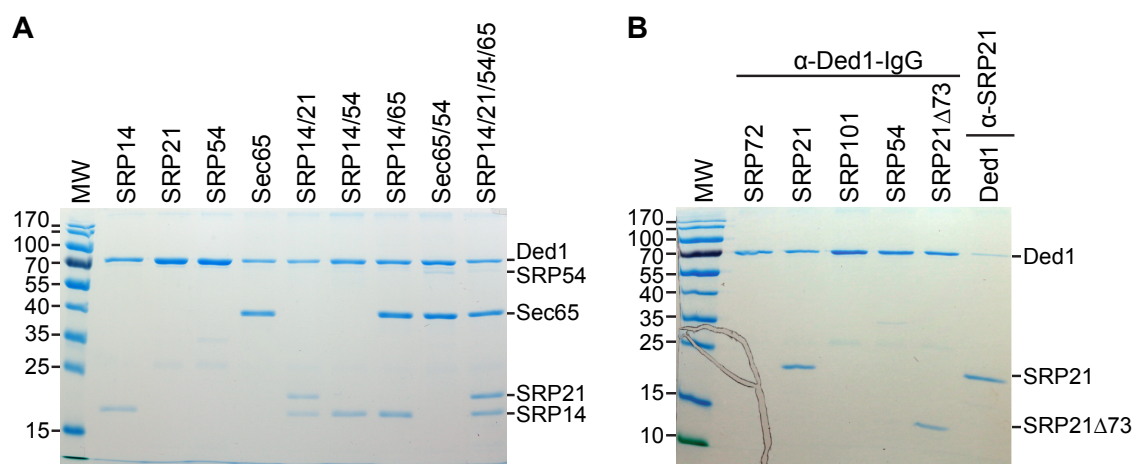


Figure 9. Ded1 physically interacted with the SRP proteins in the absence of RNA. (A) 4 μ g of Ded1 was incubated with 4 μ g of each SRP protein. The material was incubated 45 min at 30°C, immunoprecipitated with protein-A-Sepharose beads with Ded1-specific IgG, separated on a 12% SDS PAGE and visualized with coomassie blue. SRP68 and SRP72 migrated close to Ded1 and consequently were not unambiguously separated. (B) The same as A except 6 μ g of the SRP proteins was used with 4 μ g of Ded1. Proteins were recovered with Ded1- or SRP21-specific IgG as indicated.

The results showed that Ded1 formed stable interactions with SRP14 and Sec65. Unfortunately, SRP68, SRP72 and SRP101 migrated at positions on the SDS-PAGE that overlapped with Ded1; hence we were not able to obtain unambiguous results, but they appeared to have little or no affinity for Ded1. SRP54 did not stably associate with Ded1 by itself. In contrast, SRP21 was not consistently recovered with Ded1, which indicated that it formed weak interactions with the protein (**Figure 9**). However, SRP21 was consistently

recovered with Ded1 in the presence of SRP14, which was consistent with SRP14 and SRP21 forming a stable heterocomplex as previously proposed (38). Likewise, SRP54 was recovered with Ded1 in the presence of Sec65; this was consistent with the two proteins being in close proximity on the S domain of SCR1 (47,49,71). Moreover, all four SRP proteins were recovered with Ded1 when incubated together.

The weak interactions between SRP21 and Ded1 were primarily through the amino-terminal domain because deleting the 73 carboxyl-terminal amino acids (SRP21 Δ 73) did not eliminate this affinity (**Figure 9B**). Finally, we recovered Ded1 in pull-down experiments with SRP21-specific IgG (**Figure 9B**). Thus, Ded1 was capable of forming protein-protein interactions with the SRP proteins in the absence of SCR1 RNA. Nevertheless, the presence of SCR1 RNA enhanced the recovery of all the proteins (see section: **Ded1 associated with SRP factors *in vivo***).

SRP21 inhibited the SCR1-dependent ATPase activity of Ded1

Ded1 is an RNA-dependent ATPase. We previously showed that the nuclear and cytoplasmic cap-associated factors would stimulate the ATPase activity of Ded1 in the presence of RNA (13). We wondered whether the SRP proteins would alter the enzymatic activity of Ded1 as well and whether it would be preferential for the SCR1 RNA, which would be the authentic substrate for the assembly of the SRP proteins. We tested this with an *in vitro*, T7-polymerase-transcribed SCR1 RNA that was equivalent to the endogenous SCR1 except that the 5' terminal nucleotide was replaced with a guanosine to facilitate transcription. As a control we used a fragment of the actin pre-mRNA precursor containing short exon sequences and the entire intron. In addition, the actin transcript was of similar size to SCR1 (605 nts and 552 nts, respectively).

Many of the SRP proteins at nearly a 30-fold excess over Ded1 inhibited the RNA-dependent ATPase activity of Ded1 somewhat for both actin and SCR1, although SRP54 seemed to enhance the activity slightly, especially with actin (**Figure 10A**). This was not unexpected because the SRP proteins were largely basic and positively charged under the reaction conditions (pH 7.5; **Table 3**); the proteins would be expected to nonspecifically associate with the RNAs and thereby reduce the effective concentration of the RNAs accessible to Ded1. SRP21 showed a much stronger inhibition, especially with SCR1, but it was the most basic ($pK_i = 11.14$) of the SRP proteins. To further elucidate the nature of the inhibition, we compared the ATPase activity of Ded1 with SCR1 and actin RNAs with SRP21. SRP21 is considered the structural homolog of SRP9, and in yeast it probably forms a complex with a homodimer of SRP14 that binds the Alu domain of SCR1 (36,38). Thus we tested to see if SRP14 would enhance the inhibitory effects of SRP21.

Equimolar concentrations of both the actin precursor and SCR1 stimulated the ATPase activity of Ded1, but the stimulation was not equivalent. Moreover, there was variability in the stimulatory effects with different RNA preparations, which probably reflected variability in the folding of the RNAs during preparation. Indeed, others have shown that the smaller human 7SL RNA is difficult to recover as a homogeneous structure *in vitro* (41). Thus, to facilitate comparisons we normalized the activity relative to that of Ded1 with the RNA alone and used the same RNA preparations for comparisons. In addition, we used 8.5-fold less of the SRP proteins to emphasize the differences.

SRP14 may have slightly inhibited Ded1 with SCR1 but it had little affect with actin (**Figure 10B**). In contrast, SRP21 inhibited the ATPase activity of Ded1 with SCR1 by about 75% but only by 25% with actin. This indicated that there was some nonspecific inhibition, but that the strongest inhibition was obtained with the authentic substrate of SRP21. Addition of SRP14 reduced the activity of Ded1 in the presence of SRP21 by an additional 8% for SCR1 but showed no additional reduction with actin. Thus, SRP14 enhanced the SRP21-dependent inhibition of Ded1 with SCR1 RNA. Addition of the other SRP proteins to SCR1 further reduced the activity by about 4%. None of the purified SRP proteins showed any intrinsic ATPase activity in the absence of Ded1, and none of the SRP proteins affected the ATPase activity of Ded1 in the absence of RNA (**Figure 10B** and **data not shown**).

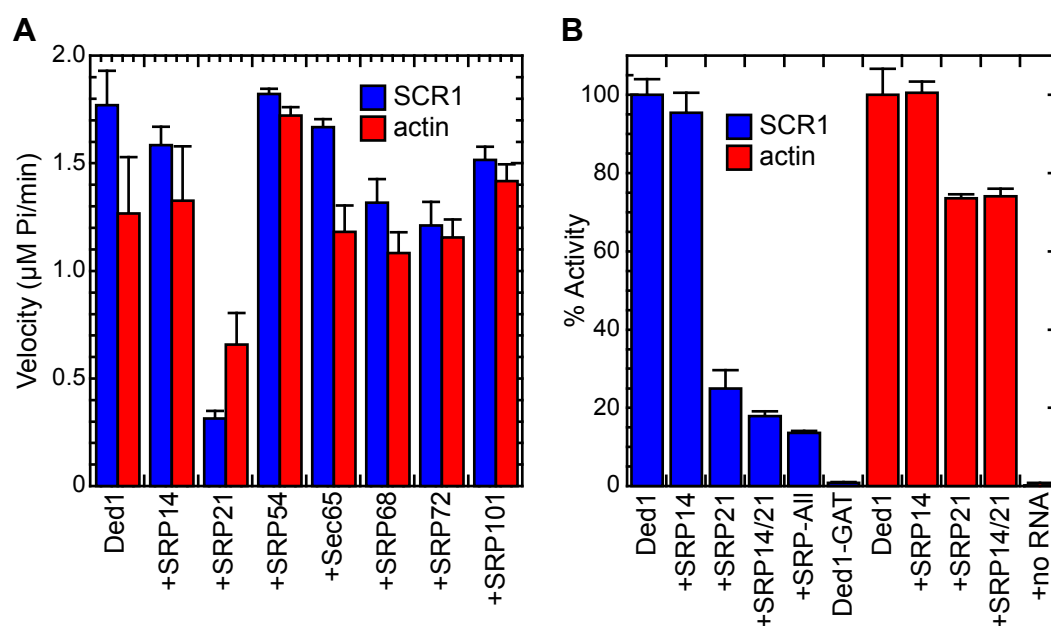


Figure 10. The SRP proteins inhibited the ATPase activity of Ded1. (A) Reactions were undertaken with 7 nM Ded1, 200 nM of the SRP proteins, 1 mM ATP and 23 nM of SCR1 or actin RNA. The reaction velocities were measured over 40 min at 30°C. (B) Reaction were done as in A but with 23 nM of the SRP proteins except SRP14, which was used at 46 nM to form the homodimer, and 23 nM RNAs. The reaction velocities were normalized relative to the activity of Ded1 in the presence of the RNA (SCR1 or actin) alone. +SRP-All, Ded1 was incubated with SRP14, SRP21, SRP54, Sec65, SRP68, and SRP72; Ded1-GAT, a Ded1 P-loop mutant that lacks ATPase activity; +no RNA, Ded1 was incubated in the absence of an RNA substrate with the SRP proteins. The mean and standard deviations are shown for two independent experiments in panel A and for three in panel B. The lower error bars were deleted for clarity.

The data indicated that SRP21 in the presence of its authentic substrate was the most effective at inhibiting Ded1. Thus, it was likely that SRP21 bound to the Alu domain of SCR1 formed the most effective inhibitory structure. We tested this with deletions of the S domain (SCR1 Δ S1) and Alu domain (SCR1 Δ Alu). Previous work has shown that the folding of mammalian 7SL RNA is difficult, and it needs a temperature step for refolding involving slow cooling in the presence of monovalent cations; moreover, the assembly of the SRP proteins is complicated (41). The yeast SCR1 RNA is about two-fold larger with a number of additional hairpins, so we anticipated difficulties in obtaining a functional homogenous structure (**Figure 1**). Thus, we assayed various permutations of pre-incubating the RNA with the various proteins prior to adding the ATP, but they all yielded similar results. Ded1 was significantly less active with both SCR1 Δ S1 and SCR1 Δ Alu than full-length SCR1 at equimolar concentrations of RNA, but the RNAs were 77% and 58%, respectively, of the size of SCR1 (**Figure 11A**). This may account for the reduced ATPase activity, but it was possible that Ded1 was activated by specific structures within the SCR1 RNA that were absent or misfolded in the deletions. SRP21 inhibited the ATPase activity for SCR1 and to a lesser extent actin, but it had little inhibitory effect on the SCR1 deletions, which was consistent with a structure-dependent inhibition. We also tested a carboxyl-terminal deletion of SRP21 (SRP21 Δ 73) that lacked the amino acids that did not correspond to those of mammalian SRP9 (38); it showed significantly less inhibition, which was consistent with it playing a role in the SRP21 interactions with SCR1 and Ded1 (**Figure 11A**).

The ATPase activity of Ded1 is stimulated by various RNAs containing single-stranded regions, but it is most activated by poly(A)-containing RNAs (72). We repeated the ATPase assays with purified yeast RNA. We needed to use 0.12–0.14 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ of yeast RNA to obtain similar levels of activation of Ded1 as 23 nM of SCR1 (0.0039 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) or actin (0.0044 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; **Figure 11B**). Thus, yeast RNA was \sim 30-fold less effective at stimulating the activity. SRP21 and SRP14 showed no inhibitory effects, and they may have actually stimulated the ATPase activity of Ded1 somewhat, perhaps by acting as RNA chaperones to increase the accessibility of the RNA to Ded1. However, the yeast RNA was a heterogeneous mix that may have had both activating and inhibitory RNAs. Thus, we repeated these experiments with yeast tRNAs and poly(A) RNA at 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (**Figure 11C**). Both RNAs needed \sim 30-fold higher concentration than for SCR1 to stimulate the ATPase activity of Ded1 to similar levels, but SRP21 had little effect on the activities. Thus, Ded1 and SRP21 preferentially bind RNAs with certain sequences or structural features.

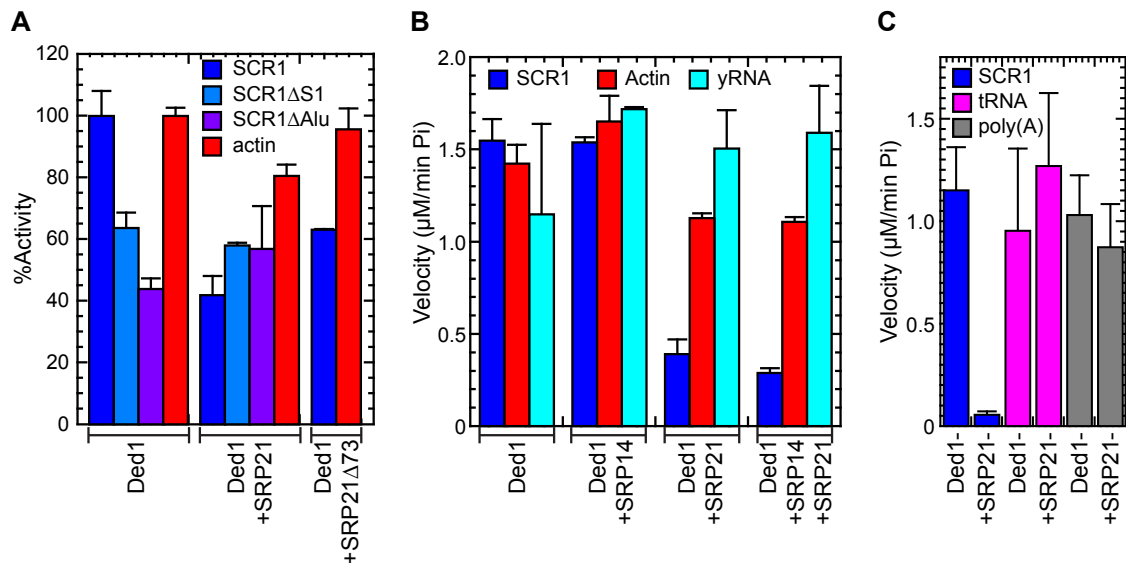


Figure 11. The RNA-dependent effects of SRP21 on the ATPase activity of Ded1. (A) Ded1 was pre-incubated with the RNAs at 30°C for 30 min. SRP21 or SRP21 Δ 73 were then added at 200 nM with 1 mM ATP, and the ATPase velocity was measured over 40 min. The mean and standard deviations are shown for two independent experiments. (B) Ded1 at 7 nM was incubated with 23 nM SCR1, 23 nM actin or 0.14 μ g/ μ l yeast RNA and with 1 mM ATP. SRP21 was used at 23 nM and SRP14 at 46 nM (to form homodimer). The reaction velocities were measured over 40 min at 30°C. The mean and standard deviations are shown for three independent measurements are shown for SCR1 and actin and for two independent measurements for yeast RNA. (C) Reactions were done as in B. Ded1 at 7 nM was incubated with 23 nM SCR1 (equivalent to 0.0039 μ g/ μ l) or with 0.12 μ g/ μ l of tRNA or poly(A). The SRP21 was used at 200 nM. The mean and standard deviations are shown for three independent measurements. The lower error bars were deleted for clarity.

SRP21 did not block Ded1 binding to SCR1

The previous results indicated that Ded1 was either blocked from binding the SCR1 RNA or that its ATPase activity was inhibited by protein-protein contacts with SRP21 bound on the RNA. To test this, we did electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with the different proteins and RNAs. Our previous work showed strong, concentration-dependent binding of Ded1 to short oligonucleotides in the presence of AMP-PNP with a $K_{1/2}$ of \sim 40 nM and weak binding in the presence of ADP or in the absence of a nucleotide (73). We repeated these experiments with the longer RNAs, but we separated the products on agarose gels containing ethidium bromide. Similar results were obtained when the gels were run in the absence of ethidium bromide, which was then soaked into the gels after electrophoresis (data not shown).

A 5- to 10-fold excess of Ded1 was able to displace the majority of both SCR1 and actin (Figure 12A). SCR1 typically migrated as a distinct band but actin often showed more heterogeneity, which probably reflected more profound conformational heterogeneity. This varied somewhat between RNA preparations. In contrast, SRP21 preferentially bound SCR1

RNA over actin (**Figure 12B**). Moreover, it seemed to form large molecular-weight aggregates that only partially migrated into the gels. Deleting the carboxyl-terminal sequences of SRP21 (SRP21 Δ 73) largely eliminated the binding affinity, indicating that these sequences were either important for binding or for maintaining the correct conformation of the protein (**Figure 12C**).

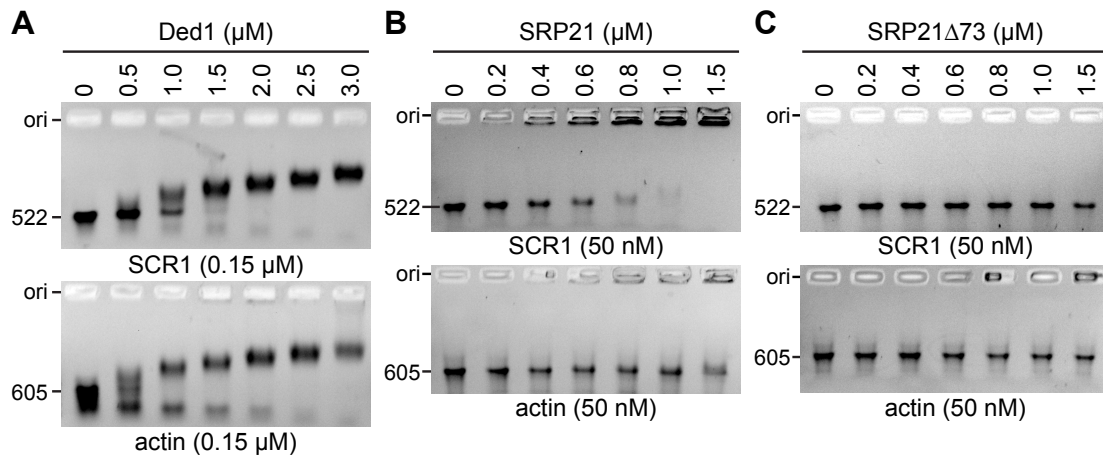


Figure 12. RNA binding assays of Ded1 and SRP21. (A) Ded1 binds SCR1 and actin with similar affinities. The indicated quantities of the Ded1 protein was incubated with 0.15 μ M of the indicated RNAs and then separated on a 1% agarose gel in the presence of ethidium bromide. Ori, loading well of agarose gel. (B) The indicated quantities of the SRP21 proteins were incubated with 50 nM of the indicated RNAs and separated on a 1% agarose gel. (C) SRP21 deleted for the 73 carboxyl-terminal residues that are not structurally conserved in mammalian SRP9.

We next asked what affect SRP21 would have on Ded1 binding. The results showed that SRP21 had little affect on Ded1 binding, but the retarded bands tended to migrate as higher molecular-weight complexes in the presence of SRP21 for SCR1 (**Figure 13A**). We previously showed that the carboxyl-terminal domains of DEAD-box proteins, including Ded1, are important for high affinity binding to RNAs (54). Consistent with this, deleting 78 amino acids from the carboxyl terminus of Ded1 largely eliminated RNA binding (**Figure 13B**). However, addition of SRP21 had little affect on Ded1 binding even though a small amount of material was sequestered near the origin of the gel (**Figure 13C**). Instead, Ded1 seemed to actually reduce the binding affinity of SRP21 for the RNA, and this was true for the carboxyl-terminal deletion of Ded1 as well (**Figure 13C**). Thus, although SRP21 modulated the ATPase activity of Ded1, Ded1 seemed to modulate SRP21 binding, perhaps through interactions with the amino-terminal domain of Ded1 or the RecA-like core.

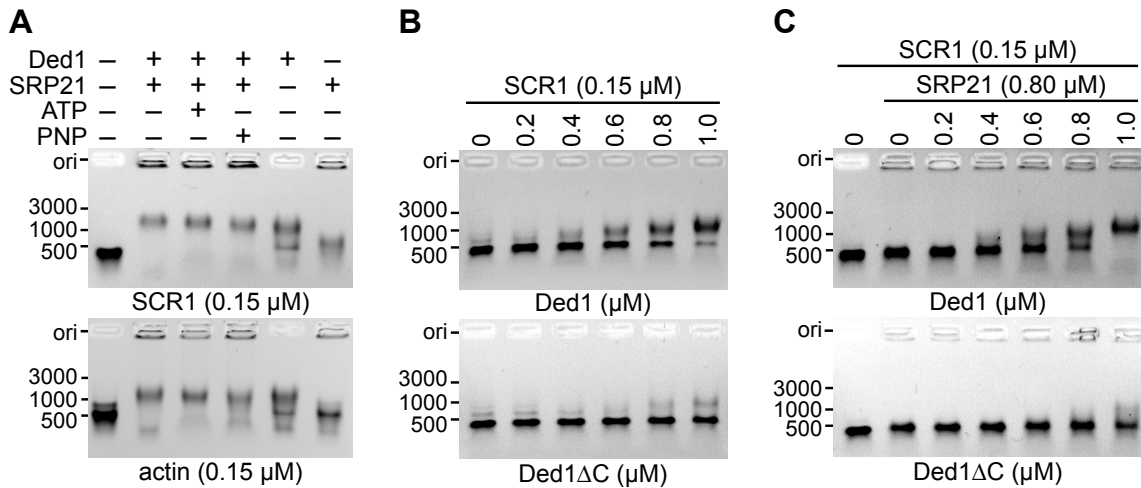


Figure 13. Electrophoretic mobility shift assays of Ded1 with SCR1 (522 nts) and actin (605 nts) RNAs. Proteins were incubated with the RNA and separated under non-denaturing conditions on 1% agarose gels containing ethidium bromide. The markers indicate the positions of the major bands of the GeneRuler DNA ladder (Thermo Scientific). Ori, loading well of agarose gel. **(A)** Ded1 (0.8 μM) and SRP21 (0.8 μM) were incubated with 0.15 μM of either SCR1 or actin RNA in the presence or absence of 5 mM ATP or AMP-PNP (PNP). **(B)** Increasing concentrations (in μM) of Ded1 or an 78 amino-acid, carboxyl-terminal deletion of Ded1 [Ded1ΔC; (54)] was incubated with 0.15 μM SCR1 RNA and 5 mM AMP-PNP. **(C)** Increasing concentrations of Ded1 was incubated with 0.15 μM SCR1 RNA, 0.80 μM SRP21 and 5 mM AMP-PNP.

Finally, we asked what structural features of SCR1 were recognized by the proteins. These experiments were more ambiguous because the binding site of SRP21 is largely unknown and because there was no guarantee that the RNAs deletions would fold into the anticipated conformations. The results showed that both Ded1 and SRP21 were able to bind the SCR1 RNAs deleted for the Alu and S domains (**Figure 14**).

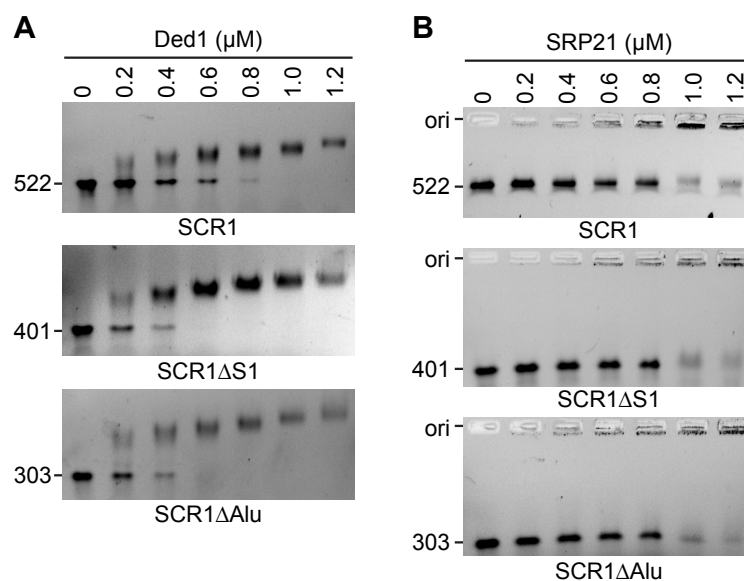


Figure 14. Ded1 and SRP21 bind various regions of SCR1. The indicated quantities of protein were incubated with the indicated RNAs and separated on a 1% agarose gel in the presence of

ethidium bromide. **(A)** The indicated concentrations of Ded1 (in μM) were added to 0.15 μM of the different SCR1 RNAs in the presence of 5 mM AMP-PNP. **(B)** The indicated concentrations of SRP21 (in μM) were added to 0.15 μM of the different SCR1 RNAs. Ori, loading well of agarose gel.

