



HAL
open science

Protéines infectieuses chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*: un mal pour un bien? Modulation de la propagation de prions de levure par le protéasome et les chaperons moléculaires durant la transition diauxique et la phase stationnaire

Kai Wang

► **To cite this version:**

Kai Wang. Protéines infectieuses chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*: un mal pour un bien? Modulation de la propagation de prions de levure par le protéasome et les chaperons moléculaires durant la transition diauxique et la phase stationnaire. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT: 2016SACLS212 . tel-01885490

HAL Id: tel-01885490

<https://theses.hal.science/tel-01885490>

Submitted on 2 Oct 2018

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.

NNT : 2016SACLS212

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PARIS-SACLAY
PREPAREE A
L'UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE N°568
Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie

Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé

Par

M. Kai WANG

**Protéines infectieuses chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* : un mal pour un bien ?
Modulation de la propagation de prions de levure par le protéasome et les chaperons
moléculaires durant la transition diauxique et la phase stationnaire**

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 27 septembre 2016 :

Composition du Jury :

M. Marc LE MAIRE, Professeur, Université Paris-Sud, Président du Jury
Mme. Isabelle SAGOT, Directrice de Recherches, CNRS, Rapporteur
Mme. Anna BABOUR, Chargée de Recherches, INSERM, Rapporteur
Mme. Véronique ALBANESE, Chargée de Recherches, CNRS, Examineur
M. Mehdi KABANI, Chargé de Recherches, CNRS, Directeur de thèse





Remerciements

Cette thèse a été financée par une allocation doctorale du Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche attribuée par l'école doctorale Signalisations et Réseaux Intégratifs en Biologie (Biosigne). La première moitié de la thèse a été effectuée au Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales (LEBS) et la deuxième moitié à l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay (Neuro-PSI). J'exprime ma gratitude à l'école doctorale, à l'Université Paris-Sud et à ces deux laboratoires.

Mes plus vifs remerciements vont à mon directeur de thèse Mehdi Kabani, pour la confiance et le temps qu'il m'a accordé pendant ces trois ans de thèse.

Un grand merci à Ronald Melki, Le Big-Boss, je suis sincèrement reconnaissant de ton aide et du temps que tu m'as consacré.

J'adresse mes remerciements à Mesdames Isabelle Sagot, Anna Babour, Véronique Albanèse et à Monsieur Marc Le Maire pour avoir accepté d'évaluer mon travail et faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie les membres de l'équipe « Repliement et agrégation des protéines dans les maladies neurodégénératives » pour leur sympathie et leur soutien : Luc Bousset, Virginie Redeker, Elodie Monsellier, Karine Madiona, Audrey Coens, Laura Pieri, Alexis Fenyi, Emilie Caroux, ainsi que les anciens membres du laboratoire : Gemma Ruiz-Arlandis, Clémence Brewée et de nombreux stagiaires que je n'ai pas mentionnés ici.

Merci à l'équipe administrative de NeuroPSI et du LEBS, en particulier Jeanne Triki, Angélique Nicolas, Maud Grenet et Odile Lecquyer, pour votre gentillesse, votre efficacité et votre professionnalisme.

Je tiens également à remercier Tracy Bellande (LEBS, Neuro-PSI), Patricia Villeneuve (Neuro-PSI) ainsi que Corinne Foucault (LEBS) pour la préparation des nombreux milieux (et pour les cure-dents !).

Je souhaite remercier mes parents qui m'ont soutenu financièrement et spirituellement pendant mes études en France. Vous êtes pour moi une source d'encouragement et de

bénédictio indispensable dans ma vie. Et aussi mon petit frère et ma petite sœur qui sont toujours pour moi les trésors précieux dans ma vie. Je n'oublie pas mes grands-parents qui nous ont quittés pendant ma thèse. C'est mon seul regret d'être venu en France...