Thus, SRP21 probably recognized multiple features of the SCR1 RNA. Moreover, the strong binding of Ded1 to the deleted SCR1 RNAs did not correlate with the reduced ATPase activities of Ded1 with these RNAs (**Figure 11A**). Therefore, either Ded1 could bind the RNAs in a nonproductive form or the ATPase activity of Ded1 was modulated by the different structures.

DISCUSSION

Our experiments show that Ded1 is an SRP-associated factor. It physically interacts with the SCR1 RNA and many of the SRP proteins both *in vitro* and *in vivo*. It is genetically linked to these proteins, and it co-sediments with the SRP factors in sucrose gradients. The RNA-dependent ATPase activity of Ded1 is inhibited by SRP21 and this inhibition is much more pronounced in the presence of SCR1 RNA, the authentic substrate of SRP21. Although there is probably conformational heterogeneity of the RNAs, SRP21 preferentially binds SCR1 RNA over actin RNA, which indicates that it contains or forms the necessary elements for high-affinity SRP21 binding. Likewise, the ATPase activity of Ded1 is preferentially activated by SCR1 and actin RNAs over an equivalent concentration whole yeast RNA, tRNA or poly(A) RNA, which indicates that it is recognizing specific features or structures of these RNAs. The nature of these features or structures is unclear. Finally, Ded1 co-localizes in cellular foci with the ER-associated mRNAs, and it occasionally co-localizes with SRP proteins in the nucleolus.

The role of SRP21 to date is largely unclear. It is considered as the structural homolog of metazoan SRP9, which forms a heterodimer with SRP14 on the Alu domains of 7SL RNA, even though there is little or no sequence homology (38). The amino-terminal residues of SRP21 are capable of forming similar structural features as SRP9, but it is over 80% bigger; the carboxyl-terminal sequences are thought to compensate for the abbreviated Alu domain of yeast SCR1, which lacks the characteristic hairpins H3 and H4 (38). Moreover, yeast SCR1 is about 75% bigger than metazoan 7SL, and it contains additional structures between the Alu and S domains (33,34). SRP21 may be needed to stabilize or form the correct conformation of the SCR1 RNA, and thus it may need to recognize multiple structures or features of the RNA. Consistent with this, SRP21 binds full-length SCR1 RNA and the deletions *in vitro* with similar affinity. In contrast, it has weak affinity for the actin RNA. The carboxyl-terminal sequences of SRP21 are important for this affinity. This is

consistent with SRP21 forming a complex with the SRP14 homodimer as previously proposed (38).

SRP21 inhibits the RNA-dependent ATPase activity of Ded1, but it is much more effective in the presence of SCR1 RNA than actin RNA. In contrast, Ded1 binds SCR1 and actin RNAs with similar affinities and it is activated to similar extents. Under these circumstances, one would expect SRP21 to reduce Ded1 binding to SCR1 but not to actin because SRP21 would reduce the number of potential binding sites for Ded1 on SCR1. But this is not the case, and if anything SRP21 seems to enhance Ded1 binding to SCR1 slightly. The inhibition is due to protein-protein contacts, but SRP21 is less stably associated with Ded1 in the absence of SRP14 or SCR1 RNA. Thus, SRP21 probably forms a specific inhibitory structure with Ded1 in the presence of SCR1 RNA. This is consistent with a functional regulation of the ATPase activity of Ded1 in the context of the SRP complex.

Ded1 is an ATP-dependent RNA binding protein, and it is capable of forming long-lived complexes with RNA in the presence of a nonhydrolyzable analog of ATP *in vitro* (8). Ded1 is considered a translation-initiation factor [(14,15) and references therein], but crosslinking studies on DDX3 show most of the interactions on the open reading frames of a subset of the mRNAs (74). We obtained similar results with Ded1 (data not shown). Thus, Ded1 remains associated with the ribosomes during translation elongation, which can be seen in polysome profiles as well [this work and (13)]. Ded1 likewise is found with membrane-associated ribosomes (63). Thus, Ded1 may play important roles in translation elongation as well as in initiation—including membrane-associated translation.

Ded1 is associated with 90S ribosomal precursors, which may indicate a role of Ded1 in SRP assembly in the nucleolus (75). We do see occasional co-localization of the Ded1-DQAD mutant with overexpressed SRP14 in crescent-shaped structures in the nucleus that are consistent with this possibility, but SRP21 has a diffuse location within the nucleus, and it is never seen concentrated in the crescent-shaped structures. Thus, it may associate with the SRP complex outside the nucleolus or it may be transiently located within the nucleolus, as has been proposed for Sec65 (45). Thus, we can not rule out a role for Ded1 in the biogenesis of the SRP complex in the nucleus that is regulated by SRP21. Under these circumstances, Ded1 may associate early with the SRP complex and remain attached even when the complex binds the 80S ribosomes. This would provide a possible mechanism by which ER-specific mRNAs are selected for translocation on the ER. Interestingly, DDX3 crosslinks to 7SL RNA as well (74). Thus, although metazoans lack a clear equivalent to SRP21, DDX3 may also be intimately connected to SRP-dependent translation.

On the basis of these observations, we propose the following model for the role of Ded1 (and DDX3-like proteins) in membrane-associated translation. Ded1 interacts with cap-associated factors and with Pab2 bound on the 3' poly(A) tail of the mRNA (not shown). The 3' UTR is considered important for SRP-dependent targeting of mRNAs [reviewed by

(76)]; but the SRP is not known to directly interact with the mRNA, and it may interact through another RNA binding protein (77). Ded1 (and DDX3) could serve this role as it interacts with both 5' and 3' components of the mRNA [(13,16) and references therein]. Ded1 remains attached to the mRNA during scanning by the 43S ribosomes, assembly of the 48S ribosomes and eventual formation of the 80S ribosomes at the AUG start codon (**Figure 15A**). This is consistent with crosslinking experiments of ribosomal RNA that show Ded1 near the mRNA entry channel (43). The RNA-dependent ATPase activity of Ded1 is uninhibited, and it is able to translocate on the mRNA with the ribosomes through rapid cycling between the "open" and "closed" conformations, and it may further stabilize the ribosome-mRNA complex during scanning, assembly and translation (14). During this time, an inactive form of the SRP may associate with the mRNA-ribosome-Ded1 complex through postulated 3' UTR factors that are specific for SRP-dependent translation while the ribosomes are still part of the soluble fraction during a pioneering round of translation as previously proposed (77). The Alu domain of the SRP would be easily displaced from the ribosomes by elongation factors (78). Ded1 may play an important role in the assembly and stabilization of this complex because it can interact with all the relevant factors. Alternatively, Ded1 may help associate the SRP on the ribosomes once the signal peptide is sufficiently long according to the classical model (79).

In the next step, the signal peptide binds in the hydrophobic groove of the GTPase SRP54 that subsequently causes conformational changes of the SRP and its interactions with the ribosome [(40,78,80) and references therein]. SRP14 bound on the Alu domain of SCR1 binds at the GTPase center located at the 40S-60S interface and thereby transiently blocks the GTPase elongation factor eEF2 from binding (37,39,40). At the same time, SRP21 binds to Ded1 and inactivates its ATPase activity. This results in Ded1 maintaining a closed conformation that has high affinity for the RNA but that also crimps the RNA bound on RecA domain 1; this prevents both Ded1 and the ribosomes from sliding on the mRNA by effectively clamping the mRNA (**Figure 15B**). Another factor than SRP9 may play this role in metazoans. The SRP complex undergoes conformational changes during this time, and Ded1 may also bind the SCR1 RNA through its carboxyl terminus to facilitate the subsequent interactions of SRP14 with the ribosomes.

The absence of DDX3-like RNA helicases in *in vitro* reconstituted systems might explain why this pausing is often short or absent (81). Ded1 may also stabilize the paused ribosomes to prevent premature termination or frameshifting. The paused ribosomes then associate with the peripheral-membrane GTPase SRP101 and the integral-membrane protein SRP102 that form the SRP receptor (SR) complex (**Figure 15C**). Once associated with the Sec61 translocon, the SRP complex undergoes further conformational changes and is either released from the ribosome or assumes an inactivated form on the ribosomes. The ATPase activity of Ded1 is restored and translation can resume (**Figure 15D**).

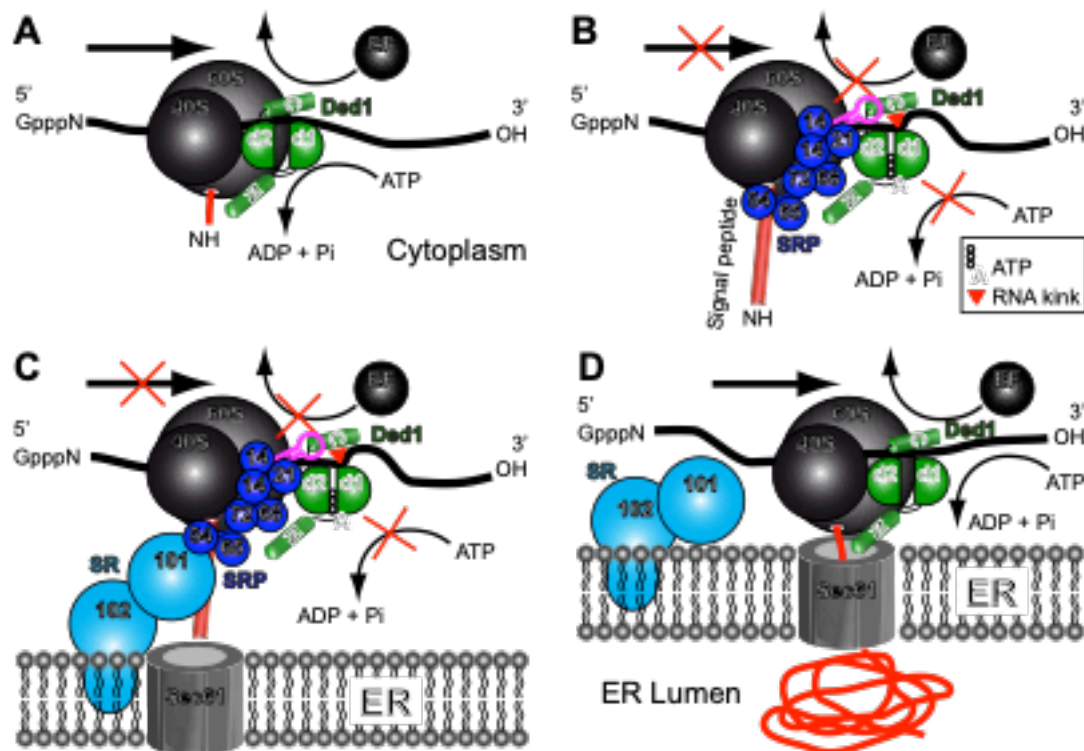


Figure 15. Model for the role of Ded1 in SRP-dependent translation.

(A) Ded1 (shown in green) associates with the mRNA during translation initiation and remains attached to the mRNA in front of the ribosomes. It consists of RecA-like domains 1 (d1) and 2 (d2), an amino-terminal domain (N) and a carboxyl-terminal domain (C). The RNA-dependent ATPase activity of Ded1 is unaltered, and it is often in the "open" conformation with weak affinity for the RNA; it is able to translocate with the ribosomes during translation. (B) The SRP (shown in blue) associates with ribosomes translating mRNAs (or undergoes conformational changes in the case of pre-bound SRP) when the signal peptide leaves the exit channel and obtains a certain length. Ded1 may help in assembling and stabilizing the complex. Conformational changes of the SRP causes SRP14 to block the entry channel and prevent the eEF2 elongation factor (EF) from binding the ribosomes, which pauses elongation. Ded1 may bind part of the Alu domain of SCR1, shown in magenta, during these conformational changes to promote SRP14 binding to the ribosomes. At the same time, SRP21 inhibits the ATPase activity of Ded1, which forms the "closed" conformation with high affinity for the RNA. This ATP-bound form of Ded1 kinks the RNA (red triangle) on domain 1 and locks Ded1 on the RNA. This prevents the ribosomes from frame shifting (sliding) on the RNA and perhaps stabilizes the ribosome-mRNA complex to prevent premature termination of translation. (C) The paused mRNA-ribosome complex associates with SRP receptor (SR) factors SRP101 and subsequently SRP102, which brings the mRNA-ribosome complex to the Sec61 ER translocon. (D) The SRP complex dissociates from the ribosomes, the ATPase activity of Ded1 is restored and translation continues. Note that this model also applies to the SRP-dependent import of polypeptides with internal transmembrane domains, and it does not preclude the possibility that multiple Ded1 molecules are involved, that the SRP associates multiple times with the ribosomes during elongation or that the SRP-associated ribosomes remain on the ER over multiple rounds of translation.

Ribosome pausing events are important for other translational events in addition to SRP-dependent protein translocation. For example, pausing is associated with co-translational protein folding, protein targeting, mRNA and protein quality control, and with co-translational mRNA decay [reviewed by (82)]. Ded1 (and DDX3) may be intimately associated with these events by a similar mechanism but with other associated factors besides

the SRP proteins. Likewise, ribosome pausing is associated with frameshifting events [reviewed by (83,84)]. Ded1 is important for L-A RNA virus replication (85), and it undergoes a -1 frameshifting event during translation of the gag-pol gene [reviewed by (86)]. Similarly, retroviruses, such as HIV-1, undergo a -1 frameshifting event during translation [reviewed by (87)]. DDX3 is important for HIV-1 replication, and the virions of retroviruses in general are enriched in 7SL RNA (23,88). Thus, the Ded1/DDX3 subfamily of proteins may play central roles in gene expression by regulating not only translation initiation but translation elongation as well.

Finally, we note that the bacterial polypeptide-translocase SecA is a superfamily 2 "RNA helicase" that has a RecA-like core structure that is very similar to the DEAD-box proteins (89). It is intimately associated with the SecYEG translocon, and it uses ATP to drive post-translational polypeptides through the pore into the periplasm [reviewed by (26)]. Recent work has shown that SecA mimics the properties of the SRP (90,91). Thus, the use of superfamily 2 proteins for polypeptide translocation across membranes may be conserved throughout evolution. The biological roles and substrates of these proteins may not be limited to nucleic acids.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Caroline Lacoux and Stéphanie Ørum for helpful discussions, Martin R Pool for the Sec65 IgG and for the pMW295 and pMW299 SRP plasmids, Benjamin Glick for the *KAR2-RFP_YI*plac204, Jiří Hašek for the pFA6a-mCherry-NatNT2 plasmid, Michael Lisby and Rodney Rothstein for the G49 and G50 yeast strains, and Claude Thermes, Yves Daubenton, Erwin Van Dijk, Yan Jaszczyszyn, Pauline Francois, Marina Cavaiuolo and Benoist Laurent for help with RNAseq.

FUNDING

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique; HeliDEAD grant [grant number ANR-13-BSV8-0009-01 to NKT] from the Agence Nationale de la Recherche; and Initiative d'Excellence program from the French State grant DYNAMO [grant number ANR-11-LABX-0011-01]. Funding for open access charge: Centre National de la Recherche Scientifique.

Conflict of interest statement. None declared.

MATERIAL AND METHODS

Constructs

The pMW295 and pMW299 plasmids encoding the SRP proteins and SCR1 were a kind gift from Martin R. Pool (44). They were used as templates to PCR-amplify the individual genes and SCR1 RNA. Other constructs are as described below. The oligonucleotides used and cloning strategies are shown in more detail in **Supplementary Table 1**. The SRP proteins were PCR amplified with the corresponding SRP _up and _low oligonucleotides off the pMW295 and pMW299 plasmids (44). The PCR products were digested with SpeI and XhoI, gel purified, and cloned into the equivalent sites of the yeast plasmids 2HA-p415 and 2HA-p424 with *ADH* promoters and *LEU2* and *TRP1* markers, respectively (92). Except for SRP68 and Sec65, all constructs were subcloned into the NdeI and XhoI sites of pET22b.

Because of internal NdeI sites, the pET19b versions of SRP68 and Sec65 were amplified with additional oligonucleotides. SRP68 was PCR amplified with SRP68_up2 and SRP68_low2. Sec65 was PCR amplified with Sec65-pET_up and Sec65-pET_low. The PCR products were digested with XhoI and BamHI, gel purified and cloned into the equivalent sites of pET19b.

SRP101 and SRP102 were amplified off purified chromosomal DNA using oligonucleotides with BamHI and XhoI sites because of an internal SpeI site in SRP101. SRP101 was PCR amplified with SRP101_up and SRP101_low. SRP102 was PCR amplified with SRP102_up and SRP102_low. The PCR products were digested with BamHI and XhoI, gel purified and cloned into the equivalent sites of 2HA-p424. The constructs were subcloned into the NdeI and XhoI sites of pET22b.

The SRP14 and SRP21 wildtype and carboxyl-terminal deletions were cloned into the p413 plasmid containing a *HIS3* marker and *ADH* promoter by using an oligonucleotide complementary to the amino-terminal HA tag of the previous p415-PL-HA constructs and containing XbaI and XhoI sites (55). SRP14 was PCR amplified with p415HA_up and SRP14_low. SRP14 Δ 29 was PCR amplified with p415HA_up and SRP14d29_low. SRP21 was PCR amplified with p415HA_up and SRP21_low. SRP21 Δ 73 was PCR amplified with p415HA_up and SRP21d73_low. The PCR products were digested with XbaI and XhoI, gel purified and cloned into the equivalent sites of p413. SRP14 Δ 29 and SRP21 Δ 73 were subcloned into the NdeI and XhoI sites of pET22b. Final constructs were all verified by sequencing and are shown in **Supplementary Table 2**.

The sequence encoding the SCR1 RNA was amplified with an oligonucleotide containing a 5' BamHI restriction site and the T7 promoter, and an oligonucleotide containing 3' XhoI and DraI sites. The PCR-amplified product was cleaved with BamHI and XhoI and cloned into the equivalent sites in the pUC18 plasmid. A T7 RNA polymerase run-off transcription of the DraI-cut plasmid yielded a 522 nucleotide-long RNA with the same

sequence as the endogenous SCR1 except the 5' adenosine was replaced with a guanosine to facilitate transcription. The SCR1 deletions were similarly constructed based on the secondary model of Van Nues and Brown (34). The SCR1 Δ S1 construct replaced residues 247–371 with a UUCG tetraloop, and the SCR1 Δ Alu construct deleted residues 1–155 and residues 454–522. The T7 RNA polymerase run-off transcriptions of the DraI-cut plasmids yielded 401 and 303 nucleotide-long RNAs, respectively.

The actin control was a T7-promoter derivative of the previously described actin precursor RNA in the Bluescript KS(-) plasmid (93). A T7 RNA polymerase run-off transcript of EcoRI-cut plasmid yielded a 605 nucleotide-long RNA containing, from 5' to 3', 54 nucleotides of the plasmid, 63 nucleotides of the 5' UTR, 10 nucleotides of the 5' exon, 309 nucleotides of the intron, 162 nucleotides of the 3' exon and 7 nucleotides of the plasmid.

The SRP genes (*SRP14*, *SRP21*, *SRP54*, *SRP68*, *SRP72*, *SEC65*) were PCR amplified off the pMW295 or pMW299 plasmids with oligonucleotides containing 5' SpeI and NdeI sites and 3' XhoI sites, and they were cloned into the SpeI and XhoI sites of the *2HA_p424* plasmid containing an *ADH* promoter, two *HA* tags and a *CYC1* terminator (92). *SRP14* and *SRP21* also were cloned into the *GFP_p413* plasmid. Except for *SRP68* and *SEC65*, all constructs were subcloned into the NdeI and XhoI sites of pET22b. *SRP68* and *SEC65* were re-amplified by PCR with oligonucleotides containing XhoI and BamHI sites and cloned into the equivalent sites of pET19b. *SRP101* and *SRP102* were amplified off purified chromosomal DNA using oligonucleotides with BamHI and XhoI sites and cloned into the equivalent sites of *2HA_p424*. The constructs were subcloned into the NdeI and XhoI sites of pET22b. *SRP14 Δ 29Cter* and *SRP21 Δ 73Cter* were PCR amplified with the *HA* tag and cloned into the XbaI and XhoI sites of p413 (55). *SRP14 Δ 29Cter* and *SRP21 Δ 73Cter* were subsequently subcloned into the NdeI and XhoI sites of pET22b.

The *GFP* and *MCHERRY* plasmids were constructed by amplifying genes off the pYM27-*EGFP-KanMX4* and pFA6a-*mCherry-NatNT2* plasmids, respectively. The PCR products were digested with XhoI and Sall, gel purified, and cloned into the equivalent sites of the yeast plasmids p415, p416 and p413. The *DED1*, *ded1-F162C* and *ded1-DQAD* plasmids were as previously described (13). These genes were subcloned into the SpeI and XhoI sites of *GFP-p415*, *p414* and *MCHERRY_p416*. The *KAR2-RFP_YIplac204* was a gift from Benjamin Glick.

Yeast strains and manipulations

Manipulations of yeast, including media preparation, growth conditions, transformation, and 5-FOA selection, were done according to standard procedures (94). The strains used in this study are listed in **Supplementary Table 3**.

The yeast GFP clone collection was purchased from Life Technologies (Ref 95702; Carlsbad, CA). The *sec61-ts* and *sec62-ts* yeast strains were a generous gift from Ron Deshaies (59). The *KAR2-RFP* strain was created by transforming the W303 (G49), *sec61* and *sec62* strains with EcoRV-linearized *KAR2-RFP_YIPlac204* containing the N-terminus of *KAR2* (135 bp) fused to *DsRedExpress2* with the *HDEL ER*-retention sequence. The yeast *TET*-promoters Hughes Collection strains were purchased from Dharmacon (GE Healthcare, Lafayette, CO). Tetracycline-inducible strains were transformed with *GPD-DED1*, *GPD-ded1-F162C* or the empty plasmid. Cells were grown in YPD (yeast extract, peptone, dextrose) medium or in minimal medium lacking leucine (SD-LEU), serially diluted by a factor of 10 and then plated on medium with or without 10 µg/ml doxycycline.

T7-SCR1 constructs

The oligonucleotides that were used are shown in **Supplementary Table 1**, where the regions of complementarity are underlined and restriction sites are shown in bold. The final constructs are listed in **Supplementary Table 2**.

The full-length T7-SCR1 was PCR amplified off the pMW299 plasmid (44) with the SCR1_up2 oligonucleotide containing the T7 promoter and SCR1-low oligonucleotides. The PCR product was digested with BamHI and XhoI, gel purified and cloned into the equivalent sites of pUC18. The T7-SCR1ΔAlu was constructed with the SCR1_dAlu_up oligonucleotide containing the T7 promoter and the SCR1_dAlu_low oligonucleotide. The PCR product was digested with BamHI and HindIII, gel purified and cloned into the equivalent sites of pUC18. The T7-SCR1ΔS1 construct was made as fusion PCRs with two sets of oligonucleotides. The pUC18_5' oligonucleotide was used with SCR1_dS1_low and pUC18_3' was used with SCR1_dS1_up. The two gel-purified PCR fragments were combined and PCR amplified with oligonucleotides pUC18_5' and pUC18_3'. The PCR product was digested with BamHI and HindIII, gel purified and cloned into the equivalent sites of pUC18.

Northern blot probes

The oligonucleotides used are listed in Supplementary Table 1. Oligonucleotides (150 pmoles) were 5' ³²P-labeled with 20 µCi of γ-³²P ATP (3000 Ci/mmol; Hartmann Analytic) for 30 min at 37°C in 50 µl volumes with 20 units of T4 PNK (New England Biolabs) in the provided reaction buffer. Reactions were heat inactivated for 20 min at 65°C and the unincorporated radioactivity was eliminated with a G25 Illustra MicroSpin column (GE Healthcare) according to the manufacture's instructions. Labeling efficiency was determined by comparing the radioactivity of the recovered material with that retained on the column. Blots were incubated with 15 pmoles of probes overnight at 42°C. Blots were washed two times at 42°C with 2X SSC buffer (Euromedex, Souffelweyersheim, France) with 0.1% SDS

added, washed two times with 0.2X SSC buffer with 0.1% SDS, dried and then subjected to autoradiography with a BAS-MS imaging plate (Fujifilm) overnight. Exposures were revealed with a Typhoon FLA9500 phosphoimager (GE Healthcare).

***In situ* localization**

To analyze the location of Ded1 relative to the ER or SRP proteins, we first used the green fluorescent protein (GFP)-tagged *ded1-DQAD* plasmid that was transformed into *sec61-ts* and *sec62-ts* mutant strains with the integrated *KAR2-RFP* plasmid (**Supplementary Tables 2 & 3**). Cells were grown in SD-LEU to an OD₆₀₀ of ~0.9–1.0 (logarithmic phase) at 24°C and then shifted to 37°C for 15 min. We subsequently used mCherry-tagged *ded1-DQAD* plasmid that was transformed into GFP-tagged *SRP14* and *SRP21* expressed from the chromosome (**Supplementary Tables 2 & 3**). Cells were grown in SD-LEU to an OD₆₀₀ of 0.95 at 30°C. Finally, GFP-tagged *SRP14* or *SRP21* and mCherry-tagged *ded1-DQAD* plasmids were transformed in the *xpo1-T539C* strain (70). Cells were grown in minimal medium lacking histidine and uracil (SD-HIS-URA) to an OD₆₀₀ of 0.4 (early logarithmic phase) at 30°C, and then they were split into two parts: one-half was resuspended in SD-HIS-URA and the other in SD-HIS-URA supplemented with ~200 nM leptomycin for 1 h.