(我感谢我的父母对我在法国留学期间给予我的经济上的和精神上的支持。你们是一直以来鼓励我支持我让我能够支撑到最后的动力。同时也感谢我的弟弟和妹妹。你们是我这一生的珍宝。我会永远铭记我的爷爷奶奶。他们在我读博士期间离开了我。这是我来法国唯一的遗憾。)

Et finalement je remercie mes amis : Jishun (马吉顺) et Yuting (王雨亭), vous êtes toujours mon appui puissant même si vous êtes en Chine. Xue (王雪), Thierry et Can (刘灿), how wonderful that you are now in my life! Yan (曹陆艳), la fille la plus cool du monde, tu es mon amour spirituel. Zheng (耿正), maintenant tu es une étoile dans le ciel et j'espère que tu sais qu'on ne t'a pas oublié. Najib, merci pour m'avoir offert le livre « La levure » de monsieur Pierre Thuriaux. Et merci également à Sheng (马胜), Jinhua (王金华), Thomas, Diego, Apolline, Pierre, Martí et tous les autres que je ne peux mentionner ici. La vie ne serait pas complète sans vous.

Un grand merci encore une fois à toutes et à tous et pour tout. Cette thèse a été une très belle expérience autant professionnelle qu'humaine.

Merci infiniment.

Liste des abréviations

AD	Maladie d'Alzheimer
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
APOD	age-associated protein deposit (dépôt protéique associé au vieillissement)
ARNm	acide ribonucléique de messenger
ARNt	acide ribonucléique de transfert
ATCase	Aspartate carbamoyltransférase
ATP	adénosine-5-triphosphate
CFU	colony forming units (nombre de cellules pouvant former des colonies)
CLS	chronological lifespan (vieillesse chronologique)
CP	cœur protéolytique du protéasome 26S
CQP	Contrôle-Qualité des Protéines
CTP	cytosine triphosphate
ME	Microscopie Electronique
RE	Réticulum Endoplasmique
ERC	cerce d'ANDr extrachromosomique
eRF	eukaryotic translational release factor (facteur de terminaison traductionnelle eucaryote)
EYFP	enhanced yellow fluorescence protein (protéine fluorescente jaune améliorée)
FU	fluorouracile
GDP	guanosine diphosphate
GFP	green fluorescence protein (protéine fluorescente verte)
GMP-PNP	guanylyl-imidodiphosphate
GST	glutathion S-transférase
GTP	guanosine triphosphate
HD	Maladie de Huntington
HSG	heat shock granule (granule de shock thermique)
HSP	Heat-Shock Protein (protéine de shock thermique)
INQ	intranuclear quality control compartment (compartiment de contrôle qualité intranucléaire)
IPOD	insoluble protein deposit (dépôt des protéines insolubles)
JUNQ	Juxtenuclear quality control compartment (compartiment de contrôle qualité juxtanucléaire)

NAC	nascent-chain-associated complex (complexe associé à la chaîne polypeptide naissante)
NCR	Nitrogen Catabolite Repression (répression des catabolites d'azote)
NEF	nucleotide exchange factor (facteur d'échange des nucléotides)
NTP	nucléoside triphosphate
prion	pr oteinaeous in fectious particle (particule infectieuse protéique)
PD	Maladie de Parkinson
pH	potentiel hydrogène
PrD	prion forming domain (domaine prion)
PSG	proteasome storage granule (granule de stockage protéasomal)
RAC	ribosome-associated complex (complexe associé au ribosome)
RLS	replicative lifespan (vieillessement répliatif)
ROS	Reactive Oxygen Species (dérivés réactifs de l'oxygène)
RP	particule régulatrice du protéasome 26S
SD/SC	synthetic defined / synthetic complete medium (milieu synthétique de levure)
STEM	Scanning Transmission EM (microscope électronique à balayage par transmission)
TF	trigger factor (facteur de déclenchement)
Ub	ubiquitine
UPS	système ubiquitine-protéasome
USA	uréidosuccinate
VHL	Von Hippel Lindau protein (protéine Von Hippel Lindau)
YPD	Yeast Peptone Dextrose (milieu riche pour la culture des levures)