Fluorescence microscopy was done with a Zeiss Observer.Z1 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH) with a 63x oil immersion objective equipped with the following filter sets: Alexa 489, filter set 10 from Zeiss for GFP (Excitation BP 450-490, Beam Splitter FT 510, Emission BP 515/65), HC-mCherry, filter set F36-508 from AHF for mCherry and RFP (Excitation BP 562/40, Beam Splitter 593, Emission BP 641/75). Images were acquired with a SCMOS ORCA FLASH 4.0 charge-coupled device camera (Hamamatsu photonics) using the Zen 2012 Package Acquisition/Analysis software and processed with Zen 2012 and Photoshop CS3.

RNA transcripts

RNAs were produced as run-off transcripts using T7 RNA polymerase and the MEGAscript kit (Ambion Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacture's instructions. In brief, reactions were done in 20–40 µl volumes with 1–2 µg of linearized DNA and incubated for 5–6 h at 37°C. The template was then digested with TURBO DNase, multiple reactions were combined, the solution diluted to 500 µl final with high salt buffer (300 mM potassium acetate, 50 mM Tris-base, pH 8.0, 0.1 mM EDTA), extracted with an equal volume of water-saturated phenol (MP Biomedicals, CA), extracted with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1) and precipitated overnight at -20°C with 2.5–3 volumes of ethanol. The RNA was recovered by centrifugation in an Eppendorf 5415R at high speed at 4°C for 15 min. The supernatant was discarded, the pellet washed with 300 µl of cold 70% ethanol, and the pellet dried in a SpinVac (Savant Thermo Fisher Scientific) for

20 min. To eliminate trace contaminants, the RNA was resuspended in 400 μ l high salt buffer and re-ethanol precipitated at -20°C . The pellet was recovered, washed and dried. The final pellet was resuspended in 20 mM Tris-base, pH 7.5, 0.1 mM EDTA and stored at -20°C until needed. The concentration was determined using an absorbance at 260 nm of 32 $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{cm}$, which was based on the calculated values of Oligo 7 software (Molecular Biology Insights, Inc, Colorado Springs, CO).

Recombinant protein expression and purification

Recombinant Ded1-His was expressed from the pET22b plasmid (Novagen) and purified as previously described (46). SRP His-tagged proteins were transformed into the Rosetta (DE3) *E. coli* strain. Cultures containing 500 ml of cells at OD_{600} of 0.5 were induced with 0.5 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) for 1 h at 37°C for SRP14, Sec65 and SRP101; 16 h at 16°C for SRP68 and SRP72; and for 2 h at 30°C for SRP54 and SRP21. Cells were collected by centrifugation and the pellets were resuspended in 5 ml of lysis buffer containing 20 mM Tris-base, pH 8.0, 0.5 M NaCl and the following protein-specific conditions: 20 mM imidazole, 8 mM β -mercaptoethanol and 1% Triton X-100 for SRP14, SRP68, SP101 and Sec65; 20 mM imidazole and 3 mM β -mercaptoethanol for SRP21; 10 mM imidazole and 3 mM β -mercaptoethanol for SRP54; and 20 mM imidazole and 1mM β -mercaptoethanol for SRP72. The equivalent of 1 mg/ml lysozyme was added for each condition, the cells kept on ice for 30 min and then the cells were lysed by sonication at 4°C until the lysate became clear. The material was centrifuged for 40 min at 14,000 rpm in a JA-12 rotor (Beckman Coulter, Brea, CA) at 4°C and the supernatant was loaded onto a 1 ml nickel nitrilotriacetic acid-agarose column (Ni-NTA, Qiagen, Hilden, Germany) previously equilibrated with the corresponding lysis buffer. After two washes, the SRP His-tagged proteins were eluted with lysis buffer containing 150 mM imidazole. Purified proteins were supplemented in 50% glycerol and were quantified using the Bradford protein assay kit (Bio-Rad). Proteins were aliquoted and stored at -80°C until needed. Recombinant purified proteins, supplemented with SDS sample buffer, were resolved by 12% SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE) and stained with Coomassie Blue (Instant Blue). The properties of the different proteins are shown summarized in Table 3 and the purified proteins shown in **Supplementary Figure 1**.

Immunoglobulin G-protein A Sepharose-bead pull-down experiments

The G50 yeast strain was transformed individually with *2HA_p424* plasmids containing two amino-terminal HA tags and the genes for *SRP14*, *SRP21*, *SRP54*, *SEC65*, *SRP68*, *SRP72* and *SRP101*. Cells were grown to an OD_{600} of 0.8–1 in minimal medium lacking tryptophan (SD-TRP), recovered by centrifugation, washed with cold water, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until needed. The cells were resuspended in an equal volume of lysis buffer

containing 20 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT and 1X protease inhibitor cocktail (Roche cOmplete EDTA-Free). An equal volume of 425–600 µm glass beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) was added and the cells were broken by vortexing in a FastPrep-24 (M.P. Biomedicals) at 4°C with four cycles of 30 sec and 5 min rests. The cell debris was removed by centrifugation for 5 min at 6,000 rpm in an Eppendorf 5415R centrifuge at 4°C. The lysates were further clarified by centrifugation two to three times at 13,000 rpm for 10 min each at 4°C. The protein concentrations were determined with a Bio-Rad Protein Assay kit according to the manufacture's instructions using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

Protein A-Sepharose CL-4B beads (GE Healthcare) were prepared by first washing them twice in IPP150 buffer containing 20 mM Tris-base, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Triton-X100, and 1 mM MgCl₂. Then, 50 µl of beads was incubated overnight with mixing in 10 volumes of IPP150 buffer at 4°C with 0.4 mg/ml BSA, 0.4 mg/ml heparin, and 20 µl of serum containing Ded1, SRP21, HA (Covalab, Bron, France) or pre-immune immunoglobulin G (IgG). The beads were washed three times with 800 µl of 1X PBS, and then mixed at 4°C for 2 h with G50 extracts containing 300 µg of protein and 10 volumes of 1X PBS buffer supplemented with BSA and heparin. The beads were washed three times with 800 µl of 1X PBS, and the bound proteins eluted twice with 300 µl of 0.1 M glycine, pH 2.3 for 15 min at 4°C with mixing. The pH of the eluted proteins was then adjusted to pH ~7 with NaOH.

Other pull down experiments

Protein A-Sepharose beads were prepared as described above. Ded1 or SRP21 IgG were crosslinked to beads with 0.2% glutaraldehyde as described previously (95) and were rigorously washed with 1X PBS. The equivalent of 4–6 µg of purified Ded1 and SRP proteins were incubated with 300 µl 1X PSB supplemented with 2 mM MgCl₂ for 45 min at 30°C. Fifteen µl of Protein A-Sepharose beads were directly added to the protein mixture and mixed by rotation for 1 h at 18°C. Prior to elution, beads were washed three times with 1X PBS. The bound proteins were eluted with 30 µl glycine, pH 2.3, for 15 min at 4°C on a rotating wheel platform. The acidity of the reaction was neutralized by adding NaOH. Co-immunoprecipitated purified proteins, supplemented with SDS sample buffer, were resolved on a 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue.

Western blot analysis

The eluted proteins were concentrated by making the solution 150 µg/ml in sodium deoxycholate and the proteins precipitated with 15%, final, of trichloroacetic acid (TCA) for 16 h at 4°C. The solution was centrifuged 30 min in an Eppendorf 5415R centrifuge at high speed, and the recovered pellet washed with cold acetone, dried and resuspended in loading buffer containing 50 mM Tris-base, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1% β-

mercaptoethanol, 0.02% bromophenol blue and 10% glycerol. The eluted proteins were separated on SDS-Laemmli gels, transferred to Amersham Protran nitrocellulose membranes (GE Healthcare Life Science) and probed with primary IgG against Ded1, SRP21, Sec65 or HA. The anti-Sec65 antibody was a generous gift from Martin R. Pool. Horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (for Ded1, Sec65, SRP21; Covalab) and anti-mouse (for HA; Covalab) were used as secondary antibodies, and the signals were revealed with a Clarity Western ECL Substrate kit (Bio-Rad, Hercules, CA) using a Bio-Rad ChemiDoc XRS+ and Image Lab 5.2 software. The Ded1-IgG and SRP21-IgG were produced by Covalab using purified recombinant Ded1 or SRP21, respectively.

Polysome sucrose gradients

G50 yeast strains containing HA-tagged SRP proteins were grown to an OD₆₀₀ of 0.8–1.0 in SD-TRP, cycloheximide (Sigma Aldrich) was added to a final concentration of 50 µg/ml, and the cells were incubated on ice for 10 min. Cells were harvested by centrifugation, washed with a lysis buffer containing 10 mM Tris-base, pH 7.4, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mg/ml cycloheximide, 1 mM DTT and 1X cComplete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), the pelleted cells were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until needed.

Cells were resuspended in an equal volume of lysis buffer, one volume of 425–600 µm glass beads was added, and then the cells were lysed in a FastPrep-24 as described above. Cell debris was removed by centrifugation in a Beckman JA-12 rotor at 6000 rpm for 5 min at 4°C, and then the lysates were further clarified by centrifugation in an Eppendorf 5415R centrifuge at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. The equivalent of 200 µl of cell extract with an OD₂₆₀ of 12 was loaded onto a 10–50% sucrose gradient and centrifuged in a SW41 rotor (Beckman Coulter) at 39,000 rpm for 2.45 h at 4°C. Half milliliter fractions from the gradient were collected with a Retriever 500 (ISCO) fraction collector and monitored with a UV-6 UV/VIS detector (ISCO) at 254 nm. Fractions were subsequently split in half for either RNA extraction or Western blot analysis.

The protein fractions were concentrated by adding 150 µg/ml, final, of sodium deoxycholate and then the solutions were made 15% in TCA, centrifuged in an Eppendorf 5415R, the recovered pellets were washed twice with cold acetone, and then the protein pellets were dried. The recovered material was resuspended in SDS loading buffer, separated by electrophoresis on a 12% SDS-PAGE gel and electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. The Western blots were undertaken as described above.

The RNA fractions were made 0.3 M in potassium acetate, extracted with an equal volume of water-saturated phenol, extracted twice with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1), and then ethanol precipitated overnight at -20°C. The RNA was recovered by centrifugation, dried, resuspended in 1X RNA loading buffer (Thermo

Scientific), and then electrophoretically separated on a 6% polyacrylamide gel containing 7 M urea and ethidium bromide (to reveal 18S and 23S rRNAs). The RNA were subsequently electrophoretically transferred to Amersham Hybond-N+ nylon membranes (GE Healthcare) and probed with a ³²P-labeled DNA oligonucleotide specific for SCR1 (**Supplementary Table 1**). The image was visualized with a Typhoon FLA9500 phosphoimager (GE Healthcare).

Reverse-transcriptase PCR

Samples were digested with Proteinase K by adding 1 mg/ml proteinase K (Sigma #P2308-100MG), 1% triton X-100, 0.5% SDS, 5 mM CaCl₂ in an Eppendorf Thermomixer Comfort (15 sec 1000 rpm, 90 sec rest) at 55°C for 35 min. Total RNA (input condition) and RNA from the eluate were recovered by the addition of 0.3 M potassium acetate, extracted with an equal volume of water-saturated phenol, extracted twice with an equal volume of chloroform-isoamyl alcohol (24:1), and then ethanol precipitated overnight at -20°C. The RNA pellets from the ethanol precipitations were resuspended in 20 µl nuclease-free water. RNA was reverse transcribed with the Superscript III kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacture's instructions. In brief, 4.6 µl of the resuspended Ded1, pre-immune IgG pull-downs, and 0.5 µg of total yeast RNA were combined with 1 pmole of the 3' primers specific for SCR1, PGK1 or RPL20B RNAs (**Supplementary Table 1**). The reactions were heated to 50°C for 5 min and then 10 mM DTT, 0.75 µl of Superscript III Reverse Transcriptase (RT), 1X final of RT buffer and 3 mM final of dNTPs were added. The reactions were incubated for 90 min at 50°C. The RNAs were hydrolyzed by adding 40 µl of a solution with 150 mM KOH, 20 mM Tris-base and incubating at 90°C for 10 min. The solution was neutralized by adding 40 µl of 150 mM HCl. The PCR amplification was performed with 10 µl of the reverse transcriptase product in a 50 µl PCR mix containing 1 unit of Phusion High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs, Évry-Courcouronnes, France), 1X HF Phusion buffer, 0.2 mM dNTPs, and 0.5 pmoles of the respective gene-specific 5' and 3' primers (**Supplementary Table 1**). PCR reactions were done for 25 cycles in a Bio-Rad T100 Thermal Cycler. PCR products were purified with a NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), eluted with 50 µl elution buffer and 5 µl aliquots were analyzed with agarose loading buffer on a 2% agarose gel containing ethidium bromide

***In vitro* RNA-dependent ATPase activities**

The ATPase assays were based on a colorimetric assay using molybdate-Malachite green as previously described (46). We typically used 23 nM of SCR1 or actin RNA and 0.14 µg/µl of whole yeast RNA (Roche) that was purified on a DEAE-Sepharose column to remove inhibitors. For the latter RNA, fractions from an elution with increasing concentrations of NaCl were assayed with purified Ded1, and the most active fractions were combined,

concentrated by ethanol precipitation and subsequently used in the assays. The poly(A) RNA was from Sigma. Assays were performed in a reaction mix with 20 mM Tris-base, pH 7.5, 50 mM potassium acetate, 5 mM magnesium acetate, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, and 2 mM DTT. Purified proteins and RNAs were pre-incubated for 30 min at 30°C to equilibrate the different components. We used the Ded1-K192A (GAT) mutant in motif I as a negative control as it had no detectable ATPase activity (46). Reactions were started by adding 1 mM final of ATP and taking aliquots over the time course. The reactions were stopped by making the solutions approximately 60 mM final in EDTA. The Malachite green solution was added as previously described (46) and the absorption measured with a Tecan NanoQuant Infinite M200Pro microtiter plate reader at 630 nm. Enzymatic reaction velocities were determined by a linear regression fit over the initial linear phase of the reaction with five data points over a time course of 45 min using optimized protein concentrations. We used a serial dilution of Phosphate Phosphorous Standard for IC (Fluka Sigma-Aldrich) for each experiment to determine the corresponding phosphate concentration from the absorption. Experimental data were analyzed with Kaleidagraph 4.5.2 software (Synergy, Reading PA).

Electrophoretic mobility-shift assays

An EMSA-agarose technique was used as previously described with minor modifications (96). Briefly, the assay were performed with 0.150 μM SCR1 or actin RNA and variable concentrations of the indicated proteins, which were incubated together in 1X EMSA buffer (20 mM Tris-base, pH 8.8, 70 mM KOAc, 2 mM MgCl_2 , 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA, 1 mM DTT) for 15 min at 30°C in the presence or absence of 5 mM AMP-PNP or ATP in a volume of 8 μl . Two μl of 30% glycerol was added to the samples, and they were loaded onto 0.75 mm thick, 1% agarose (Molecular Biology Grade) gels containing 1X TBE buffer (45 mM Tris-base, 45 mM boric acid, pH 8.8, and 2 mM EDTA; Sigma) and ~ 0.016 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide. Gels were run in a mini-plus horizontal electrophoresis (Scie-Plas) in 1X TBE buffer at 220V for ~ 13 min at 4°C and were imaged with a Gel Doc XR+ (Bio-RAD) and Quantity One 4.6.9 software (Bio-Rad).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Table 1. Oligonucleotides used in this study

| Name | Name oligo | Location | 5'—3' sequence ^a |
|----------------------|-----------------|----------|--|
| SCR1 RNA | SCR1_up2 | M1 | GCC TAT GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG <u>GGC TGT AAT GGC TTT CTG</u> <u>GT</u> |
| | SCR1_low | L26 | GCC TAT CTC GAG TTT AAA AAT ATG <u>GTT CAG GAC ACA CT</u> |
| SCR1ΔAlu RNA | SCR1ΔAlu_up | M36 | GCC TAT GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG <u>GGT CGT AAA TTT GTC CTG</u> <u>GGC A</u> |
| | SCR1ΔAlu_low | M35 | GCC TAT AAG CTT TTT AAA <u>ACC GCC</u> <u>AAA TTA AAC CGC</u> |
| SCR1ΔS1 RNA | pUC18_5' | M29 | <u>CCG TAT TAC CGC CTT TGA GTG</u> |
| | SCR1ΔS1_low | M31 | <u>CGC CTC CAT CAC GGG CGAA CCC</u> <u>GCA AAG ATC GAT TTA TTA TAG C</u> |
| | pUC18_3' | M30 | <u>GGT GTG AAA TAC CGC ACA GA</u> |
| | SCR1ΔS1_up | M32 | <u>ATC GAT CTT TGC GGG TTCG CCC</u> <u>GTG ATG GAG GCG G</u> |
| SCR1 (northern) | SCR1_Northern | L24 | ATA AAA CTC CCC TAA CAG CGG TGA |
| PGK1 (northern) | PGK1_357 | L67 | TCT TCG ATG TGG TAA CGC AAG TTT |
| RPL20B (northern) | RPL20B_Northern | M2 | CAG TAA CGA GAC TTG GCG ATG AC |
| SCR1 (RT-PCR) | SCR1_fwd | M5 | CAA ATC CTT CCT CGC GGC TA |
| | SCR1_rev | M6 | CGC CAA ATT AAA CCG CCG AA |
| PGK1 (RT-PCR) | PGK1_fwd | M9 | TTG GAA AAC TTG CGT TAC CAC |
| | PGK1_rev | M10 | CTG GCA AGA CGA CTT CGA CA |
| RPL20B (RT-PCR) | RPL20B_fwd | M13 | TTA CCA ACT GAA TCC GTT CCA |
| | RPL20B_ | M14 | GGT CTC TTG TAA GAG AAA GTC T |
| SRP14 | SRP14_up | L27 | GCC TAT ACT AGT CAT ATG GCA AAT <u>ACT GGC TGT TTA TCA</u> |
| | SRP14_low | L28 | GCC TAT CTC GAG <u>GTT TTT CTT CGC</u> <u>TAC CTT GT</u> |
| SRP21 | SRP21_up | L29 | GCC TAT ACT AGT CAT ATG TCT GTG <u>AAA CCC ATT GA</u> |
| | SRP21_low | L30 | GCC TAT CTC GAG <u>ACG CTT TTT TTT</u> <u>GCC CTT GT</u> |
| SEC65 | Sec65_up | L31 | GCC TAT ACT AGT CAT ATG CCT AGA <u>TTA GAA GAG ATT GA</u> |
| | Sec65_low | L32 | GCC TAT CTC GAG TCT TCT AAC TAC TTT GTA CTT ATT TTT TGG T |
| SEC65 (pET19b) | Sec65-pET_up | L69 | GCC TAT CTC GAG <u>ATG CCT AGA TTA</u> <u>GAA GAG ATT GAC GA</u> |
| | Sec65-pET_low | L70 | GCC TAT GGA TCC TCA TCT TCT AAC <u>TAC TTT GTA CTT AT</u> |
| SRP54 | SRP54_up | L74 | GCC TAT ACT AGT CAT ATG GTT TTG |

| | | | |
|--------------------------|-------------------------|-----|---|
| | | | <u>GCT GAT TTG GGG A</u> |
| | SRP74_low | L75 | GCC TAT CTC GAG <u>GCC CAT ACC GAA</u> <u>TTG TTT TGC CA</u> |
| SRP68 | SRP68_up | L76 | GCC TAT ACT AGT CAT ATG <u>GTT GCC</u> <u>TAT TCT CCA ATC</u> |
| | SRP68_low | L77 | GCC TAT CTC GAG <u>ACG ACC AAA TAG</u> <u>GCC CA</u> |
| SRP68 (pET19b) | SRP68_up2 | L78 | GCC TAT CTC GAG <u>ATG GTT GCC TAT</u> <u>TCT CCA ATC</u> |
| | SRP68_low2 | L79 | GCC TAT GGA TCC <u>ACG ACC AAA TAG</u> <u>GCC CA</u> |
| SRP72 | SRP72_up | L80 | GCC TAT ACT AGT CAT ATG <u>GCT AAA</u> <u>GAT AAT TTA ACT AAT TTG C</u> |
| | SRP72_low | L81 | GCC TAT CTC GAG <u>TTT ACG GCC CTT</u> <u>CTT CTT GT</u> |
| SRP101 | SRP101_up | M21 | GCC TAT GGA TCC CAT ATG <u>TTC GAC</u> <u>CAA TTA GCA GTC T</u> |
| | SRP101_low | M22 | GCC TAT CTC GAG <u>AGA CAT TAA TGT</u> <u>ATT AAC AGC CCA</u> |
| SRP102 | SRP102_up | M23 | GCC TAT GGA TCC CAT ATG <u>CTT AGT</u> <u>AAT ACA CTT ATT ATT GCC T</u> |
| | SRP102_low | M24 | GCC TAT CTC GAG <u>CAG TTT TTC ATC</u> <u>TAT CCA TTC GC</u> |
| SRP14 Δ 29Cter | P415HA_up | M37 | GCC TAT TCT AGA <u>ATG TAC CCA TAC</u> <u>GAC GTC C</u> |
| | SRP14_low | M38 | GCC TAT CTC GAG <u>TCA GTT TTT CTT</u> <u>CGC TAC CTT GT</u> |
| | SRP14 Δ 29_low | M39 | GCC TAT CTC GAG <u>TCA CAT GCC CCC</u> <u>CTT AAA TAC AG</u> |
| SRP21 Δ 73Cter | SRP21_low | M40 | GCC TAT CTC GAG <u>TTA ACG CTT TTT</u> <u>TTT GCC CT</u> |
| | SRP21 Δ 273_low | M41 | GCC TAT CTC GAG <u>TTA GTT ATT TTT</u> <u>CTT CTT CGA CTG TGC</u> |
| GFP & mCherry | GFP/mCherry_ XhoI-ed | J22 | GCC TAT CTC GAG <u>GGA GCA GGT GCT</u> <u>GGT</u> |
| | GFP/mCherry_ SalI-ed | J23 | GCC TAT GTC GAC TTA CTT <u>GTA CAG</u> <u>CTC GTC CA</u> |

^aThe oligonucleotides that were used are as shown, where the regions of complementarity are underlined and restriction sites are shown in bold.

Supplementary Table 2. Constructs used in this study

| Name | Description | Source or reference |
|----------------|--|---------------------|
| pMW295 | <i>SRP21-SRP71-SEC65 (URA3/2μ)</i> | (1) |
| pMW299 | <i>SCR1-SRP54-SRP68-SRP14 (LEU2/2μ)</i> | (1) |
| 2HA_p424 | <i>2HA, ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | (2) |
| 2HA-SRP14_p424 | <i>2HA-SRP14, ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | This study |

Résultats

| | | |
|--------------------------------------|---|--------------------|
| <i>2HA-SRP21_p424</i> | <i>2HA-SRP21,ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | This study |
| <i>2HA-SEC65_p424</i> | <i>2HA-SEC65,ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | This study |
| <i>2HA-SRP54_p424</i> | <i>2HA-SRP54,ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | This study |
| <i>2HA-SRP68_p424</i> | <i>2HA-SRP68,ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | This study |
| <i>2HA-SRP72_p424</i> | <i>2HA-SRP72,ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | This study |
| <i>2HA-SRP101_p424</i> | <i>2HA-SRP101,ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | This study |
| <i>2HA-SRP102_p424</i> | <i>2HA-SRP102,ADH/CYC1 (TRP1/2μ)</i> | This study |
| p413 | <i>ADH/CYC1 (HIS3/CEN)</i> | ATCC (#87370) |
| <i>2HA-SRP14Δ29Cter_p413</i> | <i>2HA-SRP14Δ29Cter,ADH/CYC1 (HIS3/CEN)</i> | This study |
| <i>2HA-SRP21Δ73Cter_p413</i> | <i>2HA-SRP21Δ73Cter,ADH/CYC1 (HIS3/CEN)</i> | This study |
| <i>SRP14-GFP_p413</i> | <i>SRP14-GFP, ADH/CYC1 (HIS3/CEN)</i> | This study |
| <i>SRP21-GFP_p413</i> | <i>SRP21-GFP, ADH/CYC1 (HIS3/CEN)</i> | This study |
| pET22b | <i>6HIS (AMP)</i> | Novagen (#69744-3) |
| <i>SRP14_pET22b</i> | <i>SRP14-6HIS (AMP)</i> | This study |
| <i>SRP21_pET22b</i> | <i>SRP21-6HIS (AMP)</i> | This study |
| <i>SRP72_pET22b</i> | <i>SRP72-6HIS (AMP)</i> | This study |
| <i>SRP54_pET22b</i> | <i>SRP54-6HIS (AMP)</i> | This study |
| <i>SRP101_pET22b</i> | <i>SRP101-6HIS (AMP)</i> | This study |
| <i>SRP102_pET22b</i> | <i>SRP102-6HIS (AMP)</i> | This study |
| <i>SRP14Δ29Cter_pET22b</i> | <i>SRP14Δ29Cter-6HIS (AMP)</i> | This study |
| <i>SRP21Δ73Cter_pET22b</i> | <i>SRP21Δ73Cter-6HIS (AMP)</i> | This study |
| <i>DED1_pET22b</i> | <i>DED1-6HIS (AMP)</i> | (3) |
| <i>DED1-GAT_pET22b</i> | <i>ded1-GAT-6HIS (AMP)</i> | (4) |
| pET19b | <i>6HIS (AMP)</i> | Novagen (#69677-3) |
| <i>SEC65_pET19b</i> | <i>6HIS-SEC65 (AMP)</i> | This study |
| <i>SRP68_pET19b</i> | <i>6HIS-SRP68 (AMP)</i> | This study |
| p415 | <i>ADH/CYC1 (LEU2/CEN)</i> | ATCC (#87374) |
| <i>pYM27-EGFP-KanMX4</i> | <i>EGFP (KanMX4, AMP)</i> | Euroscarf (5) |
| <i>GFP_p415</i> | <i>GFP, ADH/CYC1 (LEU2/CEN)</i> | This study |
| <i>DED1-DQAD-GFP_p415</i> | <i>DED1-DQAD-GFP,ADH/CYC1 (LEU2/CEN)</i> | This study |
| <i>GPD-p415</i> | <i>GPD/CYC1 (LEU2/CEN)</i> | ATCC (87358) |
| <i>GPD-DED1_p415</i> | <i>GPD-DED1, GPD/CYC1 (LEU2/CEN)</i> | This study |
| <i>GPD-DED1-F162C_p415</i> | <i>GPD-DED1-F162C,GPD/CYC1 (LEU2/CEN)</i> | This study |
| <i>DED1_YCplac111</i> | <i>DED1 (LEU2/CEN)</i> | (6) |
| p416 | <i>ADH/CYC1 (URA3/CEN)</i> | ATCC (#87376) |
| <i>pFA6a-mCherry-NatNT2 (PFM699)</i> | <i>mCherry, (NatNT2, AMP)</i> | Addgene (74636)(7) |
| <i>MCHERRY_p416</i> | <i>mCherry, ADH/CYC1 (URA3/CEN)</i> | This study |
| <i>ded1-DQAD-mCh p416</i> | <i>DED1-DQAD-mCherry,ADH/CYC1 (URA3/CEN)</i> | This study |
| <i>KAR2-RFP_YIplac204</i> | <i>TKC-DsRedExpress2-HDEL,TPI/CYC1 (TRP1/Int)</i> | Addgene (#21770) |

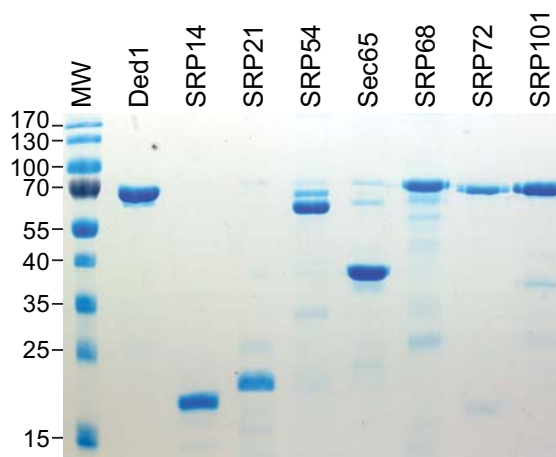
| | | |
|--------------------------|--|---------------|
| p414 | <i>ADH/CYC1 (TRP1/CEN)</i> | ATCC (#87372) |
| <i>DED1_p414</i> | <i>DED1, ADH/CYC1 (TRP1/CEN)</i> | This study |
| <i>ded1-F162C_p414</i> | <i>ded1-F162C, ADH/CYC1 (TRP1/CEN)</i> | This study |
| <i>T7-SCR1_pUC18</i> | <i>SCR1 (AMP)</i> | This study |
| <i>T7-SCR1ΔAlu_pUC18</i> | <i>SCR1ΔAlu (AMP)</i> | This study |
| <i>T7-SCR1ΔS1_pUC18</i> | <i>SCR1ΔS1 (AMP)</i> | This study |
| <i>T7-Actin_BS</i> | <i>preACTIN (AMP)</i> | (8) |

Supplementary Table 3. Yeast and bacterial strains used in this study

| Name | Strain | Genotype | Source or reference |
|---------------------------------|-----------------|---|-------------------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | | | |
| BY4742 | BY4742 | <i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 lys2Δ1</i> | Euroscarf |
| G50 | W303 corrected | <i>MATα ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 can1-100 RAD5 ADE2</i> | Gift from M. Lisby and R. Rothstein |
| <i>TET-SRP21</i> | TH_4909 | <i>pSRP21::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA MATa his3-1 leu2-0 met15-0</i> | Dharmacon |
| <i>TET-SRP14</i> | TH_4306 | <i>pSRP14::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA MATa his3-1 leu2-0 met15-0</i> | Dharmacon |
| <i>TET-SEC65</i> | TH_6981 | <i>pSEC65::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA MATa his3-1 leu2-0 met15-0</i> | Dharmacon |
| <i>TET-SRP68</i> | TH_3180 | <i>pSRP68::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA MATa his3-1 leu2-0 met15-0</i> | Dharmacon |
| <i>TET-SRP72</i> | TH_3294 | <i>pSRP72::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA MATa his3-1 leu2-0 met15-0</i> | Dharmacon |
| <i>TET-SRP101</i> | TH_7193 | <i>pSRP101::kanR-tet07-TATA URA3::CMV-tTA MATa his3-1 leu2-0 met15-0</i> | Dharmacon |
| <i>GFP-SRP14</i> | BY4741 | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SRP14-GFP::HIS3MX6</i> | Life Technologies |
| <i>GFP-SRP21</i> | BY4741 | <i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 SRP21-GFP::HIS3MX7</i> | Life Technologies |
| <i>xpo1-T539C</i> | MNY8 | <i>MATa, ΔCRM1::KANr leu2- his3- trp1- ura3- < pDC-XPO1T539C-LEU2/CEN ></i> | (9) |
| <i>ded1Δ</i> | W303 | <i>MATa ura3-1 ade2-1 leu2-3,112 trp1-1 DED1/ded1::HIS3MX6 <Ded1/yCPlac33-ura3></i> | (3) |
| <i>sec61-ts</i> | RDM 15-5B | <i>MATα sec61-2, pep4-3, ura3-52, leu2-3,-112, ade2-1</i> | (10) |
| <i>sec62-ts</i> | RDM 50-94C | <i>MATα sec62-1, ura3-52, leu2-3,112, his4, suc+/-</i> | (10) |
| <i>KAR2-RFP in sec61-ts</i> | <i>sec61-ts</i> | <i>MATα sec61-2, pep4-3, ura3-52, leu2-3,-112, ade2-1 trp1-1::DsRedExpress2-HDEL-TRP</i> | This study |
| <i>KAR2-RFP in sec62-ts</i> | <i>sec62-ts</i> | <i>MATα sec62-1, ura3-52, leu2-3,112, his4, suc+/- trp1-1::DsRedExpress2-HDEL-TRP</i> | This study |

Résultats

| | | | |
|-------------------------|----------------------|--|-------------------------------------|
| <i>G49</i> | W303 corrected | <i>MATa ura3-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 can1-100 RAD5 ADE2</i> | Gift from M. Lisby and R. Rothstein |
| <i>KAR2-RFP in G49</i> | W303 corrected (G49) | <i>MATa ura3-1trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 can1-100 RAD5 ADE2 trp1-1::DsRedExpress2-HDEL-TRP</i> | This study |
| <i>Escherichia coli</i> | | | |
| Rosetta (DE3) | 70954 | <i>F- ompT hsdSB(rB- mB-) gal dcm</i> | Novagen |
| DH5 α | DH5 α | <i>Fϕ80lacZAM15Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r$_K^-$, m$_K^+$) phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1</i> | New England Biolabs |



Supplementary Figure 1. Purified His-tagged recombinant proteins. Aliquots of 1.3 μ g of proteins purified on a Ni-NTA column were electrophoretically separated on a 12% PAGE and stained with Coomassie blue.

REFERENCES

1. Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K. and Linder, P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, **367**, 17-37. 10.1016/j.gene.2005.10.019
2. Linder, P. and Jankowsky, E. (2011) From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 505-516. 10.1038/nrm3154
3. Putnam, A.A. and Jankowsky, E. (2013) DEAD-box helicases as integrators of RNA, nucleotide and protein binding. *Biochim Biophys Acta*, **1829**, 884-893. 10.1016/j.bbagr.2013.02.002
4. Byrd, A.K. and Raney, K.D. (2012) Superfamily 2 helicases. *Front Biosci (Landmark Ed)*, **17**, 2070-2088. 10.2741/4038
5. Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P. and Jankowsky, E. (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol*, **20**, 313-324. 10.1016/j.sbi.2010.03.011
6. Raj, S., Bagchi, D., Orero, J.V., Banroques, J., Tanner, N.K. and Croquette, V. (2019) Mechanistic characterization of the DEAD-box RNA helicase Ded1 from yeast as revealed by a novel technique using single-molecule magnetic tweezers. *Nucleic Acids Res*, **47**, 3699-3710. 10.1093/nar/gkz057
7. Ozgur, S., Buchwald, G., Falk, S., Chakrabarti, S., Prabu, J.R. and Conti, E. (2015) The conformational plasticity of eukaryotic RNA-dependent ATPases. *FEBS J*, **282**, 850-863. 10.1111/febs.13198
8. Liu, F., Putnam, A.A. and Jankowsky, E. (2014) DEAD-box helicases form nucleotide-dependent, long-lived complexes with RNA. *Biochemistry*, **53**, 423-433. 10.1021/bi401540q
9. Sharma, D. and Jankowsky, E. (2014) The Ded1/DDX3 subfamily of DEAD-box RNA helicases. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **49**, 343-360. 10.3109/10409238.2014.931339
10. Chang, T.C. and Liu, W.S. (2010) The molecular evolution of PL10 homologs. *BMC Evol Biol*, **10**, 127. 10.1186/1471-2148-10-127
11. Tarn, W.Y. and Chang, T.H. (2009) The current understanding of Ded1p/DDX3 homologs from yeast to human. *RNA Biol*, **6**, 17-20. 10.4161/rna.6.1.7440
12. Rosner, A. and Rinkevich, B. (2007) The DDX3 subfamily of the DEAD box helicases: divergent roles as unveiled by studying different organisms and *in vitro* assays. *Curr Med Chem*, **14**, 2517-2525. 10.2174/092986707782023677
13. Senissar, M., Le Saux, A., Belgareh-Touze, N., Adam, C., Banroques, J. and Tanner, N.K. (2014) The DEAD-box helicase Ded1 from yeast is an mRNP cap-associated protein that shuttles between the cytoplasm and nucleus. *Nucleic Acids Res*, **42**, 10005-10022. 10.1093/nar/gku584
14. Gupta, N., Lorsch, J.R. and Hinnebusch, A.G. (2018) Yeast Ded1 promotes 48S translation pre-initiation complex assembly in an mRNA-specific and eIF4F-dependent manner. *Elife*, **7**. 10.7554/eLife.38892

15. Dever, T.E., Kinzy, T.G. and Pavitt, G.D. (2016) Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **203**, 65-107. 10.1534/genetics.115.186221
16. Gulay, S., Gupta, N., Lorsch, J.R. and Hinnebusch, A.G. (2020) Distinct interactions of eIF4A and eIF4E with RNA helicase Ded1 stimulate translation *in vivo*. *Elife*, **9**. 10.7554/eLife.58243
17. Aryanpur, P.P., Regan, C.A., Collins, J.M., Mittelmeier, T.M., Renner, D.M., Vergara, A.M., Brown, N.P. and Bolger, T.A. (2017) Gle1 Regulates RNA Binding of the DEAD-Box Helicase Ded1 in Its Complex Role in Translation Initiation. *Mol Cell Biol*, **37**. 10.1128/mcb.00139-17
18. Hauk, G. and Bowman, G.D. (2015) Formation of a Trimeric Xpo1-Ran[GTP]-Ded1 Exportin Complex Modulates ATPase and Helicase Activities of Ded1. *PLoS One*, **10**, e0131690. 10.1371/journal.pone.0131690
19. Ivanov, P., Kedersha, N. and Anderson, P. (2019) Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **11**. 10.1101/cshperspect.a032813
20. Youn, J.Y., Dyakov, B.J.A., Zhang, J., Knight, J.D.R., Vernon, R.M., Forman-Kay, J.D. and Gingras, A.C. (2019) Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes. *Mol Cell*, **76**, 286-294. 10.1016/j.molcel.2019.09.014
21. Guzikowski, A.R., Chen, Y.S. and Zid, B.M. (2019) Stress-induced mRNP granules: Form and function of processing bodies and stress granules. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **10**, e1524. 10.1002/wrna.1524
22. Hondele, M., Sachdev, R., Heinrich, S., Wang, J., Vallotton, P., Fontoura, B.M.A. and Weis, K. (2019) DEAD-box ATPases are global regulators of phase-separated organelles. *Nature*, **573**, 144-148. 10.1038/s41586-019-1502-y
23. Soto-Rifo, R. and Ohlmann, T. (2013) The role of the DEAD-box RNA helicase DDX3 in mRNA metabolism. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **4**, 369-385. 10.1002/wrna.1165
24. Spitzer, J., Hafner, M., Landthaler, M., Ascano, M., Farazi, T., Wardle, G., Nusbaum, J., Khorshid, M., Burger, L., Zavolan, M. *et al.* (2014) PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation): a step-by-step protocol to the transcriptome-wide identification of binding sites of RNA-binding proteins. *Methods Enzymol*, **539**, 113-161. 10.1016/b978-0-12-420120-0.00008-6
25. Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A.C., Munschauer, M. *et al.* (2010) Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, **141**, 129-141. 10.1016/j.cell.2010.03.009
26. Rapoport, T.A., Li, L. and Park, E. (2017) Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **33**, 369-390. 10.1146/annurev-cellbio-100616-060439
27. Wild, K., Becker, M.M.M., Kempf, G. and Sinning, I. (2019) Structure, dynamics and interactions of large SRP variants. *Biol Chem*, **401**, 63-80. 10.1515/hsz-2019-0282

28. Cui, X.A. and Palazzo, A.F. (2014) Localization of mRNAs to the endoplasmic reticulum. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **5**, 481-492. 10.1002/wrna.1225
29. Akopian, D., Shen, K., Zhang, X. and Shan, S.O. (2013) Signal recognition particle: an essential protein-targeting machine. *Annu Rev Biochem*, **82**, 693-721. 10.1146/annurev-biochem-072711-164732
30. Pool, M.R. (2005) Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (review). *Mol Membr Biol*, **22**, 3-15. 10.1080/09687860400026348
31. Rosenblad, M.A., Larsen, N., Samuelsson, T. and Zwieb, C. (2009) Kinship in the SRP RNA family. *RNA Biol*, **6**, 508-516. 10.4161/rna.6.5.9753
32. Massenet, S. (2019) *In vivo* assembly of eukaryotic signal recognition particle: A still enigmatic process involving the SMN complex. *Biochimie*, **164**, 99-104. 10.1016/j.biochi.2019.04.007
33. Zwieb, C., van Nues, R.W., Rosenblad, M.A., Brown, J.D. and Samuelsson, T. (2005) A nomenclature for all signal recognition particle RNAs. *RNA*, **11**, 7-13. 10.1261/rna.7203605
34. Van Nues, R.W. and Brown, J.D. (2004) *Saccharomyces* SRP RNA secondary structures: a conserved S-domain and extended Alu-domain. *RNA*, **10**, 75-89. 10.1261/rna.5137904
35. Nyathi, Y., Wilkinson, B.M. and Pool, M.R. (2013) Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*, **1833**, 2392-2402. 10.1016/j.bbamcr.2013.02.021
36. Strub, K., Fornallaz, M. and Bui, N. (1999) The Alu domain homolog of the yeast signal recognition particle consists of an Srp14p homodimer and a yeast-specific RNA structure. *RNA*, **5**, 1333-1347. 10.1017/s1355838299991045
37. Mason, N., Ciufo, L.F. and Brown, J.D. (2000) Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *EMBO J*, **19**, 4164-4174. 10.1093/emboj/19.15.4164
38. Rosenblad, M.A., Zwieb, C. and Samuelsson, T. (2004) Identification and comparative analysis of components from the signal recognition particle in protozoa and fungi. *BMC Genomics*, **5**, 5. 10.1186/1471-2164-5-5
39. Halic, M., Becker, T., Pool, M.R., Spahn, C.M., Grassucci, R.A., Frank, J. and Beckmann, R. (2004) Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature*, **427**, 808-814. 10.1038/nature02342
40. Bousset, L., Mary, C., Brooks, M.A., Scherrer, A., Strub, K. and Cusack, S. (2014) Crystal structure of a signal recognition particle Alu domain in the elongation arrest conformation. *RNA*, **20**, 1955-1962. 10.1261/rna.047209.114
41. Wild, K., Juare, K.D., Soni, K., Shanmuganathan, V., Hendricks, A., Segnitz, B., Beckmann, R. and Sinning, I. (2019) Reconstitution of the human SRP system and quantitative and systematic analysis of its ribosome interactions. *Nucleic Acids Res*, **47**, 3184-3196. 10.1093/nar/gky1324

42. Ho, B., Baryshnikova, A. and Brown, G.W. (2018) Unification of Protein Abundance Datasets Yields a Quantitative *Saccharomyces cerevisiae* Proteome. *Cell Syst*, **6**, 192-205.e193. 10.1016/j.cels.2017.12.004
43. Guenther, U.P., Weinberg, D.E., Zubradt, M.M., Tedeschi, F.A., Stawicki, B.N., Zagore, L.L., Brar, G.A., Licatalosi, D.D., Bartel, D.P., Weissman, J.S. *et al.* (2018) The helicase Ded1p controls use of near-cognate translation initiation codons in 5' UTRs. *Nature*, **559**, 130-134. 10.1038/s41586-018-0258-0
44. Willer, M., Jermy, A.J., Steel, G.J., Garside, H.J., Carter, S. and Stirling, C.J. (2003) An *in vitro* assay using overexpressed yeast SRP demonstrates that cotranslational translocation is dependent upon the J-domain of Sec63p. *Biochemistry*, **42**, 7171-7177. 10.1021/bi034395l
45. Ciufu, L.F. and Brown, J.D. (2000) Nuclear export of yeast signal recognition particle lacking Srp54p by the Xpo1p/Crm1p NES-dependent pathway. *Curr Biol*, **10**, 1256-1264. 10.1016/s0960-9822(00)00743-0
46. Cordin, O., Tanner, N.K., Doere, M., Linder, P. and Banroques, J. (2004) The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity. *EMBO J*, **23**, 2478-2487. 10.1038/sj.emboj.7600272
47. Brown, J.D., Hann, B.C., Medzihradzsky, K.F., Niwa, M., Burlingame, A.L. and Walter, P. (1994) Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *EMBO J*, **13**, 4390-4400.
48. Hann, B.C. and Walter, P. (1991) The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell*, **67**, 131-144. 10.1016/0092-8674(91)90577-1
49. Stirling, C.J. and Hewitt, E.W. (1992) The *S. cerevisiae* *SEC65* gene encodes a component of yeast signal recognition particle with homology to human SRP19. *Nature*, **356**, 534-537. 10.1038/356534a0
50. Ogg, S.C., Poritz, M.A. and Walter, P. (1992) Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **3**, 895-911. 10.1091/mbc.3.8.895
51. Mutka, S.C. and Walter, P. (2001) Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Mol Biol Cell*, **12**, 577-588. 10.1091/mbc.12.3.577
52. Hughes, T.R., Marton, M.J., Jones, A.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Armour, C.D., Bennett, H.A., Coffey, E., Dai, H., He, Y.D. *et al.* (2000) Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*, **102**, 109-126. 10.1016/s0092-8674(00)00015-5
53. Beckham, C., Hilliker, A., Cziko, A.M., Noueiry, A., Ramaswami, M. and Parker, R. (2008) The DEAD-box RNA helicase Ded1p affects and accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* P-bodies. *Mol Biol Cell*, **19**, 984-993. 10.1091/mbc.e07-09-0954
54. Banroques, J., Cordin, O., Doère, M., Linder, P. and Tanner, N.K. (2011) Analyses of the functional regions of DEAD-box RNA "helicases" with deletion and chimera constructs tested *in vivo* and *in vitro*. *J Mol Biol*, **413**, 451-472. 10.1016/j.jmb.2011.08.032

55. Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, **156**, 119-122. 10.1016/0378-1119(95)00037-7
56. Chuang, R.Y., Weaver, P.L., Liu, Z. and Chang, T.H. (1997) Requirement of the DEAD-Box protein Ded1p for messenger RNA translation. *Science*, **275**, 1468-1471. 10.1126/science.275.5305.1468
57. Beckham, C., Hilliker, A., Cziko, A.M., Noueiry, A., Ramaswami, M. and Parker, R. (2012) Erratum: The DEAD-box RNA helicase Ded1p affects and accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* P-bodies. *Mol Biol Cell*, **23**, 2818.
58. Iserman, C., Desroches Altamirano, C., Jegers, C., Friedrich, U., Zarin, T., Fritsch, A.W., Mittasch, M., Domingues, A., Hersemann, L., Jahnel, M. *et al.* (2020) Condensation of Ded1p Promotes a Translational Switch from Housekeeping to Stress Protein Production. *Cell*, **181**, 818-831.e819. 10.1016/j.cell.2020.04.009
59. Deshaies, R.J. and Schekman, R. (1987) A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **105**, 633-645. 10.1083/jcb.105.2.633
60. Deshaies, R.J. and Schekman, R. (1989) SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **109**, 2653-2664. 10.1083/jcb.109.6.2653
61. Nishikawa, S.I., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L. and Endo, T. (2001) Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol*, **153**, 1061-1070. 10.1083/jcb.153.5.1061
62. West, M., Zurek, N., Hoenger, A. and Voeltz, G.K. (2011) A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol*, **193**, 333-346. 10.1083/jcb.201011039
63. Babu, M., Vlasblom, J., Pu, S., Guo, X., Graham, C., Bean, B.D., Burston, H.E., Vizeacoumar, F.J., Snider, J., Phanse, S. *et al.* (2012) Interaction landscape of membrane-protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **489**, 585-589. 10.1038/nature11354
64. Wild, K. and Sinning, I. (2014) RNA gymnastics in mammalian signal recognition particle assembly. *RNA Biol*, **11**, 1330-1334. 10.1080/15476286.2014.996457
65. Leung, E. and Brown, J.D. (2010) Biogenesis of the signal recognition particle. *Biochem Soc Trans*, **38**, 1093-1098. 10.1042/bst0381093
66. Grosshans, H., Deinert, K., Hurt, E. and Simos, G. (2001) Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *J Cell Biol*, **153**, 745-762. 10.1083/jcb.153.4.745
67. Baßler, J. and Hurt, E. (2019) Eukaryotic Ribosome Assembly. *Annu Rev Biochem*, **88**, 281-306. 10.1146/annurev-biochem-013118-110817
68. Yedavalli, V.S., Neuveut, C., Chi, Y.H., Kleiman, L. and Jeang, K.T. (2004) Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell*, **119**, 381-392. 10.1016/j.cell.2004.09.029

69. Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1994) Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem*, **269**, 6320-6324.
70. Neville, M. and Rosbash, M. (1999) The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*, **18**, 3746-3756. 10.1093/emboj/18.13.3746
71. Hann, B.C., Stirling, C.J. and Walter, P. (1992) SEC65 gene product is a subunit of the yeast signal recognition particle required for its integrity. *Nature*, **356**, 532-533. 10.1038/356532a0
72. Iost, I., Dreyfus, M. and Linder, P. (1999) Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem*, **274**, 17677-17683. 10.1074/jbc.274.25.17677
73. Banroques, J., Cordin, O., Doère, M., Linder, P. and Tanner, N.K. (2008) A conserved phenylalanine of motif IV in superfamily 2 helicases is required for cooperative, ATP-dependent binding of RNA substrates in DEAD-box proteins. *Mol Cell Biol*, **28**, 3359-3371. 10.1128/mcb.01555-07
74. Valentin-Vega, Y.A., Wang, Y.D., Parker, M., Patmore, D.M., Kanagaraj, A., Moore, J., Rusch, M., Finkelstein, D., Ellison, D.W., Gilbertson, R.J. *et al.* (2016) Cancer-associated DDX3X mutations drive stress granule assembly and impair global translation. *Sci Rep*, **6**, 25996. 10.1038/srep25996
75. Schäfer, T., Strauss, D., Petfalski, E., Tollervey, D. and Hurt, E. (2003) The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *EMBO J*, **22**, 1370-1380. 10.1093/emboj/cdg121
76. Mayr, C. (2019) What Are 3' UTRs Doing? *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **11**. 10.1101/cshperspect.a034728
77. Chartron, J.W., Hunt, K.C. and Frydman, J. (2016) Cotranslational signal-independent SRP preloading during membrane targeting. *Nature*, **536**, 224-228. 10.1038/nature19309
78. Voorhees, R.M. and Hegde, R.S. (2016) Toward a structural understanding of co-translational protein translocation. *Curr Opin Cell Biol*, **41**, 91-99. 10.1016/j.ceb.2016.04.009
79. Wolin, S.L. and Walter, P. (1989) Signal recognition particle mediates a transient elongation arrest of preprolactin in reticulocyte lysate. *J Cell Biol*, **109**, 2617-2622. 10.1083/jcb.109.6.2617
80. Flores, J.K. and Ataide, S.F. (2018) Structural Changes of RNA in Complex with Proteins in the SRP. *Front Mol Biosci*, **5**, 7. 10.3389/fmolb.2018.00007
81. Voorhees, R.M. and Hegde, R.S. (2015) Structures of the scanning and engaged states of the mammalian SRP-ribosome complex. *Elife*, **4**. 10.7554/eLife.07975
82. Collart, M.A. and Weiss, B. (2020) Ribosome pausing, a dangerous necessity for co-translational events. *Nucleic Acids Res*, **48**, 1043-1055. 10.1093/nar/gkz763
83. Dever, T.E., Dinman, J.D. and Green, R. (2018) Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **10**. 10.1101/cshperspect.a032649

84. Tinoco, I., Jr., Kim, H.K. and Yan, S. (2013) Frameshifting dynamics. *Biopolymers*, **99**, 1147-1166. 10.1002/bip.22293
85. Chong, J.L., Chuang, R.Y., Tung, L. and Chang, T.H. (2004) Ded1p, a conserved DExD/H-box translation factor, can promote yeast L-A virus negative-strand RNA synthesis *in vitro*. *Nucleic Acids Res*, **32**, 2031-2038. 10.1093/nar/gkh519
86. Wickner, R.B. (1996) Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **60**, 250-265.
87. Farabaugh, P.J. (1996) Programmed translational frameshifting. *Annu Rev Genet*, **30**, 507-528. 10.1146/annurev.genet.30.1.507
88. Itano, M.S., Arnion, H., Wolin, S.L. and Simon, S.M. (2018) Recruitment of 7SL RNA to assembling HIV-1 virus-like particles. *Traffic*, **19**, 36-43. 10.1111/tra.12536
89. Schmidt, M.O., Brosh, R.M., Jr. and Oliver, D.B. (2001) *Escherichia coli* SecA helicase activity is not required *in vivo* for efficient protein translocation or autogenous regulation. *J Biol Chem*, **276**, 37076-37085. 10.1074/jbc.M104584200
90. Wang, S., Jomaa, A., Jaskolowski, M., Yang, C.I., Ban, N. and Shan, S.O. (2019) The molecular mechanism of cotranslational membrane protein recognition and targeting by SecA. *Nat Struct Mol Biol*, **26**, 919-929. 10.1038/s41594-019-0297-8
91. Knüpfper, L., Fehrenbach, C., Denks, K., Erichsen, V., Petriman, N.A. and Koch, H.G. (2019) Molecular Mimicry of SecA and Signal Recognition Particle Binding to the Bacterial Ribosome. *mBio*, **10**. 10.1128/mBio.01317-19
92. Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M. and Linder, P. (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell*, **11**, 127-138. 10.1016/s1097-2765(03)00006-6
93. Lin, R.J., Newman, A.J., Cheng, S.C. and Abelson, J. (1985) Yeast mRNA splicing *in vitro*. *J Biol Chem*, **260**, 14780-14792.
94. Guthrie, C. and Fink, G.R. (eds.) (1991) *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Academic Press, San Diego.
95. Carpousis, A.J., Khemici, V., Ait-Bara, S. and Poljak, L. (2008) Co-immunopurification of multiprotein complexes containing RNA-degrading enzymes. *Methods Enzymol*, **447**, 65-82. 10.1016/s0076-6879(08)02204-0
96. Ream, J.A., Lewis, L.K. and Lewis, K.A. (2016) Rapid agarose gel electrophoretic mobility shift assay for quantitating protein: RNA interactions. *Anal Biochem*, **511**, 36-41. 10.1016/j.ab.2016.07.027
97. Christiano, R., Nagaraj, N., Frohlich, F. and Walther, T.C. (2014) Global proteome turnover analyses of the Yeasts *S. cerevisiae* and *S. pombe*. *Cell Rep*, **9**, 1959-1965. 10.1016/j.celrep.2014.10.065

Discussions et perspectives

Plus tard ce sera trop tard
Notre vie c'est maintenant
Jacques Prévert

Choix d'une approche pour la détection des substrats ARN associés à Ded1

Durant ma thèse, j'ai cherché à mieux comprendre le rôle de Ded1 en identifiant les ARN qui lui sont associés. Le but initial a été d'utiliser une technique de *crosslink* d'ARN adapté à mon projet.