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	I
LISTE DES ABREVIATIONS.....	III
TABLE DES MATIERES.....	V
AVANT-PROPOS.....	XI
INTRODUCTION.....	1
1 Contrôle-qualité des protéines	3
1.1 La protéostase cellulaire	3
1.2 Repliement et agrégation protéique.....	5
1.3 Les chaperons moléculaires	7
1.3.1 Généralités sur les chaperons moléculaires.....	7
1.3.2 Activités des chaperons moléculaires dans le cytosol	8
1.3.3 Les différentes familles de chaperons moléculaires liées à cette étude.....	10
1.3.3.1 Le système Hsp70.....	11
1.3.3.2 Hsp104.....	13
1.4 Le système ubiquitine-protéasome.....	15
1.4.1 Ubiquitination des protéines.....	15
1.4.2 Organisation structurale du protéasome 26S	16
1.4.3 Fonctions du système ubiquitine-protéasome (UPS).....	17
2 Agrégation des protéines et vieillissement chez la levure	19
2.1 Croissance cellulaire de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.1.1 Croissance et division cellulaire	19
2.1.2 Les phases de croissance de la levure	21
2.1.2.1 Conditions de croissance en laboratoire.....	21
2.1.2.2 Les phases de croissance.....	21
2.1.2.3 Originalité de la croissance de <i>S. cerevisiae</i>	22
2.1.3 Phase stationnaire et quiescence.....	23
2.1.3.1 Caractéristiques des cellules en phase stationnaire	23
2.1.3.2 Les levures en quiescence	24
2.1.3.3 Les marqueurs de la quiescence	26
2.2 Vieillissement de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27

2.2.1	La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , un modèle de recherche sur le vieillissement....	27
2.2.1.1	La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , un modèle de cellule eucaryote.....	27
2.2.1.2	Vieillessement de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : un modèle biologique du vieillissement des cellules eucaryotes.....	28
2.2.2	Notions de vieillissement répliatif et chronologique	28
2.2.3	Marqueurs du vieillissement	30
2.2.3.1	Les marqueurs du vieillissement.....	30
2.2.3.2	Les marqueurs de vieillissement sont asymétriquement distribués entre les cellules mères et les cellules filles.....	31
2.3	Liens entre agrégation des protéines et vieillissement chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.3.1	Les différents type d'agrégats protéiques dans les cellules.....	33
2.3.2	Effet des agrégats protéiques sur le vieillissement.....	34
3	Les protéines prions chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
3.1	Généralités sur les prions de levure.....	39
3.1.1	Les prions, agents infectieux de nature protéique.....	39
3.1.2	Les prions de levure, un modèle d'étude des protéines infectieuses.....	40
3.2	Les prions [<i>PSI</i> ⁺] et [<i>URE3</i>] chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.2.1	Les protéines prions Sup35p et Ure2p.....	41
3.2.2	Fonctions et phénotypes [<i>PSI</i> ⁺] et [<i>URE3</i>]	43
3.2.2.1	La terminaison de la traduction médiée par Sup35p et le phénotype [<i>PSI</i> ⁺].....	43
3.2.2.2	La régulation du catabolisme azoté par Ure2p et le phénotype [<i>URE3</i>].....	44
3.2.3	Etudes structurales des assemblages fibrillaires de Sup35p et de Ure2p.....	47
3.2.3.1	Prions et amyloïdes	47
3.2.3.2	Etudes structurales des fibres de Sup35p.....	49
3.2.3.3	Etudes structurales des fibres de Ure2p	51
3.2.4	Les souches de prions [<i>PSI</i> ⁺] et [<i>URE3</i>].....	53
3.3	La répliation et la propagation des protéines prions chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
3.3.1	Modèles de répliation des protéines prions.....	55
3.3.2	Modèle de propagation des prions de levure	57
3.4	Les chaperons moléculaires et le système ubiquitine-protéasome dans la formation et la propagation des prions	60
3.4.1	Chaperons moléculaires et propagation des prions de levure	61
3.4.1.1	Chaperons moléculaires et formation <i>de novo</i> des prions de levure	61