Alors que de nombreuses études basées sur la réticulation UV émergent continuellement, la mise en pratique de ces méthodes présente des défis techniques d'un point de vue de l'efficacité, du rendement ou du temps qui y est consacré. Les deux approches majeures qui ont largement été adoptées pour l'identification précise des sites de liaison d'une protéine sur l'ARN utilisent des UV-A et C. Nous avons comparé ces deux longueurs d'onde et avons montré que les UV-C nuisent à la croissance cellulaire et déstabilisent les protéines, contrairement aux UV-A, ce qui peut conduire à un bruit de fond lors des expériences de CLIP. Nous avons conclu que la réticulation UV standard à 254 nm peut affecter l'interprétation des résultats en aval. Cette limite nous a conduits à utiliser une méthode alternative pour stabiliser les interactions ARN-protéines, en élargissant la portée des interactions ARN-protéines susceptible d'être capturées.

Pour cela, nous avons utilisé une variante du CLIP, le PAR-CLIP. Nous avons montré que le marquage de l'ARN par un analogue photoactivable n'affecte pas la culture et la croissance cellulaire. Cette technique est connue pour avoir un rendement de récupération des complexes ARN-protéine plus élevé par rapport à la réticulation standard (Hafner et al., 2010). Nous lui avons apportée des modifications majeures afin de l'adapter au système chez la levure, et surtout apporté une touche de rapidité et commodité. Les résultats de notre étude ont montré que Ded1 se fixe sur toutes les classes d'ARN, avec 84% du *crosslink* sur des ARNm. De façon intéressante, nous avons montré que Ded1 se lie sur seulement 50% des ARNm totaux. Cependant, au cours de ma thèse, un autre laboratoire a montré que Ded1 se fixe sur tous les ARNm. Or, cette étude a été réalisée avec une technique de CLIP standard à 254 nm. L'énergie qui a été utilisée était de 600 mJ/cm², ce qui correspond à environ 5 minutes d'irradiation. Il a été montré qu'une telle énergie peut provoquer un *crosslink* inter- et intramoléculaires (Pashev *et al.*, 1991a), et peut augmenter la réticulation de plusieurs protéines, risquant ainsi la co-purification d'ARN contaminants (Lee and Ule, 2018) ; ce qui augmente le risque d'avoir un artefact expérimental. De plus, nous avons montré que Ded1 est très rapidement dégradée à 254 nm, *in vivo* et *in vitro*, suggérant que le travail qui avait été publié présente une limitation. D'ailleurs, il a été montré que la capture de l'interactome (RBP) était d'environ 12% avec le PAR-CLIP et de deux fois plus (24%) avec le CLIP (Castello *et al.*, 2012) ; ce qui pourrait également expliquer pourquoi nous avons seulement 50% de *crosslink* sur tous les ARNm existant chez la levure. Ceci dit, il ne faut pas écarter le fait que l'utilisation du 4TU ne limite le *crosslink* qu'à une seule base, et par conséquent

l'efficacité de réticulation peut dépendre de la proximité du 4TU avec le site de liaison de la protéine. De plus, les ARN avec un taux de renouvellement élevé peuvent être surreprésentés en raison d'une plus grande incorporation du 4TU sur une courte échelle de temps.

Il serait également intéressant d'effectuer le même type d'analyse en supprimant temporairement l'expression de Ded1 par la doxycycline et vérifier l'impact que ceci peut avoir sur les substrats de Ded1. Même si Ded1 est essentielle, il est connu qu'une suppression temporaire entraîne une inhibition de la traduction, avec un effondrement des polysomes, et de la formation des foci cellulaires (Chuang et al., 1997, de la Cruz *et al.*, 1999, Beckham et al., 2008). L'analyse des ARN obtenus pourrait compléter nos données. De plus, il serait intéressant de comparer les niveaux de protéines produites par les ARNm ciblés par ded1 en conditions +/- doxycycline ; les résultats donneront une indication sur la régulation de la traduction par Ded1. Il a été montré, par ce genre d'expériences, que DDX3X régule positivement l'expression de ces ARNm au niveau de la traduction (Valentin-Vega et al., 2016).

En parallèle, une autre étude fondamentale serait d'identifier quelle partie de Ded1 se lie sur l'ARN, *in vivo*. En effet, les techniques de CLIP fournissent des informations sur les acides nucléiques qui entrent en contact avec une protéine spécifique, mais elles ont également le potentiel d'être couplées avec la spectrométrie de masse (XLMS, *crosslinking mass spectrometry*) pour mieux définir les régions des protéines en contact avec les acides nucléiques (Rappsilber, 2011). La stratégie est simple : les protéines réticulées à l'ARN sont digérées par de la trypsine afin de donner des peptides, dont certains sont réticulés. Ce mélange est ensuite analysé par spectrométrie de masse et les données résultantes sont interprétées pour identifier les résidus de la protéine liée (James *et al.*, 2019).

Ded1 se fixe sur tous les ARN

Nos données de séquençage indiquent que Ded1 se fixe sur tous les types d'ARN. Concernant les ARNm et comme mentionné précédemment, Ded1 se fixe sur seulement 50% des transcrits présents dans la cellule. Bien que les techniques de crosslink donnent un aperçu globale des interactions entre ARN-protéine, le temps que nous avons utilisé est suffisamment long (20 min) pour écarter la possibilité d'une fixation à un instant t. Notre analyse montre que Ded1 se fixe sur un sous-ensemble d'ARNm, et principalement au niveau de la région codante mais aussi dans la région 3'UTR, suggérant que Ded1 pourrait également être liée avec les mécanismes d'élongation, de dégradation de l'ARNm ou encore être impliquée dans des interactions à longue distance dans la régulation de l'initiation de la traduction. Des études ont déjà été publiées sur le rôle important de Ded1 dans la résolution

de structures secondaires au niveau de la région 5'UTR de certains messagers (Sen et al., 2019, Guenther et al., 2018). Cependant, les seules études qui ont été réalisées pour tester les ARNm hypo- et hyperdependants de Ded1 reposent sur des systèmes de reconstitution de l'initiation de la traduction *in vitro* (Gupta et al., 2018). Ce genre d'étude ne reproduit pas nécessairement la situation observée *in vivo*. De plus, les ARNm rapporteurs utilisés dans ces tests sont constitués de la région 5'UTR et le début de la région codante de l'ARNm testé. Cependant, il est clair qu'il peut exister des éléments au sein de la région codante et du 3'UTR formant des interactions à longue distance qui confèreraient une dépendance à Ded1. Par exemple, nous avons précédemment montré que Ded1 interagit physiquement et génétiquement avec Pab1, protéine de liaison à la queue poly(A) dans le cytoplasme (Senissar et al., 2014). Il a été montré que cette protéine est impliquée dans la stimulation de la traduction via son association avec le facteur eIF4G et le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S (Dever et al., 2016). Dans ce genre de système reconstitué, ces éléments font défaut, ce qui pourrait conduire à une mauvaise interprétation des résultats. D'ailleurs, d'après nos données, très peu de *crosslink* a été obtenu au niveau des régions 5'UTR. Une explication à cela viendrait du fait que la vitesse de balayage du PIC 48S est assez rapide dans le 5'UTR, d'où le faible rendement de *crosslink* sur cette région (Berthelot et al., 2004).

Concernant les ARNr, nos données de *crosslink* indiquent que Ded1 se fixe en particulier sur l'ARNr 18S, et principalement sur l'hélice 16 se situant au niveau du canal d'entrée de l'ARNm. Ce résultat est en adéquation avec ce qui a été publié précédemment pour Ded1 et son orthologue humain (Guenther et al., 2018, Oh et al., 2016). Ded1 se fixe également sur l'ARNr 25S, principalement au début et au milieu de la séquence, et sur l'ARN 5,8S. Il serait intéressant de vérifier le lieu de fixation de Ded1 sur ces ARNr, comme nous l'avons déjà fait pour le 18S. Ceci renforcerait le constat que Ded1 se fixe sur le ribosome au moment de la traduction. Mais, comme mentionné dans l'introduction, il n'est pas exclu que Ded1 se fixe sur les ribosomes lors de la biogenèse des ARNr.

Concernant les MGE, environ 2% du *crosslink* se trouvait sur des ARN qui codent pour les protéines Gag/Gag-Pol des rétrotransposons à répétition terminale longue (Ty) ; ces derniers sont considérés comme les progéniteurs des rétrovirus (Krastanova *et al.*, 2014). Même si la duplication des *reads* était importante, rendant l'analyse compliquée, nous avons tout de même remarqué que Ded1 se fixe « beaucoup » sur ces ARN. De plus, il s'avère que la SRP est nécessaire à la traduction de l'ARN des Ty dans le RE et à la formation ultérieure de particules de type virus encapsulées (VLP) dans le cytoplasme (Curcio *et al.*, 2015). Au vu des résultats que nous avons obtenus avec la SRP (Article 2), il serait intéressant de vérifier si Ded1 est impliquée dans la traduction des protéines Gag/Gag-Pol, mais aussi vérifier si elle a un rôle dans la formation des VLP, en accord avec son rôle dans la formation de P-*bodies*. De

plus, il a été montré que Ded1 est impliquée dans la réplication du virus L-A de levure, mais aussi favorise la réplication de divers virus de plantes à ARN (Nagy, 2017, Chong *et al.*, 2004).

Ded1 impliquée dans la traduction de son propre messager ?

Nous avons montré que Ded1 se fixe sur son propre ARNm, dans la région codante probablement au moment de la traduction, mais aussi dans la région 3'UTR. De façon assez surprenante, une fixation assez importante se trouve sur des transcrits « longs » mais peu abondants au vu des données de transcriptomique. Plusieurs cas de figure sont possibles :

> Ded1 peut réguler la traduction de son propre transcrit en établissant un rétrocontrôle sur sa propre traduction. En effet, plusieurs études ont montré que la surexpression de Ded1 entraîne une diminution de la croissance cellulaire, de la synthèse protéique et une augmentation de foci cellulaires, suggérant que le niveau de Ded1 est soumis à un contrôle strict dans la cellule (Chuang *et al.*, 1997, Beckham *et al.*, 2008).

> Il est connu que la variation des produits de transcription peut donner naissance à des protéines tronquées avec des localisations subcellulaires et fonctions différentes. Le 3'UTR des isoformes plus long possède généralement des sites de liaison au RBP, suggérant que cet ARNm sera enclin à une régulation négative (Di Giammartino *et al.*, 2011). Il a été montré par exemple que la quantité de protéine générée par un ARNm dépend de sa longueur 3'UTR, de sorte que les transcrits avec des 3'UTR plus courts produisent des niveaux plus élevés de protéines (Sandberg *et al.*, 2008) ; ceci est concordant avec les données de transcriptomique des transcrits de l'ARNm de Ded1 que nous avons obtenu.

> Par ailleurs, la liaison sur la région 3'UTR peut très bien se faire en dehors de la traduction : lors de la transcription. Afin de trouver des éléments de réponses, il serait judicieux de vérifier si les zones enrichies en *reads* font parties des zones de pause de l'ARN polymérase II (Churchman and Weissman, 2011, Steinmetz *et al.*, 2006).

> Ded1 peut conduire le long isoforme vers les voies de dégradation des messagers. Chez la levure, le dégradosome nucléaire TRAMP composé de plusieurs protéines, est impliqué dans la dégradation des ARNm. La promotion de l'activation de la voie de dégradation des ARNm, est obtenue au moins en partie, en augmentant l'accessibilité de la région 3' UTR par la résolution de structure. Ded1 interagit physiquement avec deux protéines de ce complexe, Air2 et Mtr4 (Ho *et al.*, 2002). Il serait tentant de spéculer que Ded1 serait impliquée dans la résolution des ARN pour accueillir le dégradosome et dégrader l'isoforme « longue » de son ARNm (Lee and Lykke-Andersen, 2013).

Fait intéressant, une étude globale chez la levure, sur la capture des régions des transcrits polyadénylés liés par des RBP, a montré des sites de liaison majeurs dans les régions 3'UTR. De façon surprenante, des analyses de génomique comparative ont montré que ces

sites sont hautement conservés entre espèces et sont surtout présents dans le 3'UTR de gènes qui régulent d'autres gènes, reflétant une régulation post-transcriptionnelle généralisée (Siepel *et al.*, 2005, Freeberg *et al.*, 2013). Plus surprenant encore, environ 38% des sites de liaison, au niveau de la région 3'UTR, ont montré des changements dans l'occupation des RBP en cas de carence en glucose (Freeberg *et al.*, 2013) ; c'est ce que nous avons observé pour le transcrit de Ded1. Il serait intéressant de vérifier si la région enrichie de *reads* dans le 3'UTR de Ded1 est conservée entre les espèces.

Absence de motif de liaison à l'ARN

Les RBP présentent en général des motifs ou des domaines de reconnaissance de l'ARN (Lunde *et al.*, 2007). Les motifs de liaison à l'ARN connus pour les protéines à boîte DEAD sont au niveau des domaines RecA, mais il a été montré que les contacts établis avec l'ARN se font sans reconnaissance de bases spécifiques (Bono *et al.*, 2006, Sengoku *et al.*, 2006). Beaucoup d'études montrent que la reconnaissance spécifique se fait à travers les régions N- et C-terminales ; régions qui, pour presque toutes les protéines à boîtes DEAD, sont intrinsèquement désordonnées (Cordin *et al.*, 2006, Banroques *et al.*, 2011). De plus, la région C-terminale de beaucoup de protéines à boîte DEAD, dont Ded1, est composée d'acides aminés riches en motifs RGG ; ce motif ressemble à une séquence de protéine conservée trouvée dans de nombreuses protéines de liaison à l'ARN et fonctionne comme un site de liaison à l'ARN et aux partenaires protéiques (Thandapani *et al.*, 2013, Rajyaguru *et al.*, 2012).

Tout d'abord, il a déjà été montré, par notre laboratoire et par d'autres, que la suppression d'une partie de l'extrémité C-terminale de Ded1 et de son orthologue humain DDX3X inhibe le déroulement de l'ARN *in vitro* suggérant que les protéines de la sous-famille Ded1/DDX3 se lie probablement sur l'ARN via leur domaine C-terminal (Floor *et al.*, 2016, Sharma *et al.*, 2017, Banroques *et al.*, 2008). Nous avons confirmé cette hypothèse en montrant que Ded1 se lie sur l'ARN (ici un ARN authentique SCR1) à travers son extrémité C-terminale, *in vitro* (Article 2). Cependant, nous n'avons pas réussi à identifier un motif de liaison au sein des *reads* récupérées, suggérant que Ded1 reconnaît des caractéristiques structurales de l'ARN, et/ ou elle s'associe à des partenaires protéiques pour reconnaître son substrat. Un premier élément de réponse a été trouvé avec la protéine Srp21, probablement un des partenaires protéiques de Ded1 dans la cellule. En effet, nous avons montré que la Srp21 inhibe l'activité ATPase de Ded1 *in vitro* en présence de son substrat authentique, SCR1. Nous avons émis l'hypothèse que cette inhibition a probablement lieu par des contacts protéine-protéine ; la Srp21 adopte probablement une structure en présence de l'ARN SCR1, Srp14 et Ded1, où la région C-terminale de Ded1 est importante pour la formation de ce complexe.

Par ailleurs, il est bien établi que les protéines ayant des régions intrinsèquement désordonnées sont très répandues chez les eucaryotes et remplissent une gamme de fonctions variées dans les systèmes de régulation et de signalisation (Iakoucheva *et al.*, 2004). Ces régions sont fréquemment soumises à des modifications post-traductionnelles qui peuvent induire des changements conformationnels qui affectent la fonction des protéines (van der Lee *et al.*, 2014). La plupart des hélicases à boîte DEAD, dont Ded1, hébergent de multiples signaux pour engager des modifications post-traductionnelles, en particulier au niveau des domaines N- et C-terminaux. Plusieurs sites de phosphorylation sur Ded1 ont déjà été identifiés par spectrométrie de masse, les plus importantes se situant sur l'extrémité C-terminale (Bodenmiller *et al.*, 2010, MacGilvray *et al.*, 2020). A ce jour, seule une étude a été réalisée sur ces modifications (Aryanpur *et al.*, 2019). De façon intéressante, les gradients de sucrose (Article du chapitre 2, Figure3) révèlent la présence de deux bandes sur la membrane du Western blot avec des anticorps dirigés contre Ded1 ; il serait intéressant de vérifier si la bande supérieure correspond à une forme phosphorylée de Ded1. Si c'est le cas, il serait judicieux de vérifier l'impact que peut avoir la phosphorylation sur la liaison à l'ARN et l'interaction avec les partenaires protéiques de Ded1. D'ailleurs, la présence de deux bandes de Ded1 est visualisée dans une autre étude mais les auteurs ne disent rien là-dessus (Gulay *et al.*, 2020). A titre d'exemple, il a été montré que des sites de phosphorylation sur l'extrémité N-terminale de l'hélicase à boîte DEAD Dhh1 régule son association avec deux autres protéines impliquées dans la régulation de la traduction d'ARNm localisés, Loc1 et Puf6 (Jung *et al.*, 2019). De même, une étude a montré l'impact du niveau de phosphorylation de DDX3X dans ses interactions avec d'autres protéines, en particulier à des moments précis du cycle cellulaire et lors de l'export de mRNP hors du noyau, renforçant l'importance de la compréhension des modifications post-traductionnelles dans cette classe de sous-famille (Choi and Lee, 2012). Nous pouvons également citer l'exemple d'une autre hélicase (de la sous-famille 1) subissant une phosphorylation importante, Upf1. Cette dernière, impliquée dans le NMD, contient plusieurs motifs (S/T) sujets à la phosphorylation au niveau des extrémités N- et C-terminales, dont la majorité est conservée de manière évolutive. La phosphorylation de Upf1 favoriserait sa fonction dans le NMD en créant une plateforme de liaison à d'autres composants du NMD (Lasalde *et al.*, 2014).

La Srp21, un nouveau régulateur de Ded1

A travers diverses expériences, nous avons montré que Ded1 est un facteur associé à la SRP, ce qui explique en partie, pourquoi nous avons un enrichissement des ARN codants des protéines sécrétoires, et de l'ARNnc SCR1, suite à l'analyse de l'expression des gènes différentiellement exprimés en condition de carence en glucose. Nous avons montré que

Ded1 est impliquée dans l'élongation de la traduction, en plus de son rôle dans l'initiation. La discussion de cette partie se trouve dans la section « discussion » de l'Article 2. Cependant, un aspect intéressant, qui n'a pas été abordé dans la discussion de l'Article 2, serait d'essayer d'identifier les domaines d'interaction entre Ded1 et Srp21, mesurer l'affinité de l'interaction en présence ou non de l'ARN SCR1, et au final tenter de cristalliser Ded1 avec Srp21. Dans les essais précédentes de cristallisation de Ded1, les domaines N- et C-terminaux n'ont pas été récupérés (Hauk and Bowman, 2015), probablement en raison de l'absence de structure de ces domaines : la liaison avec la Srp21 pourrait former une structure et pourrait donner des éléments de réponse sur le mécanisme d'inhibition de Ded1 par la Srp21.

Ded1 : un régulateur de l'intégrité cellulaire

La caractérisation d'un nombre croissant d'hélicases à ARN au cours des dernières années a révélé que beaucoup d'entre elles étaient multifonctionnelles, plaçant ces enzymes au cœur de divers processus cellulaires impliquant presque tous les aspects du métabolisme de l'ARN. Des connaissances structurales et biochimiques sur les modes d'action des hélicases et leurs interactions avec les substrats à ARN ont montré qu'elles interagissent principalement avec le squelette sucre-phosphate suggérant que la plupart de ces protéines n'ont intrinsèquement pas la capacité de reconnaître spécifiquement leurs substrats. Très vite, il a été établi que la spécificité des hélicases est conférée par leurs extrémités N- et C-terminales variables, suggérant une spécialisation *in vivo*, avec soit la présence d'un domaine de reconnaissance à l'ARN, ou soit la régulation par des cofacteurs protéiques. Semblables à d'autres hélicases à ARN, les hélicases à boîte DEAD déroulent les duplex d'ARN d'une manière dépendante de l'ATP. Elles se chargent directement sur la région à dérouler et perturbent localement les duplex en pliant l'un des brins ARN en hydrolysant l'ATP. Cependant chaque cycle d'hydrolyse ne déroule qu'environ 10 paires de bases, plusieurs cycles de déroulement sont nécessaires pour séparer les longs duplex.

Ded1 est une hélicase multifonctionnelle.

C'est une hélicase à ARN dépendante de l'ATP qui est impliquée dans de multiples processus cellulaires impliquant l'ARN. C'est une protéine essentielle qui agit sur la traduction des protéines, *in vivo*. L'activité enzymatique de Ded1 est nécessaire pour réduire des structures présentes dans le 5'UTR des ARNm permettant une bonne initiation de la traduction et pour l'assemblage du PIC 48S. En revanche, bien que plusieurs preuves soutiennent une fonction biologique pour Ded1 dans l'initiation de la traduction, il y a quelques observations qui suggèrent que Ded1 pourrait jouer un rôle dans la répression de la traduction ; la surexpression de Ded1 provoque une inhibition sévère de la croissance cellulaire, une répression de la traduction et la formation de foci cellulaires. De même, une surexpression de

Ded1 inhibe l'assemblage du PIC 48S dans les tests *in vitro*. Ded1 est comme un « gardien » de l'initiation de la traduction. Notre étude apporte une nouvelle facette quant au compréhension du rôle de Ded1 dans la traduction durant l'élongation, de part sa régulation par un nouveau facteur, la Srp21. Mais aussi nous montrons, pour la première fois, que l'activité ATPase de Ded1 est augmentée face à un substrat authentique, indiquant qu'elle reconnaît des motifs ou des structures spécifiques de cet ARN. Comme le font d'ailleurs les hélicases bactériennes DbpA ou CdsA.

Matériels et méthodes

*J'accepte la grande aventure
d'être moi*
—
Simone de Beauvoir

Préparation des librairies et séquençage

Pour la transcriptomique, 15 ml de culture de chaque réplicat ont été récupérés. Après une centrifugation à 5000 rpm à 4°C, les culots ont été lavés une fois puis remis en suspension dans 900 µl de tampon d'extraction (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 0,5% SDS). L'ARN de cette solution a été récupéré par l'addition de 0,3 M d'acétate de potassium et d'un volume de phénol saturé en eau, puis extrait deux fois avec un volume de chloroforme couplé à l'alcool isoamylique (25 : 1). L'ARN a été précipité dans 2,5 volume d'éthanol 100% toute la nuit à -20°C. Les culots d'ARN ont été lavés avec de l'éthanol à 70%, remis en suspension dans 100 µl d'eau exempte de nucléase et envoyés tels quels à la plateforme de séquençage de l'I2BC. Les librairies ont été construites par la plateforme en utilisant le kit Illumina Truseq Stranded mRNA. Le séquençage a été réalisé en « Paired end » 75 en utilisant le kit de séquençage NextSeq 500/550 High Output kit v2 (75 cycles).

La préparation de la bibliothèque de la condition WT a été détaillée dans la section « matériel et méthodes » du papier méthode (chapitre 1). Pour la condition Δ -glucose, la même procédure a été suivie, à une différence près : la PCR a été réalisée avec les oligonucléotides anti-sens d'Illumina ; RPI9 (5' -CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT CTG ATC GTG ACT GGA GTT CCT TGG CAC CCG AGA ATT CCA- 3'), RPI10 (5' -CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT AAG CTA GTG ACT GGA GTT CCT TGG CAC CCG AGA ATT CCA- 3') et RPI12 (5'-CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT TAC AAG GTG ACT GGA GTT CCT TGG CAC CCG AGA ATT CCA- 3'). Le séquençage a été réalisé en « Single read » 84 en utilisant le kit de séquençage NextSeq 500/550 High Output kit v2 (75 cycles).

Traitement et analyse des données de séquençage

Les données de séquençage ont initialement été traitées par la plateforme de séquençage aussi bien pour les échantillons de la transcriptomique que pour les échantillons de PAR-CLIP modifiée. Les adaptateurs Illumina ont été démultiplexés en utilisant l'outil bcl2fastq2 (version 2.18.12) puis retirés avec Cutadapt (*adapter trimming*, version 1.15). La qualité des *reads* a été générée en utilisant l'outil FastQC (version v0.11.5). La plateforme nous a envoyé un fichier fastq (comprenant les données brutes du séquençage), un fichier fastq-après *trimming* (comprenant les données de séquençage sans les adaptateurs, près à être soumis à une analyse bio-informatique) ainsi qu'un fichier fastqc contenant des informations sur la qualité du séquençage. Nous avons poursuivi la suite de l'analyse à l'IBPC, en utilisant les outils disponibles sur le serveur FRIGG. La **Figure 26** présente un aperçu des étapes pour avoir l'alignement.

duplications de PCR ont été éliminées en utilisant le paramètre suivant : `samtools rmdup -s sample.bam -o sample-rmdup.bam`. Ce fichier a ensuite été trié par coordonnées génomiques en utilisant le génome de levure au format GFF (*general feature format*) disponible sur SGD (`genome.gff`). Il s'agit d'un fichier texte délimité par des tabulations qui décrit les caractéristiques génomiques (ARNm, ARNr, ARNt, etc...) du génome de référence. Le tri a été fait en utilisant les paramètres suivants : `samtools sort sample-rmdup.bam > sample-rmdup-sorted.bam` et `samtools index sample-rmdup-sorted.bam`. La visualisation des *reads* a ensuite été effectuée sur le logiciel IGV (Robinson *et al.*, 2011). En parallèle, le tableau de comptage de chaque *reads* a été obtenu grâce à l'outil Bedtools ((Quinlan and Hall, 2010), version 2.3.0) selon les paramètres suivants : `bedtools multicov -S -D -bams sample-rmdup-sorted.bam -bed genome.gff > sens-counts.txt` et `bedtools multicov -s -D -bams sample-rmdup-sorted.bam -bed genome.gff > antisens-counts.txt`.

RPKM

Le nombre de lectures (*reads*) obtenues par la technique de PAR-CLIP modifiée dépend de l'abondance d'ARN au moment de l'expérience. Pour réduire la distorsion introduite par les biais techniques du séquençage (longueurs des ARN et profondeur de séquençage d'un échantillon), une normalisation a été effectuée en utilisant les tableaux de comptage. Le RPKM (lecture par kilobase de transcrite par million de lectures alignées, *reads per kilobase of transcript per million mapped reads*) a été calculé pour estimer l'abondance des ARN où le nombre de *reads* de chaque gène a été normalisé par la longueur du gène ainsi que le nombre total de *reads* cartographiées. Le même calcul a été effectué sur les données de comptages de la transcriptomique (Kishore *et al.*, 2011, Mortazavi *et al.*, 2008).

$$\text{RPKM} = \text{nombre de } reads \text{ par gène} / ((\text{longueur du gène}/1000) \times (\text{nombre total de } reads/10^6)).$$

Expression différentielle

L'analyse de l'expression différentielle a été faite à partir des tableaux de comptage des échantillons de PAR-CLIP modifiée en utilisant le package DESeq2 exécutable sur R (www.bioconductor.org/) (Love *et al.*, 2014). Suite à l'analyse, nous avons obtenu une liste de gènes différentiellement exprimés entre deux conditions.

Bibliographie

*Hâtons-nous aujourd'hui de jouir de la vie.
Qui sait si nous serons demain ?*

Racine

- ABDEL-MONEM M. & HOFFMANN-BERLING H. 1976. Enzymic unwinding of DNA. 1. Purification and characterization of a DNA-dependent ATPase from *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS*, 65, 431-440.
- ABDELHALEEM M. 2009. Helicase: An Overview. *Molecular Biology* 587.
- ADACHI Y. & YANAGIDA M. 1989. Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *J Cell Biol*, 108, 1195-207.
- ALAVIAN C. N., RITLAND POLITZ J. C., LEWANDOWSKI L. B., POWERS C. M. & PEDERSON T. 2004. Nuclear export of signal recognition particle RNA in mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 313, 351-355.
- ALCÁZAR-ROMÁN A. R., TRAN E. J., GUO S. & WENTE S. R. 2006. Inositol hexakisphosphate and Gle1 activate the DEAD-box protein Dbp5 for nuclear mRNA export. *Nat Cell Biol*, 8, 711-6.
- ANDREOU A. Z. & KLOSTERMEIER D. 2013. The DEAD-box helicase eIF4A: paradigm or the odd one out? *RNA Biol*, 10, 19-32.
- ANDREOU A. Z. & KLOSTERMEIER D. 2014. eIF4B and eIF4G jointly stimulate eIF4A ATPase and unwinding activities by modulation of the eIF4A conformational cycle. *Journal of Molecular Biology*, 426, 51-61.
- ARES M., JR., GRATE L. & PAULING M. H. 1999. A handful of intron-containing genes produces the lion's share of yeast mRNA. *Rna*, 5, 1138-9.
- ARRIBERE J. A. & GILBERT W. V. 2013. Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome research*, 23, 977-987.
- ARYANPUR P. P., REGAN C. A., COLLINS J. M. *et al.* 2017. Gle1 regulates RNA binding of the DEAD-box helicase Ded1 in its complex role in translation initiation. *Molecular and Cellular Biology*.
- ARYANPUR P. P., RENNER D. M., RODELA E., MITTELMEIER T. M., BYRD A. & BOLGER T. A. 2019. The DEAD-box RNA helicase Ded1 has a role in the translational response to TORC1 inhibition. *Molecular biology of the cell*, 30, 2171-2184.
- ASHE M. P., DE LONG S. K. & SACHS A. B. 2000. Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. *Molecular biology of the cell*, 11, 833-848.
- ASKJAER P., BACHI A., WILM M. *et al.* 1999. RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 6276-6285.
- ASKJAER P., ROSENDAHL R. & KJEMS J. 2000. Nuclear export of the DEAD box An3 protein by CRM1 is coupled to An3 helicase activity. *The Journal of biological chemistry*, 275, 11561-11568.
- AVIRAM N. & SCHULDINER M. 2017. Targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum at a glance. *Journal of cell science*, 130, 4079-4085.
- BAIM & SHERMAN 1988. mRNA Structures Influencing Translation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 1-11.
- BANANI S. F., RICE A. M., PEEPLES W. B. *et al.* 2016. Compositional Control of Phase-Separated Cellular Bodies. *Cell*, 166, 651-663.
- BANROQUES J., CORDIN O., DOÈRE M., LINDER P. & TANNER N. K. 2008. A conserved phenylalanine of motif IV in superfamily 2 helicases is required for cooperative, ATP-dependent binding of RNA substrates in DEAD-box proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 3359-3371.
- BANROQUES J., CORDIN O., DOÈRE M., LINDER P. & TANNER N. K. 2011. Analyses of the functional regions of DEAD-box RNA "helicases" with deletion and chimera constructs tested in vivo and in vitro. *J Mol Biol*, 413, 451-72.

- BANROQUES J., DOÈRE M., DREYFUS M., LINDER P. & TANNER N. K. 2010. Motif III in superfamily 2 "helicases" helps convert the binding energy of ATP into a high-affinity RNA binding site in the yeast DEAD-box protein Ded1. *J Mol Biol*, 396, 949-66.
- BECKERT B., KEDROV A., SOHMEN D. *et al.* 2015. Translational arrest by a prokaryotic signal recognition particle is mediated by RNA interactions. *Nature Structural & Molecular Biology*, 22, 767-773.
- BECKHAM C., HILLIKER A., CZIKO A.-M., NOUEIRY A., RAMASWAMI M. & PARKER R. 2008. The DEAD-box RNA helicase Ded1p affects and accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* P-bodies. *Molecular biology of the cell*, 19, 984-993.
- BECKMANN B. M. 2017. RNA interactome capture in yeast. *Methods (San Diego, Calif.)*, 118-119, 82-92.
- BEN-SHEM A., JENNER L., YUSUPOVA G. & YUSUPOV M. 2010. Crystal Structure of the Eukaryotic Ribosome. *Science*, 330, 1203.
- BENHALEVY D., MCFARLAND H. L., SARSHAD A. A. & HAFNER M. 2017. PAR-CLIP and streamlined small RNA cDNA library preparation protocol for the identification of RNA binding protein target sites. *Methods*, 118-119, 41-49.
- BERGER J. M. 2008. SnapShot: nucleic acid helicases and translocases. *Cell*, 134, 888-888.e1.
- BERTHELOT K., MULDOON M., RAJKOWITZSCH L., HUGHES J. & MCCARTHY J. E. G. 2004. Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Molecular Microbiology*, 51, 987-1001.
- BIZEBARD T., FERLENGHI I., IOST I. & DREYFUS M. 2004. Studies on three *E. coli* DEAD-box helicases point to an unwinding mechanism different from that of model DNA helicases. *Biochemistry*, 43, 7857-66.
- BLOBEL G., WALTER P., CHANG C. N., GOLDMAN B. M., ERICKSON A. H. & LINGAPPA V. R. 1979. Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 33, 9-36.
- BODENMILLER B., WANKA S., KRAFT C. *et al.* 2010. Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast. *Sci Signal*, 3, rs4.
- BOL G. M., XIE M. & RAMAN V. 2015. DDX3, a potential target for cancer treatment. *Molecular cancer*, 14, 188.
- BOLGER T. A. & WENTE S. R. 2011. Gle1 is a multifunctional DEAD-box protein regulator that modulates Ded1 in translation initiation. *The Journal of biological chemistry*, 286, 39750-39759.
- BONO F., EBERT J., LORENTZEN E. & CONTI E. 2006. The Crystal Structure of the Exon Junction Complex Reveals How It Maintains a Stable Grip on mRNA. *Cell*, 126, 713-725.
- BOUSSET L., MARY C., BROOKS M. A., SCHERRER A., STRUB K. & CUSACK S. 2014. Crystal structure of a signal recognition particle Alu domain in the elongation arrest conformation. *RNA (New York, N.Y.)*, 20, 1955-1962.
- BOWERS H. A., MARONEY P. A., FAIRMAN M. E. *et al.* 2006. Discriminatory RNP remodeling by the DEAD-box protein DED1. *RNA*, 12, 903-912.
- BRAI A., FAZI R., TINTORI C. *et al.* 2016. Human DDX3 protein is a valuable target to develop broad spectrum antiviral agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 5388-5393.
- BRIMACOMBE R., STIEGE W., KYRIATSOULIS A. & MALY P. 1988. [19] Intra-RNA and RNA—protein cross-linking techniques in *Escherichia coli* ribosomes. *Methods in Enzymology*. Vol. 164, pp. 287-309, Academic Press.
- BROWN J. D., HANN B. C., MEDZIHRADSKY K. F., NIWA M., BURLINGAME A. L. & WALTER P. 1994. Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *The EMBO Journal*, 13, 4390-4400.

- BUI N., WOLFF N., CUSACK S. & STRUB K. 1997. Mutational analysis of the protein subunits of the signal recognition particle Alu-domain. *Rna*, 3, 748-63.
- BURCKIN T., NAGEL R., MANDEL-GUTFREUND Y. *et al.* 2005. Exploring functional relationships between components of the gene expression machinery. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12, 175-182.
- BUSTAMANTE C., CHENG W. & MEJIA Y. X. 2011. Revisiting the Central Dogma One Molecule at a Time. *Cell*, 144, 480-497.
- CALVIELLO L., VENKATARAMANAN S., ROGOWSKI K. J. *et al.* 2019. DDX3 depletion selectively represses translation of structured mRNAs. *bioRxiv*, 589218.
- CASTELLI L. M., LUI J., CAMPBELL S. G. *et al.* 2011. Glucose depletion inhibits translation initiation via eIF4A loss and subsequent 48S preinitiation complex accumulation, while the pentose phosphate pathway is coordinately up-regulated. *Molecular biology of the cell*, 22, 3379-3393.
- CASTELLO A., FISCHER B., EICHELBAUM K. *et al.* 2012. Insights into RNA Biology from an Atlas of Mammalian mRNA-Binding Proteins. *Cell*, 149, 1393-1406.
- CHAMOT D., COLVIN K. R., KUJAT-CHOY S. L. & OWTIRIM G. W. 2005. RNA structural rearrangement via unwinding and annealing by the cyanobacterial RNA helicase, CrhR. *J Biol Chem*, 280, 2036-44.
- CHARTRON J. W., HUNT K. C. L. & FRYDMAN J. 2016. Cotranslational signal-independent SRP preloading during membrane targeting. *Nature*, 536, 224-228.
- CHEN Y., POTRATZ J. P., TIJERINA P., DEL CAMPO M., LAMBOWITZ A. M. & RUSSELL R. 2008. DEAD-box proteins can completely separate an RNA duplex using a single ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20203-8.
- CHOI J., GROSELY R., PRABHAKAR A., LAPOINTE C. P., WANG J. & PUGLISI J. D. 2018. How Messenger RNA and Nascent Chain Sequences Regulate Translation Elongation. *Annual Review of Biochemistry*, 87, 421-449.
- CHOI Y.-J. & LEE S.-G. 2012. The DEAD-box RNA helicase DDX3 interacts with DDX5, co-localizes with it in the cytoplasm during the G2/M phase of the cycle, and affects its shuttling during mRNP export. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113, 985-996.
- CHONG J.-L., CHUANG R.-Y., TUNG L. & CHANG T.-H. 2004. Ded1p, a conserved DExD/H-box translation factor, can promote yeast L-A virus negative-strand RNA synthesis in vitro. *Nucleic Acids Research*, 32, 2031-2038.
- CHUANG R. Y., WEAVER P. L., LIU Z. & CHANG T. H. 1997. Requirement of the DEAD-Box protein ded1p for messenger RNA translation. *Science*, 275, 1468-1471.
- CHURCHMAN L. S. & WEISSMAN J. S. 2011. Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature*, 469, 368-373.
- CIUFO L. F. & BROWN J. D. 2000. Nuclear export of yeast signal recognition particle lacking Srp54p by the Xpo1p/Crm1p NES-dependent pathway. *Current Biology*, 10, 1256-1264.
- COLLINS R., KARLBERG T., LEHTIÖ L. *et al.* 2009. The DEXD/H-box RNA helicase DDX19 is regulated by an α -helical switch. *The Journal of biological chemistry*, 284, 10296-10300.
- COOK A., BONO F., JINEK M. & CONTI E. 2007. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem*, 76, 647-71.
- CORDIN O., BANROQUES J., TANNER N. K. & LINDER P. 2006. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, 367, 17-37.
- CORDIN O., HAHN D. & BEGGS J. D. 2012. Structure, function and regulation of spliceosomal RNA helicases. *Current Opinion in Cell Biology*, 24, 431-438.
- CORDIN O., TANNER N. K., DOÈRE M., LINDER P. & BANROQUES J. 2004. The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity. *The EMBO Journal*, 23, 2478-2487.

- COSTANZO M., VANDERSLUIJS B., KOCH E. N. *et al.* 2016. A global genetic interaction network maps a wiring diagram of cellular function. *Science (New York, N.Y.)*, 353, aaf1420.
- CREAMER T. J., DARBY M. M., JAMONNAK N. *et al.* 2011. Transcriptome-wide binding sites for components of the *Saccharomyces cerevisiae* non-poly(A) termination pathway: Nrd1, Nab3, and Sen1. *PLoS Genet*, 7, e1002329.
- CRUCIAT C.-M., DOLDE C., DE GROOT R. E. A. *et al.* 2013. RNA helicase DDX3 is a regulatory subunit of casein kinase 1 in Wnt- β -catenin signaling. *Science*, 339, 1436-1441.
- CURCIO M. J., LUTZ S. & LESAGE P. 2015. The Ty1 LTR-retrotransposon of budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology spectrum*, 3, 1-35.
- DARNELL R. B. 2010. HITS-CLIP: panoramic views of protein-RNA regulation in living cells. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 1, 266-286.
- DE BISSCHOP G., AMEUR M., ULRICK N. *et al.* 2019. HIV-1 gRNA, a biological substrate, uncovers the potency of DDX3X biochemical activity. *Biochimie*, 164, 83-94.
- DE LA CRUZ J., IOST I., KRESSLER D. & LINDER P. 1997. The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 5201-5206.
- DE LA CRUZ J., KRESSLER D. & LINDER P. 1999. Unwinding RNA in *Saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 24, 192-198.
- DEL ALAMO M., HOGAN D. J., PECHMANN S., ALBANESE V., BROWN P. O. & FRYDMAN J. 2011. Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biology*, 9, e1001100.
- DEL CAMPO M., MOHR S., JIANG Y., JIA H., JANKOWSKY E. & LAMBOWITZ A. M. 2009. Unwinding by local strand separation is critical for the function of DEAD-box proteins as RNA chaperones. *Journal of molecular biology*, 389, 674-693.
- DENKS K., SLIWINSKI N., ERICHSEN V., BORODKINA B., ORIGI A. & KOCH H. G. 2017. The signal recognition particle contacts uL23 and scans substrate translation inside the ribosomal tunnel. *Nat Microbiol*, 2, 16265.
- DEVER T. E., DINMAN J. D. & GREEN R. 2018. Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10.
- DEVER T. E., KINZY T. G. & PAVITT G. D. 2016. Mechanism and Regulation of Protein Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 203, 65-107.
- DI GIAMMARTINO D. C., NISHIDA K. & MANLEY J. L. 2011. Mechanisms and consequences of alternative polyadenylation. *Molecular cell*, 43, 853-866.
- DIGES C. M. & UHLENBECK O. C. 2001. *Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *The EMBO Journal*, 20, 5503-5512.
- DUFFY E. E., SCHOFIELD J. A. & SIMON M. D. 2019. Gaining insight into transcriptome-wide RNA population dynamics through the chemistry of 4-thiouridine. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 10, e1513-e1513.
- ENEMARK E. J. & JOSHUA-TOR L. 2008. On helicases and other motor proteins. *Current opinion in structural biology*, 18, 243-257.
- FAIRMAN M. E., MARONEY P. A., WANG W. *et al.* 2004. Protein displacement by DExH/D "RNA helicases" without duplex unwinding. *Science*, 304, 730-734.
- FAIRMAN-WILLIAMS M. E., GUENTHER U.-P. & JANKOWSKY E. 2010. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current opinion in structural biology*, 20, 313-324.
- FAVRE A., SAINTOMÉ C., FOURREY J. L., CLIVIO P. & LAUGÅA P. 1998. Thionucleobases as intrinsic photoaffinity probes of nucleic acid structure and nucleic acid-protein interactions. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 42, 109-124.

- FIRCZUK H., KANNAMBATH S., PAHLE J. *et al.* 2013. An in vivo control map for the eukaryotic mRNA translation machinery. *Molecular Systems Biology*, 9, 635.
- FLOOR S. N., CONDON K. J., SHARMA D., JANKOWSKY E. & DOUDNA J. A. 2016. Autoinhibitory Interdomain Interactions and Subfamily-specific Extensions Redefine the Catalytic Core of the Human DEAD-box Protein DDX3. *The Journal of biological chemistry*, 291, 2412-2421.
- FLORES J. K. & ATAIDE S. F. 2018. Structural Changes of RNA in Complex with Proteins in the SRP. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 5, 7.
- FORBES K. C., HUMPHREY T. & ENOCH T. 1998. Suppressors of cdc25p overexpression identify two pathways that influence the G2/M checkpoint in fission yeast. *Genetics*, 150, 1361-1375.
- FORESTA C., FERLIN A. & MORO E. 2000. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Hum Mol Genet*, 9, 1161-9.
- FREEBERG M. A., HAN T., MORESCO J. J. *et al.* 2013. Pervasive and dynamic protein binding sites of the mRNA transcriptome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome biology*, 14, R13-R13.
- FREYMAN D. M., KEENAN R. J., STROUD R. M. & WALTER P. 1997. Structure of the conserved GTPase domain of the signal recognition particle. *Nature*, 385, 361-364.
- FUKUMURA J., NOGUCHI E., SEKIGUCHI T. & NISHIMOTO T. 2003. A temperature-sensitive mutant of the mammalian RNA helicase, DEAD-BOX X isoform, DBX, defective in the transition from G1 to S phase. *J Biochem*, 134, 71-82.
- GAO J., BYRD A. K., ZYBAILOV B. L. *et al.* 2019. DEAD-box RNA helicases Dbp2, Ded1 and Mss116 bind to G-quadruplex nucleic acids and destabilize G-quadruplex RNA. *Chemical Communications*, 55, 4467-4470.
- GAO Z., PUTNAM A. A., BOWERS H. A. *et al.* 2016. Coupling between the DEAD-box RNA helicases Ded1p and eIF4A. *eLife*, 5, 568.
- GARBELLI A., BEERMANN S., DI CICCIO G., DIETRICH U. & MAGA G. 2011. A motif unique to the human DEAD-box protein DDX3 is important for nucleic acid binding, ATP hydrolysis, RNA/DNA unwinding and HIV-1 replication. *PloS one*, 6, e19810-e19810.
- GARCÍA-GARCÍA C., FRIEDA K. L., FEOKTISTOVA K., FRASER C. S. & BLOCK S. M. 2015. Factor-dependent processivity in human eIF4A DEAD-box helicase. *Science*, 348, 1486.
- GARZIA A., MEYER C., MOROZOV P., SAJEK M. & TUSCHL T. 2017. Optimization of PAR-CLIP for transcriptome-wide identification of binding sites of RNA-binding proteins. *Methods (San Diego, Calif.)*, 118-119, 24-40.
- GEIDER K. 1978. The single-stranded DNA phages.(eds. Denhardt, Dressler & Ray) 378–387. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- GEISLER R., GOLBIK R. P. & BEHRENS S.-E. 2012. The DEAD-box helicase DDX3 supports the assembly of functional 80S ribosomes. *Nucleic Acids Research*, 40, 4998-5011.
- GEVA Y. & SCHULDINER M. 2014. The back and forth of cargo exit from the endoplasmic reticulum. *Curr Biol*, 24, R130-6.
- GOGOL E. P., SEIFRIED S. E. & VON HIPPEL P. H. 1991. Structure and assembly of the *Escherichia coli* transcription termination factor rho and its interactions with RNA I. Cryoelectron microscopic studies. *Journal of Molecular Biology*, 221, 1127-1138.
- GORBALENYA A. E. & KOONIN E. V. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current opinion in structural biology*, 3, 419-429.
- GORBALENYA A. E., KOONIN E. V., DONCHENKO A. P. & BLINOV V. M. 1988a. A conserved NTP-motif in putative helicases. *Nature*, 333, 22-22.