3.4.1.2	Chaperons moléculaires et propagation des prions de levure	62
3.4.2	Le système ubiquitine-protéasome et la dégradation des protéines prions	65
3.5	Les autres protéines prions chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
3.6	Les effets biologiques des prions de levure	71
3.6.1	Arguments en faveur d'un rôle physiologique des prions de levure	71
3.6.1.1	Existence d'amyloïdes fonctionnels	71
3.6.1.2	[<i>PSI</i> ⁺] et [<i>PIN</i> ⁺] sont retrouvés dans la nature	72
3.6.1.3	[<i>PSI</i> ⁺] confère de nouveaux phénotypes	72
3.6.1.4	Les prions de levure, une réponse adaptative aux changements environnementaux	73
3.6.2	Arguments soutenant l'hypothèse que les prions de levure sont des entités délétères	74
3.6.2.1	Les prions de levures sont très peu présents dans la nature	74
3.6.2.2	La plupart des souches de [<i>PSI</i> ⁺] seraient létales	75
3.6.2.3	D'autres preuves de toxicité des prions de levure	75
	OBJECTIF.....	77
	RESULTATS.....	79
	I, Résultats 1.....	81
I.I	Article 1: The 26S proteasome degrades the soluble but not the fibrillar form of the yeast prion Ure2p <i>In vitro</i>	83
I.II	Effets des chaperons moléculaires sur la dégradation protéasomale de la protéine prion Sup35p.....	107
	II, Résultats 2.....	113
II.I	Article 2: A prolonged chronological lifespan is an unexpected benefit on the [<i>PSI</i> ⁺] prion in yeast.....	115
II.II	Les limites de l'utilisation de fusion GFP pour l'étude de [<i>PSI</i> ⁺].....	141
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	145
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	155

Figures

Figure 1. Réseau protéostasique. (Figure adaptée de Balch et al., 2008)	4
Figure 2 Paysage énergétique du repliement protéique. (Kim et al., 2013)	7
Figure 3 Activité des chaperons moléculaires dans le cytosol chez les procaryotes (A) et les eucaryotes (B) (Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Kim et al., 2013)	9
Figure 4 Structure de Hsp70	12
Figure 5 Cycle de réaction du système Hsp70-Hsp40-NEF (Kim et al., 2013; Mayer, 2010).....	13
Figure 6 Organisation structurale et mode d'action de Hsp104 (Grimminger-Marquardt and Lashuel, 2010; Mayer, 2010)	14
Figure 7 Représentation schématique de l'ubiquitination (Tsakiri and Trougakos, 2015)	16
Figure 8 Le protéasome 26S de levure (modélisation par cryo-microscopie électronique tirée de (Lasker et al., 2012))	17
Figure 9 Cycle cellulaire des levures	20
Figure 10 Croissance de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en milieu riche.	23
Figure 11 Purification des cellules de levure quiescentes. (Allen et al., 2006).....	25
Figure 12 Images représentatives des cicatrices de bourgeonnements	29
Figure 13 Rétention asymétrique des marqueurs de vieillissement dans les cellules mères au cours du vieillessement. (Denoth Lippuner et al., 2014).....	31
Figure 14 Représentation schématique du vieillissement répliatif chez la levure. (Denoth Lippuner et al., 2014)	32
Figure 15 CQP équilibré versus CQP effondré. (Balchin et al., 2016).....	35
Figure 16 Organisation structurale des protéines prions Sup35p et Ure2p chez la levure <i>S. cerevisiae</i> (Kabani and Melki, 2011)	42
Figure 17 Système rapporteur permettant de visualiser la présence du prion $[PSI^+]$ chez la levure <i>S. cerevisiae</i> . (Crédit photo : Gary W. Jones)	44
Figure 18 La croissance de cellules <i>ura2Δ</i> en présence d'uréidosuccinate dépend de l'activité de Ure2p. (Figure adaptée de la thèse de Jimmy Savistchenko, 2008).....	45
Figure 19 Système rapporteur permettant de visualiser la présence du prion $[URE3]$ chez la levure <i>S. levure</i> (Figure adaptée de (Schlumpberger et al., 2001)). (Crédit photo : Gary W. Jones)	46
Figure 20 Structure de fibres amyloïdes (Greenwald and Riek, 2010).....	47
Figure 21 Les différents arrangements structuraux proposés pour les filaments amyloïdes. (adaptée de la figure 1 de Shewmaker et al., 2011).....	49
Figure 22 Comparaison de la structure secondaire du cœur amyloïde des fibres de Sup35NM (haut) et de Sup35p entière (bas) étudiée par RMN du solide (Luckgei et al., 2013).....	50
Figure 23 Modèles de l'organisation structurale proposées pour les fibres de Ure2p (Kajava et al., 2004; Loquet et al., 2009)	52
Figure 24 Les souches du prion $[PSI^+]$	54
Figure 25 Modèles de réplication des protéines prions. (Aguzzi and Calella, 2009; Bousset and Melki, 2005; Brundin et al., 2010)	56
Figure 26 Modèle de propagation des protéines prions chez la levure. (Kabani and Melki, 2015, 2016)	58
Figure 27 Présentation schématique de la transformation de sphéroplastes par introduction de matériel infectieux exogène (A) et de la cytoduction (B). (Halfmann et al., 2012a; King et al., 2006; Tanaka, 2010; Zakharov and Yarovoy, 1977).....	60
Figure 28 Représentation schématique des effets des chaperons moléculaires sur l'assemblage ou le désassemblage de Sup35p ou Ure2p. (Krzewska and Melki, 2006; Savistchenko et al., 2008; Shorter and Lindquist, 2008)	65