- GORBALENYA A. E., KOONIN E. V., DONCHENKO A. P. & BLINOV V. M. 1988b. A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination. *FEBS letters*, 235, 16-24.
- GORBALENYA A. E., KOONIN E. V. & WOLF Y. I. 1990. A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. *FEBS Letters*, 262, 145-148.
- GÖRLICH D. & KUTAY U. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 607-60.
- GÖRLICH D. & RAPOPORT T. A. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, 75, 615-30.
- GRALLERT B., KEARSEY S. E., LENHARD M. *et al.* 2000. A fission yeast general translation factor reveals links between protein synthesis and cell cycle controls. *Journal of cell science*, 113 (Pt 8), 1447-1458.
- GRANNEMAN S., KUDLA G., PETFALSKI E. & TOLLERVEY D. 2009. Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 9613-9618.
- GROSSHANS H., DEINERT K., HURT E. & SIMOS G. 2001. Biogenesis of the signal recognition particle (SRP) involves import of SRP proteins into the nucleolus, assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated export. *The Journal of cell biology*, 153, 745-762.
- GRÜTER P., TABERNERO C., VON KOBBE C. *et al.* 1998. TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol Cell*, 1, 649-59.
- GUELER B., SONNE S. B., ZIMMER J. *et al.* 2012. AZFa protein DDX3Y is differentially expressed in human male germ cells during development and in testicular tumours: new evidence for phenotypic plasticity of germ cells. *Hum Reprod*, 27, 1547-55.
- GUENTHER U.-P., WEINBERG D. E., ZUBRADT M. M. *et al.* 2018. The helicase Ded1p controls use of near-cognate translation initiation codons in 5' UTRs. *Nature Chemical Biology*, 559, 130-134.
- GULAY S., GUPTA N., LORSCH J. R. & HINNEBUSCH A. G. 2020. Distinct interactions of eIF4A and eIF4E with RNA helicase Ded1 stimulate translation in vivo. *eLife*, 9, e58243.
- GUPTA N., LORSCH J. R. & HINNEBUSCH A. G. 2018. Yeast Ded1 promotes 48S translation pre-initiation complex assembly in an mRNA-specific and eIF4F-dependent manner. *eLife*, 7, 115.
- GURURAJAN R., MATHEWS L., LONGO F. J. & WEEKS D. L. 1994. An3 mRNA encodes an RNA helicase that colocalizes with nucleoli in *Xenopus* oocytes in a stage-specific manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 2056-2060.
- GURURAJAN R. & WEEKS D. L. 1997. An3 protein encoded by a localized maternal mRNA in *Xenopus laevis* is an ATPase with substrate-specific RNA helicase activity. *Biochim Biophys Acta*, 1350, 169-82.
- GÜTTLER T. & GÖRLICH D. 2011. Ran-dependent nuclear export mediators: a structural perspective. *The EMBO journal*, 30, 3457-3474.
- HAFNER M., LANDTHALER M., BURGER L. *et al.* 2010. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*, 141, 129-141.
- HALIC M., BECKER T., POOL M. R. *et al.* 2004. Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature*, 427, 808-814.
- HALLS C., MOHR S., DEL CAMPO M., YANG Q., JANKOWSKY E. & LAMBOWITZ A. M. 2007. Involvement of DEAD-box proteins in group I and group II intron splicing.

- Biochemical characterization of Mss116p, ATP hydrolysis-dependent and -independent mechanisms, and general RNA chaperone activity. *J Mol Biol*, 365, 835-55.
- HANN B. C., STIRLING C. J. & WALTER P. 1992. SEC65 gene product is a subunit of the yeast signal recognition particle required for its integrity. *Nature*, 356, 532-533.
- HANN B. C. & WALTER P. 1991. The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell*, 67, 131-144.
- HAUK G. & BOWMAN G. D. 2015. Formation of a Trimeric Xpo1-Ran [GTP]-Ded1 Exportin Complex Modulates ATPase and Helicase Activities of Ded1. *PLoS ONE*.
- HAVUGIMANA PIERRE C., HART G. T., NEPUSZ T. *et al.* 2012. A Census of Human Soluble Protein Complexes. *Cell*, 150, 1068-1081.
- HE X. P., BATAILLÉ N. & FRIED H. M. 1994. Nuclear export of signal recognition particle RNA is a facilitated process that involves the Alu sequence domain. *Journal of cell science*, 107 (Pt 4), 903-912.
- HENN A., BRADLEY M. J. & DE LA CRUZ E. M. 2012. ATP utilization and RNA conformational rearrangement by DEAD-box proteins. *Annual review of biophysics*, 41, 247-267.
- HERNÁNDEZ G., ALTMANN M. & LASKO P. 2010. Origins and evolution of the mechanisms regulating translation initiation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, 35, 63-73.
- HICKMAN A. B. & DYDA F. 2005. Binding and unwinding: SF3 viral helicases. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 77-85.
- HILBERT M., KAROW A. R. & KLOSTERMEIER D. 2009. The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins. *Biological chemistry*, 390, 1237-1250.
- HILBERT M., KEBBEL F., GUBAEV A. & KLOSTERMEIER D. 2010. eIF4G stimulates the activity of the DEAD box protein eIF4A by a conformational guidance mechanism. *Nucleic Acids Research*, 39, 2260-2270.
- HILLIKER A., GAO Z., JANKOWSKY E. & PARKER R. 2011. The DEAD-box protein Ded1 modulates translation by the formation and resolution of an eIF4F-mRNA complex. *Molecular Cell*, 43, 962-972.
- HINNEBUSCH A. G. 2014. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual Review of Biochemistry*, 83, 779-812.
- HINNEBUSCH A. G. & LORSCH J. R. 2012. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4.
- HIR H. L., SAULIÈRE J. & WANG Z. 2016. The exon junction complex as a node of post-transcriptional networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 41-54.
- HO Y., GRUHLER A., HEILBUT A. *et al.* 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, 415, 180-3.
- HODGMAN T. C. 1988. A new superfamily of replicative proteins. *Nature*, 333, 22-23.
- HÖGBOM M., COLLINS R., VAN DEN BERG S. *et al.* 2007. Crystal structure of conserved domains 1 and 2 of the human DEAD-box helicase DDX3X in complex with the mononucleotide AMP. *J Mol Biol*, 372, 150-9.
- HONDELE M., SACHDEV R., HEINRICH S. *et al.* 2019. DEAD-box ATPases are global regulators of phase-separated organelles. *Nature Chemical Biology*, 573, 144-148.
- HUANG H.-R., ROWE C. E., MOHR S., JIANG Y., LAMBOWITZ A. M. & PERLMAN P. S. 2005. The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 163.
- HUTTEN S. & KEHLENBACH R. H. 2007. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. *Trends in Cell Biology*, 17, 193-201.
- IAKOUICHEVA L. M., RADIVOJAC P., BROWN C. J. *et al.* 2004. The importance of intrinsic disorder for protein phosphorylation. *Nucleic Acids Res*, 32, 1037-49.

- IHRY R. J., SAPIRO A. L. & BASHIRULLAH A. 2012. Translational control by the DEAD Box RNA helicase Belle regulates ecdysone-triggered transcriptional cascades. *PLoS Genetics*, 8, e1003085.
- INOUE H., Ogonuki N., HIROSE M. *et al.* 2016. Mouse D1Pas1, a DEAD-box RNA helicase, is required for the completion of first meiotic prophase in male germ cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 478, 592-598.
- IOST I., DREYFUS M. & LINDER P. 1999. Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *The Journal of biological chemistry*, 274, 17677-17683.
- ISERMAN C., DESROCHES ALTAMIRANO C., JEGERS C. *et al.* 2020. Condensation of Ded1p Promotes a Translational Switch from Housekeeping to Stress Protein Production. *Cell*, 181, 818-831.e19.
- IVANOV P., KEDERSHA N. & ANDERSON P. 2019. Stress Granules and Processing Bodies in Translational Control. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 11, a032813.
- IYER L. M., LEIPE D. D., KOONIN E. V. & ARAVIND L. 2004. Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology*, 146, 11-31.
- JACKSON R. N., LAVIN M., CARTER J. & WIEDENHEFT B. 2014. Fitting CRISPR-associated Cas3 into the helicase family tree. *Current opinion in structural biology*, 24, 106-114.
- JACOBSON M. R. & PEDERSON T. 1998. Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 7981-7986.
- JAMES J. M. B., CRYAR A. & THALASSINOS K. 2019. Optimization Workflow for the Analysis of Cross-Linked Peptides Using a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometer. *Analytical Chemistry*, 91, 1808-1814.
- JAMIESON D. & BEGGS J. D. 1991. A suppressor of a yeast splicing mutation (*prp8-1*) encodes a putative ATP-dependent RNA helicase. *Nature*, 1-3.
- JANAPALA Y., PREISS T. & SHIROKIKH N. E. 2019. Control of Translation at the Initiation Phase During Glucose Starvation in Yeast. *Int J Mol Sci*, 20.
- JANKOWSKY E. 2011. RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem Sci*, 36, 19-29.
- JARMOSKAITE I. & RUSSELL R. 2011. DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. *Wiley interdisciplinary reviews RNA*, 2, 135-152.
- JOHNSTONE O., DEURING R., BOCK R., LINDER P., FULLER M. T. & LASKO P. 2005. Belle is a *Drosophila* DEAD-box protein required for viability and in the germ line. *Developmental biology*, 277, 92-101.
- JOMAA A., BOEHRINGER D., LEIBUNDGUT M. & BAN N. 2016. Structures of the *E. coli* translating ribosome with SRP and its receptor and with the translocon. *Nature Communications*, 7, 10471.
- JUNG D., SEO J. S., NAM J. & KIM J. 2019. Functional association of Loc1 and Puf6 with RNA helicase Dhh1 in translational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* Ste12. *PloS one*, 14, e0220137-e0220137.
- KASTNER B., WILL C. L., STARK H. & LÜHRMANN R. 2019. Structural Insights into Nuclear pre-mRNA Splicing in Higher Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11.
- KIM Y. S., LEE S. G., PARK S. H. & SONG K. 2001. Gene structure of the human DDX3 and chromosome mapping of its related sequences. *Mol Cells*, 12, 209-14.
- KISHORE S., JASKIEWICZ L., BURGER L., HAUSSER J., KHORSHID M. & ZAVOLAN M. 2011. A quantitative analysis of CLIP methods for identifying binding sites of RNA-binding proteins. *Nat Methods*, 8, 559-64.
- KISTLER A. L. & GUTHRIE C. 2001. Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes & Development*, 15, 42-49.

- KÖHLER A. & HURT E. 2007. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 761-773.
- KOTOV A. A., GODNEEVA B. K., OLENKINA O. M., ADASHEV V. E., TROSTNIKOV M. V. & OLENINA L. V. 2020. The Drosophila RNA Helicase Belle (DDX3) Non-Autonomously Suppresses Germline Tumorigenesis Via Regulation of a Specific mRNA Set. *Cells*, 9, 550.
- KOZAK M. 1984. Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Res*, 12, 3873-93.
- KOZAK M. 1989. Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol Cell Biol*, 9, 5134-42.
- KOZAK M. 2005. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*, 361, 13-37.
- KRASTANOVA O., HADZHITODOROV M. & PESHEVA M. 2014. Ty Elements of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 19, 19-26.
- KRESSLER D., LINDER P. & DE LA CRUZ J. 1999. Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 19, 7897-7912.
- LAI M.-C., CHANG W.-C., SHIEH S.-Y. & TARN W.-Y. 2010. DDX3 regulates cell growth through translational control of cyclin E1. *Molecular and Cellular Biology*, 30, 5444-5453.
- LAI M.-C., LEE Y.-H. W. & TARN W.-Y. 2008. The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Molecular biology of the cell*, 19, 3847-3858.
- LARI A., ARUL NAMBI RAJAN A., SANDHU R. *et al.* 2019. A nuclear role for the DEAD-box protein Dbp5 in tRNA export. *eLife*, 8, e48410.
- LASALDE C., RIVERA A. V., LEÓN A. J. *et al.* 2014. Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in the RNA surveillance protein Upf1. *Nucleic acids research*, 42, 1916-1929.
- LEE C.-S., DIAS A. P., JEDRYCHOWSKI M., PATEL A. H., HSU J. L. & REED R. 2008. Human DDX3 functions in translation and interacts with the translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Research*, 36, 4708-4718.
- LEE F. C. Y. & ULE J. 2018. Advances in CLIP Technologies for Studies of Protein-RNA Interactions. *Molecular Cell*, 69, 354-369.
- LEE S. R. & LYKKE-ANDERSEN J. 2013. Emerging roles for ribonucleoprotein modification and remodeling in controlling RNA fate. *Trends in Cell Biology*, 23, 504-510.
- LEIPE D. D., WOLF Y. I., KOONIN E. V. & ARAVIND L. 2002. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. Edited by J. Thornton. *Journal of Molecular Biology*, 317, 41-72.
- LEROY P., ALZARI P., SASSOON D., WOLGEMUTH D. & FELLOUS M. 1989. The protein encoded by a murine male germ cell-specific transcript is a putative ATP-dependent RNA helicase. *Cell*, 57, 549-59.
- LEUNG E. & BROWN J. D. 2010. Biogenesis of the signal recognition particle. *Biochemical Society transactions*, 38, 1093-1098.
- LEUNG E., SCHNEIDER C., YAN F. *et al.* 2014. Integrity of SRP RNA is ensured by La and the nuclear RNA quality control machinery. *Nucleic Acids Research*, 42, 10698-10710.
- LI H. & DURBIN R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25, 1754-60.
- LI H., HANDSAKER B., WYSOKER A. *et al.* 2009a. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25, 2078-9.

- LI Z., LEE I., MORADI E., HUNG N.-J., JOHNSON A. W. & MARCOTTE E. M. 2009b. Rational extension of the ribosome biogenesis pathway using network-guided genetics. *PLoS Biology*, 7, e1000213.
- LIAO S. E., KANDASAMY S. K., ZHU L. & FUKUNAGA R. 2019. DEAD-box RNA helicase Belle posttranscriptionally promotes gene expression in an ATPase activity-dependent manner. *RNA (New York, N.Y.)*, 25, 825-839.
- LINDER P. & JANKOWSKY E. 2011. From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 505-16.
- LINDER P., LASKO P. F., ASHBURNER M. *et al.* 1989. Birth of the D-E-A-D box. *Nature*, 337, 121-122.
- LINDER P. & SLONIMSKI P. P. 1988. Sequence of the genes TIF1 and TIF2 from *Saccharomyces cerevisiae* coding for a translation initiation factor. *Nucleic acids research*, 16, 10359-10359.
- LINDER P. & SLONIMSKI P. P. 1989. An essential yeast protein, encoded by duplicated genes TIF1 and TIF2 and homologous to the mammalian translation initiation factor eIF-4A, can suppress a mitochondrial missense mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 2286-2290.
- LIU F., PUTNAM A. A. & JANKOWSKY E. 2014. DEAD-Box Helicases Form Nucleotide-Dependent, Long-Lived Complexes with RNA. *Biochemistry*, 53, 423-433.
- LIU H.-Y., NEFSKY B. S. & WALWORTH N. C. 2002. The Ded1 DEAD box helicase interacts with Chk1 and Cdc2. *The Journal of biological chemistry*, 277, 2637-2643.
- LOHMAN T. M., TOMKO E. J. & WU C. G. 2008. Non-hexameric DNA helicases and translocases: mechanisms and regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 391-401.
- LÓPEZ DE VICTORIA A., MOORE A. F. T., GITTIS A. G. & KOCULI E. 2017. Kinetics and Thermodynamics of DbpA Protein's C-Terminal Domain Interaction with RNA. *ACS omega*, 2, 8033-8038.
- LOVE M. I., HUBER W. & ANDERS S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550.
- LUND M. K. & GUTHRIE C. 2005. The DEAD-box protein Dbp5p is required to dissociate Mex67p from exported mRNPs at the nuclear rim. *Molecular Cell*, 20, 645-651.
- LUNDE B. M., MOORE C. & VARANI G. 2007. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, 479-490.
- MA W. K., CLOUTIER S. C. & TRAN E. J. 2013. The DEAD-box protein Dbp2 functions with the RNA-binding protein Yra1 to promote mRNP assembly. *Journal of Molecular Biology*, 425, 3824-3838.
- MA W. K., PAUDEL B. P., XING Z., SABATH I. G., RUEDA D. & TRAN E. J. 2016. Recruitment, Duplex Unwinding and Protein-Mediated Inhibition of the Dead-Box RNA Helicase Dbp2 at Actively Transcribed Chromatin. *J Mol Biol*, 428, 1091-1106.
- MACGILVRAY M. E., SHISHKOVA E., PLACE M., WAGNER E. R., COON J. J. & GASCH A. P. 2020. Phosphoproteome Response to Dithiothreitol Reveals Unique Versus Shared Features of *Saccharomyces cerevisiae* Stress Responses. *J Proteome Res*, 19, 3405-3417.
- MAMIYA N. & WORMAN H. J. 1999. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *The Journal of biological chemistry*, 274, 15751-15756.
- MASON N., CIUFO L. F. & BROWN J. D. 2000. Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *The EMBO Journal*, 19, 4164-4174.
- MASSENET S. 2019. In vivo assembly of eukaryotic signal recognition particle: A still enigmatic process involving the SMN complex. *Biochimie*, 164, 99-104.
- MEDAGLI B. & ONESTI S. 2012. Structure and Mechanism of Hexameric Helicases. Vol. 767, pp. 75-95, Springer New York, New York, NY.
- MEISENHEIMER K. M. & KOCH T. H. 1997. Photocross-linking of nucleic acids to associated proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 32, 101-40.

- MERZ C., URLAUB H., WILL C. L. & LÜHRMANN R. 2007. Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein recruitment. *RNA*, 13, 116-128.
- MILANI L., PECCI A., CIFALDI C. & MAURIZII M. G. 2017. PL10 DEAD-Box Protein is Expressed during Germ Cell Differentiation in the Reptile *Podarcis sicula* (Family Lacertidae). *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 328, 433-448.
- MILLER C., SCHWALB B., MAIER K. *et al.* 2011. Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Molecular Systems Biology*, 7, 458.
- MOORE M. J. 2005. From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science*, 309, 1514-8.
- MORI M., TRIBOULET R., MOHSENI M. *et al.* 2014. Hippo Signaling Regulates Microprocessor and Links Cell-Density-Dependent miRNA Biogenesis to Cancer. *Cell*, 156, 893-906.
- MORTAZAVI A., WILLIAMS B. A., MCCUE K., SCHAEFFER L. & WOLD B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*, 5, 621-8.
- MOZAFFARI-JOVIN S., WANDERSLEBEN T., SANTOS K. F., WILL C. L., LÜHRMANN R. & WAHL M. C. 2013. Inhibition of RNA helicase Brr2 by the C-terminal tail of the spliceosomal protein Prp8. *Science*, 341, 80-84.
- NAGALAKSHMI U., WANG Z., WAERN K. *et al.* 2008. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science (New York, N.Y.)*, 320, 1344-1349.
- NAGY P. D. 2017. Exploitation of a surrogate host, *Saccharomyces cerevisiae*, to identify cellular targets and develop novel antiviral approaches. *Current opinion in virology*, 26, 132-140.
- NEVILLE M. & ROSBASH M. 1999. The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 18, 3746-3756.
- NYATHI Y., WILKINSON B. M. & POOL M. R. 2013. Co-translational targeting and translocation of proteins to the endoplasmic reticulum. *Biochimica et biophysica acta*, 1833, 2392-2402.
- OH S., FLYNN R. A., FLOOR S. N. *et al.* 2016. Medulloblastoma-associated DDX3 variant selectively alters the translational response to stress. *Oncotarget*, 7, 28169-82.
- OZGUR S., BUCHWALD G., FALK S., CHAKRABARTI S., PRABU J. R. & CONTI E. 2015. The conformational plasticity of eukaryotic RNA-dependent ATPases. *The FEBS journal*, 282, 850-863.
- PARSYAN A., SVITKIN Y., SHAHBAZIAN D. *et al.* 2011. mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12, 235-245.
- PASHEV I., DIMITROV S. & ANGELOV D. 1991a. Crosslinking proteins to nucleic acids by ultraviolet laser irradiation. *Trends in biochemical sciences*, 16, 323-6.
- PASHEV I. G., DIMITROV S. I. & ANGELOV D. 1991b. Crosslinking proteins to nucleic acids by ultraviolet laser irradiation. *Trends Biochem Sci*, 16, 323-6.
- PAUSE A. & SONENBERG N. 1992. Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *The EMBO journal*, 11, 2643-2654.
- PERUMAL K., GU J. & REDDY R. 2000. Evolutionary conservation of post-transcriptional 3' end adenylation of small RNAs: *S. cerevisiae* signal recognition particle RNA and U2 small nuclear RNA are post-transcriptionally adenylated. *Mol Cell Biochem*, 208, 99-109.
- PISAREV A. V., HELLEN C. U. & PESTOVA T. V. 2007. Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell*, 131, 286-99.
- PLASCHKA C., NEWMAN A. J. & NAGAI K. 2019. Structural Basis of Nuclear pre-mRNA Splicing: Lessons from Yeast. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11.

- POLITZ J. C., YAROVOI S., KILROY S. M., GOWDA K., ZWIEB C. & PEDERSON T. 2000. Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 55-60.
- POOL M. R. 2009. Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (Review). *Molecular Membrane Biology*, 22, 3-15.
- POOL M. R., STUMM J., FULGA T. A., SINNING I. & DOBBERSTEIN B. 2002. Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science*, 297, 1345-1348.
- PUTNAM A. A., GAO Z., LIU F., JIA H., YANG Q. & JANKOWSKY E. 2015. Division of Labor in an Oligomer of the DEAD-Box RNA Helicase Ded1p. *Molecular Cell*, 59, 541-552.
- PUTNAM A. A. & JANKOWSKY E. 2013. DEAD-box helicases as integrators of RNA, nucleotide and protein binding. *Biochimica et biophysica acta*, 1829, 884-893.
- PYLE A. M. 2008. Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases. *Annual review of biophysics*, 37, 317-336.
- QUINLAN A. R. & HALL I. M. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26, 841-842.
- RAJ S., BAGCHI D., ORERO J. V., BANROQUES J., TANNER N K. & CROQUETTE V. 2019. Mechanistic characterization of the DEAD-box RNA helicase Ded1 from yeast as revealed by a novel technique using single-molecule magnetic tweezers. *Nucleic Acids Research*, 47, 3699-3710.
- RAJYAGURU P., SHE M. & PARKER R. 2012. Scd6 targets eIF4G to repress translation: RGG motif proteins as a class of eIF4G-binding proteins. *Molecular cell*, 45, 244-254.
- RAPPSILBER J. 2011. The beginning of a beautiful friendship: cross-linking/mass spectrometry and modelling of proteins and multi-protein complexes. *J Struct Biol*, 173, 530-40.
- ROBINSON J. T., THORVALDSDÓTTIR H., WINCKLER W. *et al.* 2011. Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology*, 29, 24-26.
- RODAMILANS B. & MONTOYA G. 2007. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the DDX3 RNA helicase domain. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 63, 283-6.
- ROGERS G. W., JR., KOMAR A. A. & MERRICK W. C. 2002. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 72, 307-31.
- ROGERS G. W., JR., LIMA W. F. & MERRICK W. C. 2001. Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J Biol Chem*, 276, 12598-608.
- ROGERS G. W., JR., RICHTER N. J. & MERRICK W. C. 1999. Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem*, 274, 12236-44.
- ROSE M. A. & WEEKS K. M. 2001. Visualizing induced fit in early assembly of the human signal recognition particle. *Nature structural biology*, 8, 515-520.
- ROSENBLAD M. A., LARSEN N., SAMUELSSON T. & ZWIEB C. 2009. Kinship in the SRP RNA family. *RNA biology*, 6, 508-516.
- ROSENBLAD M. A., ZWIEB C. & SAMUELSSON T. 2004. Identification and comparative analysis of components from the signal recognition particle in protozoa and fungi. *BMC Genomics*, 5, 5.
- RÖSSLER O. G., STRAKA A. & STAHL H. 2001. Rearrangement of structured RNA via branch migration structures catalysed by the highly related DEAD-box proteins p68 and p72. *Nucleic acids research*, 29, 2088-2096.
- SANDBERG R., NEILSON J. R., SARMA A., SHARP P. A. & BURGE C. B. 2008. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science*, 320, 1643-7.

- SCHÄFER T., STRAUSS D., PETFALSKI E., TOLLERVEY D. & HURT E. 2003. The path from nucleolar 90S to cytoplasmic 40S pre-ribosomes. *The EMBO Journal*, 22, 1370-1380.
- SEGREF A., SHARMA K., DOYE V. *et al.* 1997. Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *The EMBO journal*, 16, 3256-3271.
- SEKIGUCHI T., IIDA H., FUKUMURA J. & NISHIMOTO T. 2004. Human DDX3Y, the Y-encoded isoform of RNA helicase DDX3, rescues a hamster temperature-sensitive ET24 mutant cell line with a DDX3X mutation. *Experimental Cell Research*, 300, 213-222.
- SEN N. D. 2016. eIF4B stimulates translation of long mRNAs with structured 5' UTRs and low closed-loop potential but weak dependence on eIF4G. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113, 10464-10472.
- SEN N. D., GUPTA N., K ARCHER S., PREISS T., LORSCH J. R. & HINNEBUSCH A. G. 2019. Functional interplay between DEAD-box RNA helicases Ded1 and Dbp1 in preinitiation complex attachment and scanning on structured mRNAs in vivo. *Nucleic Acids Research*.
- SEN N. D., ZHOU F., INGOLIA N. T. & HINNEBUSCH A. G. 2015. Genome-wide analysis of translational efficiency reveals distinct but overlapping functions of yeast DEAD-box RNA helicases Ded1 and eIF4A. *Genome research*, 25, 1196-1205.
- SENGOKU T., NUREKI O., NAKAMURA A., KOBAYASHI S. & YOKOYAMA S. 2006. Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein Drosophila Vasa. *Cell*, 125, 287-300.
- SENISSAR M., SAUX A. L., BELGAREH-TOUZÉ N., ADAM C., BANROQUES J. & TANNER N. K. 2014. The DEAD-box helicase Ded1 from yeast is an mRNP cap-associated protein that shuttles between the cytoplasm and nucleus. 42, 10005-10022.
- SHARMA D. & JANKOWSKY E. 2014. The Ded1/DDX3 subfamily of DEAD-box RNA helicases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 49, 343-360.
- SHARMA D., PUTNAM A. A. & JANKOWSKY E. 2017. Biochemical Differences and Similarities between the DEAD-Box Helicase Orthologs DDX3X and Ded1p. *Journal of Molecular Biology*, 429, 3730-3742.
- SHI H., CORDIN O., MINDER C. M., LINDER P. & XU R. M. 2004. Crystal structure of the human ATP-dependent splicing and export factor UAP56. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 17628-33.
- SHIH J. W., TSAI T. Y., CHAO C. H. & WU LEE Y. H. 2008. Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein. *Oncogene*, 27, 700-714.
- SIEPEL A., BEJERANO G., PEDERSEN J. S. *et al.* 2005. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res*, 15, 1034-50.
- SINGLETON M. R., DILLINGHAM M. S. & WIGLEY D. B. 2007. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 23-50.
- SLOAN K. E. & BOHNSACK M. T. 2018. Unravelling the Mechanisms of RNA Helicase Regulation. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 43, 237-250.
- SOKABE M. & FRASER C. S. 2017. A helicase-independent activity of eIF4A in promoting mRNA recruitment to the human ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114, 6304-6309.
- SOLEM A., ZINGLER N. & PYLE ANNA M. 2006. A DEAD Protein that Activates Intron Self-Splicing without Unwinding RNA. *Molecular Cell*, 24, 611-617.
- SONG H. & JI X. 2019. The mechanism of RNA duplex recognition and unwinding by DEAD-box helicase DDX3X. *Nature communications*, 10, 3085-3085.
- SONTHEIMER E. J. 1994. Site-specific RNA crosslinking with 4-thiouridine. *Molecular biology reports*, 20, 35-44.
- SOTO-RIFO R. & OHLMANN T. 2013. The role of the DEAD-box RNA helicase DDX3 in mRNA metabolism. *WTREs RNA*, 4, 369-385.

- SOTO-RIFO R., RUBILAR P. S., LIMOUSIN T., DE BREYNE S., DECIMO D. & OHLMANN T. 2012. DEAD-box protein DDX3 associates with eIF4F to promote translation of selected mRNAs. *EMBO J*, 31, 3745-56.
- SOTO-RIFO R., RUBILAR P. S. & OHLMANN T. 2013. The DEAD-box helicase DDX3 substitutes for the cap-binding protein eIF4E to promote compartmentalized translation initiation of the HIV-1 genomic RNA. 41, 6286-6299.
- STADE K., FORD C. S., GUTHRIE C. & WEIS K. 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, 90, 1041-50.
- STEINMETZ E. J., WARREN C. L., KUEHNER J. N., PANBEHI B., ANSARI A. Z. & BROW D. A. 2006. Genome-wide distribution of yeast RNA polymerase II and its control by Sen1 helicase. *Molecular Cell*, 24, 735-746.
- STEVENS S. W., RYAN D. E., GE H. Y. *et al.* 2002. Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Molecular Cell*, 9, 31-44.
- STRUB K., FORNALLAZ M. & BUI N. 1999. The Alu domain homolog of the yeast signal recognition particle consists of an Srp14p homodimer and a yeast-specific RNA structure. *RNA*, 5, 1333-1347.
- STRUB K. & WALTER P. 1990. Assembly of the Alu domain of the signal recognition particle (SRP): dimerization of the two protein components is required for efficient binding to SRP RNA. *Molecular and Cellular Biology*, 10, 777-784.
- STRUHL K. 1985. Nucleotide sequence and transcriptional mapping of the yeast *pet56-his3-ded1* gene region. 13, 8587-8601.
- STRZYZ P. 2017. The third route to the ER. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18, 3-3.
- SVITKIN Y. V., PAUSE A., HAGHIGHAT A. *et al.* 2001. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA (New York, N.Y.)*, 7, 382-394.
- TAKEIWA T., TANIGUCHI I. & OHNO M. 2015. Exportin-5 mediates nuclear export of SRP RNA in vertebrates. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 20, 281-291.
- TAKYAR S., HICKERSON R. P. & NOLLER H. F. 2005. mRNA helicase activity of the ribosome. *Cell*, 120, 49-58.
- TANNER N. K., CORDIN O., BANROQUES J., DOÈRE M. & LINDER P. 2003. The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Molecular Cell*, 11, 127-138.
- TANNER N. K. & LINDER P. 2001. DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Molecular Cell*, 8, 251-262.
- TARDIFF D. F., ABRUZZI K. C. & ROSBASH M. 2007. Protein characterization of *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase II after in vivo cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19948-53.
- THANDAPANI P., O'CONNOR T. R., BAILEY T. L. & RICHARD S. 2013. Defining the RGG/RG motif. *Mol Cell*, 50, 613-23.
- THEISSEN B., KAROW A. R., KÖHLER J., GUBAEV A. & KLOSTERMEIER D. 2008. Cooperative binding of ATP and RNA induces a closed conformation in a DEAD box RNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 548-553.
- THOMAS Y., BUI N. & STRUB K. 1997. A truncation in the 14 kDa protein of the signal recognition particle leads to tertiary structure changes in the RNA and abolishes the elongation arrest activity of the particle. *Nucleic Acids Research*, 25, 1920-1929.
- THOMSEN N. D. & BERGER J. M. 2008. Structural frameworks for considering microbial protein- and nucleic acid-dependent motor ATPases. *Molecular microbiology*, 69, 1071-1090.
- TIJERINA P., BHASKARAN H. & RUSSELL R. 2006. Nonspecific binding to structured RNA and preferential unwinding of an exposed helix by the CYT-19 protein, a DEAD-box RNA chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 16698-703.

- TYE B. K. 1999. MCM Proteins in DNA Replication. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 649-686.
- ULE J., JENSEN K., MELE A. & DARNELL R. B. 2005. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods (San Diego, Calif)*, 37, 376-386.
- VALENTIN-VEGA Y. A., WANG Y.-D., PARKER M. *et al.* 2016. Cancer-associated DDX3X mutations drive stress granule assembly and impair global translation. *Nature Chemical Biology*, 6, 25996-16.
- VALIENTE-ECHEVERRÍA F., HERMOSO M. A. & SOTO-RIFO R. 2015. RNA helicase DDX3: at the crossroad of viral replication and antiviral immunity. *Rev Med Virol*, 25, 286-99.
- VAN DER LEE R., BULJAN M., LANG B. *et al.* 2014. Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins. *Chemical Reviews*, 114, 6589-6631.
- VENEMA J. & TOLLERVEY D. 1999. Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, 33, 261-311.
- VOORHEES R. M., FERNÁNDEZ I. S., SCHERES S. H. & HEGDE R. S. 2014. Structure of the mammalian ribosome-Sec61 complex to 3.4 Å resolution. *Cell*, 157, 1632-43.
- VOORHEES R. M. & HEGDE R. S. 2015. Structures of the scanning and engaged states of the mammalian SRP-ribosome complex. *eLife*, 4, 1485.
- VOORHEES R. M. & HEGDE R. S. 2016. Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. *Science*, 351, 88.
- WALKER J. E., SARASTE M., RUNSWICK M. J. & GAY N. J. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *The EMBO journal*, 1, 945-951.
- WALKER S. E., ZHOU F., MITCHELL S. F. *et al.* 2013. Yeast eIF4B binds to the head of the 40S ribosomal subunit and promotes mRNA recruitment through its N-terminal and internal repeat domains. *RNA*, 19, 191-207.
- WALTER P. & BLOBEL G. 1981. Translocation of Proteins Across the Endoplasmic Reticulum I. Signal Recognition Protein (SRP) Binds to In-Vitro- Assembled Polysomes Synthesizing Secretory Protein *cell biol*, 1-6.
- WANG C., SCHMICH F., SRIVATSA S., WEIDNER J., BEERENWINKEL N. & SPANG A. 2018. Context-dependent deposition and regulation of mRNAs in P-bodies. *eLife*, 7, e29815.
- WATSON J. D. & CRICK F. H. C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 737-738.
- WELLS S. E., HILLNER P. E., VALE R. D. & SACHS A. B. 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell*, 2, 135-40.
- WEST S. C. 1996. The RuvABC proteins and Holliday junction processing in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178, 1237-1241.
- WHEELER E. C., VAN NOSTRAND E. L. & YEO G. W. 2018. Advances and challenges in the detection of transcriptome-wide protein-RNA interactions. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 9, e1436.
- WILD K., JUAIRE K. D., SONI K. *et al.* 2019. Reconstitution of the human SRP system and quantitative and systematic analysis of its ribosome interactions. *Nucleic Acids Research*, 47, 3184-3196.
- WILL C. L. & LUHRMANN R. 2001. Molecular biology. RNP remodeling with DExH/D boxes. *Science*, 291, 1916-1917.
- WOOLFORD J. L., JR. & BASERGA S. J. 2013. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 195, 643-81.
- WU Y. 2012. Unwinding and rewinding: double faces of helicase? *Journal of nucleic acids*, 2012, 140601.
- XU L., WANG L., PENG J. *et al.* 2017. Insights into the Structure of Dimeric RNA Helicase CsdA and Indispensable Role of Its C-Terminal Regions. *Structure*, 25, 1795-1808.e5.

- YANG Q., DEL CAMPO M., LAMBOWITZ A. M. & JANKOWSKY E. 2007. DEAD-box proteins unwind duplexes by local strand separation. *Mol Cell*, 28, 253-63.
- YANG Q. & JANKOWSKY E. 2005. ATP- and ADP-dependent modulation of RNA unwinding and strand annealing activities by the DEAD-box protein DED1. *Biochemistry*, 44, 13591-13601.
- YANG Q. & JANKOWSKY E. 2006. The DEAD-box protein Ded1 unwinds RNA duplexes by a mode distinct from translocating helicases. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 981-6.
- YARUNIN A., PANSE V. G., PETFALSKI E., DEZ C., TOLLERVEY D. & HURT E. C. 2005. Functional link between ribosome formation and biogenesis of iron-sulfur proteins. *The EMBO Journal*, 24, 580-588.
- YEDAVALLI V. S. R. K., NEUVEUT C., CHI Y.-H., KLEIMAN L. & JEANG K.-T. 2004. Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell*, 119, 381-392.
- YOURIK P., AITKEN C. E., ZHOU F., GUPTA N., HINNEBUSCH A. G. & LORSCH J. R. 2017. Yeast eIF4A enhances recruitment of mRNAs regardless of their structural complexity. *eLife*, 6, e31476.
- ZHANG X. & SHAN S.-O. 2014. Fidelity of cotranslational protein targeting by the signal recognition particle. *Annual review of biophysics*, 43, 381-408.
- ZHOU Z., LICKLIDER L. J., GYGI S. P. & REED R. 2002. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*, 419, 182-185.
- ZWIEB C., VAN NUES R. W., ROSENBLAD M. A., BROWN J. D. & SAMUELSSON T. 2005. A nomenclature for all signal recognition particle RNAs. *RNA*, 11, 7-13.

Annexe

*La meilleure façon de réaliser ses
rêves est de se réveiller*

Paul Valéry

Annexe

| Motif ou Domaine ^a | Mutation | Délétion | Système | Effet ^b | Référence |
|-------------------------------|---|---|----------------------------------|---|--|
| / | / | / | <i>In vivo</i> | Létal si surexprimée Localisation cyto (WT) Localisation FC (si Δ glucose ou surexprimée) | Chuang <i>et al.</i> , 1997 Beckham <i>et al.</i> , 2008 Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT | / | Motif NES | <i>In vivo</i> | Viable | Floor <i>et al.</i> , 2016 |
| ENT | / | Motif Eif4E | <i>In vivo</i> | Viable | Floor <i>et al.</i> , 2016 |
| ENT | / | ENT | <i>In vivo</i> – <i>In vitro</i> | Viable, CS, TS Diminution activité enzymatique | Floor <i>et al.</i> , 2016 Gupta <i>et al.</i> , 2018 |
| ECT | / | ECT | <i>In vivo</i> – <i>In vitro</i> | Viable, CS, TS – Diminution de l'activité de déroulement Diminution de l'activité ATPase | Floor <i>et al.</i> , 2016; Yang et Jankowsky, 2005 Hauk <i>et al.</i> , 2015 Hilliker <i>et al.</i> , 2011 Gupta <i>et al.</i> , 2018 |
| ENT + ECT | / | ENT + ECT | <i>In vivo</i> | Létal | Banroques <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT | / | Δ2-90 | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Gulay <i>et al.</i> , 2020 |
| ENT | / | Δ11-20 Δ31-40 Δ41-50 Δ51-60 Δ61-70 Δ71-80 Δ11-20 Δ81-90 Δ91-100 Δ101-110 | <i>In vivo</i> | Viable | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT | / | Δ1-30 | <i>In vivo</i> | Viable. Localisation noyau + cytoplasme | Scnissar <i>et al.</i> , 2014 |
| ENT | / | Δ1-116 | <i>In vivo</i> – <i>In vitro</i> | Viable, CS Activité ATPases quasi absente | Gao <i>et al.</i> , 2016 Gulay <i>et al.</i> , 2020 |
| ENT | / | Δ21-27 Δ111-118 Δ119-122 | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT | / | Δ125-134 | <i>In vivo</i> | Létal | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT-D1 | / | Δ141-150 | <i>In vivo</i> | Létal. Localisation FC (Δ glucose) | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| D1 | / | Δ151-160 | <i>In vivo</i> | Létal | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| D2 | / | Δ497-504 | <i>In vivo</i> | Létal. Localisation FC (Δ glucose) | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ECT | / | Δ507-514 Δ517-529 | <i>In vivo</i> | Létal | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ECT | / | Δ531-540 Δ536-557 Δ541-550 Δ554-557 Δ561-570 Δ531-540 | <i>In vivo</i> | Viable | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ECT | / | Δ562-604 | <i>In vivo</i> | Viable | Gulay <i>et al.</i> , 2020 |
| ECT | / | Δ536-604 | <i>In vitro</i> | Diminution de l'activité de déroulement | Gao <i>et al.</i> , 2016 Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT | Y21A | / | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT | V22A P23A P24A H25A L26A R27A P138A | / | <i>In vivo</i> | Viable | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| D1 | F144L | / | <i>In vivo</i> | Viable | Cordin <i>et al.</i> , 2004 |
| D1 | F144A ****E | / | <i>In vivo</i> | Létal | Cordin <i>et al.</i> , 2004 |
| D1 | F144A | / | <i>In vivo</i> | Létal à 37°C, CS | Floor <i>et al.</i> , 2016 |
| D1 | I157A | / | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Floor <i>et al.</i> , 2016 |
| D1 - Motif-Q | Q169A | / | <i>In vivo</i> – <i>In vitro</i> | Létal – Activité ATPase ~29%, activité hélicase ~1% | Tanner <i>et al.</i> , 2003; Cordin <i>et al.</i> , 2004 |
| D1 - Motif-Q | Q169E | / | <i>In vivo</i> – <i>In vitro</i> | Létal – Activité ATPase ~1,2%, activité hélicase ~3% | Tanner <i>et al.</i> , 2003; Cordin <i>et al.</i> , 2004 |
| D1 - Motif-Q | F162L | / | <i>In vivo</i> – <i>In vitro</i> | Viable – Activité ATPase ~55%, activité hélicase ~20% | Cordin <i>et al.</i> , 2004 |
| D1 - Motif-Q | F162A | / | <i>In vivo</i> – <i>In vitro</i> | Létal – Activité ATPase ~9,3%, activité hélicase ~4% | Cordin <i>et al.</i> , 2004 |
| D1 - Motif-Q | F162C | / | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Cordin <i>et al.</i> , 2004 Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| D1 - Motif-Q | T166A | / | <i>In vivo</i> – <i>In vitro</i> | Viable – Activité ATPase ~56%, activité hélicase | Scnissar <i>et al.</i> , 2014 Cordin <i>et al.</i> , 2004 |

| | | | | | |
|----------------------|--|---|----------------------------------|--|---|
| | | | | ~40% | |
| D1 - Motif-Q | T166S | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable, CS _ activité ATPase ~51%, activité hélicase ~16% | Cordin <i>et al.</i> , 2004 |
| D1 - Motif-Q | T166Q | / | <i>In vivo</i> | Viable, TS | Cordin <i>et al.</i> , 2004 |
| D1 | V173A | / | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Floor <i>et al.</i> , 2016 |
| D1 - Motif-I | S190C | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable _ Réduction de l'activité hélicase _ mutant sensible à un électrophile | Barkovich <i>et al.</i> , 2018 |
| D1 - Motif-I (GAT) | K192A | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable _ Pas d'activité ATPase. Faible affinité à l'ARN | Cordin <i>et al.</i> , 2004 Hilliker <i>et al.</i> , 2014 |
| D1 - Motif-II (DAAD) | E307A | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Létal Localisation FC (si surexprimée ou Δ glucose, sinon cyto) Pas d'activité ATPase (défaut de liaison à l'ATP) | Iost <i>et al.</i> , 1999 Hilliker <i>et al.</i> , 2011 Beckham <i>et al.</i> , 2008 Gupta <i>et al.</i> , 2018 Aryanpur <i>et al.</i> , 2017 |
| D1 - Motif-II (DQAD) | E307Q | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Létal. Localisation dans FC. Pas d'activité ATPase | Senissar <i>et al.</i> , 2014 Données non publiée |
| D1 - Motif-III | S341T ****G | / | <i>In vivo</i> | Viable | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | S341A | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable. Activité ATPase ~55% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | S341C | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable. Activité ATPase ~24% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | S341L | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Létal à 18°C, TS, croissance lente à 30°C. Activité ATPase ~12% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | S341M ****H ****Q | / | <i>In vivo</i> | Létal à 18°C, TS, croissance lente à 30°C | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | S341D ****P ****R | / | <i>In vivo</i> | Létal | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | T343S | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable. Activité ATPase ~26% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | T343C | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable, CS. Activité ATPase ~6,8% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | T343A | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Létal. Activité ATPase ~5,6% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | T343I | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Létal. Activité ATPase ~6,9% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 - Motif-III | T343E ****F ****K ****M ****N ****Y | / | <i>In vivo</i> | Létal | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| Motif-III | A342G | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Létal à 18°C, TS. Activité ATPase ~8% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 | Y359H | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable. Activité ATPase ~320% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 | Y359N | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable. Activité ATPase ~110% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 | Y359K | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable. Activité ATPase ~130% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 | Y359P | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable. Activité ATPase ~150% | Banroques <i>et al.</i> , 2010 |
| D1 | G368N | / | <i>In vivo</i> | Viable, CS. Souche <i>ded1-199</i> | Chuang <i>et al.</i> , 1997 Burckin <i>et al.</i> , 2005 |
| D1 - Motif-IV | F405Y | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable, CS _ Activité ATPase ~10% | Banroques <i>et al.</i> , 2008 |
| D1 - Motif-IV | F405M | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable, CS _ Activité ATPase ~7% | Banroques <i>et al.</i> , 2008 |
| D1 - Motif-IV | F405L | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable, CS _ Activité ATPase ~3% | Banroques <i>et al.</i> , 2008 |
| D1 - Motif-IV | F405C | / | <i>In vivo</i> | Létal à 36 et 18°C, croissance très lente à 30°C | Banroques <i>et al.</i> , 2008 Hilliker <i>et al.</i> , 2011 Senissar <i>et al.</i> , 2014 |
| D1 - Motif-IV | F405A | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Létal _ Activité ATPase moins de 1% | Banroques <i>et al.</i> , 2008 |
| D1 - Motif-IV | R486A | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable _ Activité ATPase ~ 20% | Banroques <i>et al.</i> , 2008 |
| D1 - Motif-IV | F405W | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Létal _ Activité ATPase moins de 1% | Banroques <i>et al.</i> , 2008 |
| D1 - Motif-IV | T408I | / | <i>In vivo</i> _ <i>In vitro</i> | Viable, CS. Souche <i>ded1-95</i> Altère liaison à l'ARN | Burckin <i>et al.</i> , 2005 Gao <i>et al.</i> , 2016 Guenther <i>et al.</i> , 2018 |
| D1 - Motif-VI | R489A | / | <i>In vivo</i> | Létal. Localisation FC (si surexprimé ou Δ glucose) | Iost <i>et al.</i> , 1999 Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| D1 + D2 | G108N + G494N | / | <i>In vivo</i> | Viable, CS. Souche <i>ded1-120</i> | Chuang <i>et al.</i> , 1997 Burckin <i>et al.</i> , 2005 Sen <i>et al.</i> , 2015 |

Annexe

| | | | | | |
|-----------|---------------|--|----------------|---|--|
| D1 + D2 | T408I + W253R | / | <i>In vivo</i> | Viable, TS. Souche <i>ded1-952</i> Croissance lente à 34°C | Sen <i>et al.</i> , 2015 Gulay <i>et al.</i> , 2020 Gupta <i>et al.</i> , 2019 |
| ENT | / | $\Delta 21-27$ $\Delta 119-122$ | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT + ECT | / | $\Delta 21-27$ $\Delta 531-540$ | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |
| ENT + ECT | / | $\Delta 21-27$ $\Delta 119-122$ $\Delta 531-540$ | <i>In vivo</i> | Viable, CS | Hilliker <i>et al.</i> , 2011 |

^a: D1: domaine 1, ENT: extrémité N-terminale, ECT: extrémité C-terminale

^b: CS: sensible au froid, TS: sensible au chaud, FC : foci cellulaires, cyto : cytoplasme

RÉSUMÉ

L'hélicase à ARN à boîte DEAD, Ded1, est une protéine essentielle de levure impliquée dans l'initiation de la traduction. La protéine humaine DDX3 et des protéines appartenant à d'autres organismes complètent une souche de levure délétée pour le gène *DED1* endogène, démontrant un fort degré de conservation fonctionnelle. De plus, DDX3 est impliquée dans l'oncogenèse et la réplication virale. *In vitro*, la protéine Ded1 purifiée lie l'ARN en présence d'ATP et a une activité ATPase dépendante de l'ARN, mais elle manque de spécificité de substrat et de régulation enzymatique. Nous avons précédemment montré que Ded1 est un facteur associé au cap qui fait la navette entre le noyau et le cytoplasme et colocalise avec des foci cellulaires. Pour mieux comprendre le(s) rôle(s) de Ded1 dans la cellule, nous avons identifié les ARN qui lui sont associés. Pour cela, nous avons utilisé la technique de PAR-CLIP modifiée (réticulation et immunoprécipitation améliorées par un ribonucléoside photoactivable) qui utilise des UV longs (UV-A) car nous avons constaté que Ded1 est rapidement dégradée avec des UV courts (UV-C), classiquement utilisée, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Nos résultats indiquent que Ded1 interagit préférentiellement avec un sous-ensemble d'ARNm et ne montrent aucune corrélation avec la longueur des UTR ou des régions codantes, ni avec l'abondance des transcrits. Ded1 interagit principalement avec certains ARNm codant pour des protéines impliquées dans la traduction. De plus, par des techniques de génétique de la levure, de localisation *in situ* et par les approches biochimiques *in vitro*, nous avons trouvé que Ded1 est associée et régulée par la particule de reconnaissance du signal (SRP), qui est un complexe ribonucléoprotéique universellement conservé nécessaire à la translocation co-traductionnelle des polypeptides dans la lumière du réticulum endoplasmique et la membrane. Nos résultats indiquent que Ded1 est physiquement associée aux composants de la SRP *in vivo* et *in vitro* et est génétiquement liée aux protéines de la SRP. Enfin, l'activité enzymatique de Ded1 est inhibée par la Srp21 en présence de l'ARN de la SRP, SCR1. Nous proposons un modèle où Ded1 participe activement à la translocation des protéines lors de la traduction et nous établissons une nouvelle compréhension du rôle cellulaire de Ded1 lors de l'étape de l'élongation de la traduction.

MOTS CLÉS

Ded1/DDX3, Boîte DEAD, ARN hélicase, ATPase, SRP, Traduction

ABSTRACT

The DEAD-box RNA helicase Ded1 is an essential yeast protein involved in translation initiation. Mammalian DDX3 and related proteins from other organisms complement a yeast strain deleted for the endogenous *DED1* gene, which demonstrates a high degree of functional conservation. Moreover, DDX3 is implicated in oncogenesis and viral replication. *In vitro*, the purified Ded1 protein is an ATP-dependent RNA binding protein and an RNA-dependent ATPase, but it lacks RNA substrate specificity and enzymatic regulation. We have previously found that Ded1 is a cap-associated factor that actively shuttles between the nucleus and cytoplasm and colocalized with cellular foci. We studied the role(s) of Ded1 in the cell by characterizing its RNA substrates. For that, we used a modified PAR-CLIP (Photoactivable Ribonucleoside-enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation) technique that uses long UV light (UV-A) because we find that Ded1 is rapidly degraded, both *in vitro* and *in vivo*, with short UV light (UV-C) that is typically used. Our results indicate that Ded1 preferentially interacts with a subset of mRNAs that show no correlation with the length of the UTR or coding regions, or with the mRNA abundance. Ded1 interacts mostly with certain mRNAs encoding proteins involved in translation. Moreover, we find by yeast genetics, *in situ* localization and *in vitro* biochemical approaches that Ded1 is associated with and regulated by the signal recognition particle (SRP), which is a universally conserved ribonucleoprotein complex required for the cotranslational translocation of polypeptides into the endoplasmic reticulum lumen and membrane. Ded1 is physically associated with SRP components *in vivo* and *in vitro*. Ded1 is genetically linked with SRP proteins. Finally, the enzymatic activity of Ded1 is inhibited by SRP21 with SRP RNA, SCR1. We propose a model where Ded1 actively participates in the translocation of proteins during translation and we open a new comprehension of the cellular role of Ded1 during translation.

KEYWORDS

Ded1/DDX3, DEAD-box, RNA helicase, ATPase, SRP, Translation