Figure 29 Conversion réversible des protéines prions lors de changements environnementaux. (Suzuki and Tanaka, 2013)	74
Figure 30 Validation des protéines utilisées dans cette étude	108
Figure 31 Le système de dégradation protéasomale est sensible aux contaminations.	109
Figure 32 Le chaperon moléculaire Sis 1 est substrat du protéasome 26S <i>in vitro</i>	111
Figure 33 Le chaperon moléculaire Ssa1 n'a pas d'effet sur la dégradation des fibres de Sup35p <i>in vitro</i>	112
Figure 34 Les différentes constructions de Sup35-GFP.	142
Figure 35 [PSI ⁺] est toxique dans la souche Sup35-GFP.....	142
Figure 36 Analyse en microscopie à fluorescence de la distribution intracellulaire de Sup35GFP dans des cellules [ps ⁱ] et [PSI ⁺] au cours de la croissance.	143
Figure 37 Test au bleu trypan sur des cellules Sup35GFP [ps ⁱ] et [PSI ⁺] cultivées pendant 30j en milieu YPDA	144
Figure 38 Représentation schématique de la dégradation protéasomale des formes soluble et fibrillaire de Sup35p et Ure2p. (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015)	148

Tableaux

Tableau 1 Caractérisation des corps coalescents chez les levures.....	37
Tableau 2 Effets des chaperons moléculaires sur la propagation des prions [PSI ⁺] et [URE3]	62
Tableau 3 Prions chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	70

Avant-propos

Cette thèse a porté sur l'étude de 'protéines infectieuses' ou prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et comporte deux volets distincts.

Dans une première partie, nous avons exploré principalement par des approches biochimiques l'articulation entre les chaperons moléculaires et le protéasome dans la dégradation des prions de levure. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés aux propriétés de ces prions au cours des différentes phases de croissance de la levure, ainsi qu'à leur impact sur la survie à long terme et le vieillissement chronologique.

Ces deux projets recouvrent des thématiques scientifiques complexes qu'il serait beaucoup trop long de décrire de manière exhaustive. J'ai ainsi choisi de débiter l'introduction de ma thèse par une description générale des mécanismes de contrôle qualité des protéines. J'ai notamment mis l'accent sur les chaperons moléculaires et le système ubiquitine protéasome du fait de leurs rôles de tout premier plan dans le maintien de la protéostase et le vieillissement, mais également dans la formation, la propagation et l'élimination des prions de levure. Ensuite, dans la deuxième partie de l'introduction j'ai décrit la croissance et le vieillissement chez la levure, ainsi que les relations entre l'agrégation protéique et le vieillissement. La troisième partie de l'introduction est consacrée aux prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. J'ai privilégié la description détaillée de [*PSI*⁺] (forme prion de la protéine Sup35p) et [*URE3*] (forme prion de la protéine Ure2p) qui sont les deux prions de levure les mieux documentés et que nous étudions au laboratoire. Les rôles joués par les chaperons moléculaires et le protéasome dans la formation et la propagation de ces prions sont aussi décrits, faisant ainsi le lien avec la première partie de l'introduction.

Les résultats, présentés sous forme d'articles en anglais, sont précédés d'un résumé en français et accompagnés de résultats complémentaires le cas échéant. Dans un premier volet,

j'ai décrit la dégradation *in vitro* des formes soluble et fibrillaire du prion de levure Ure2p par le protéasome 26S. J'ai ensuite présenté quelques données complémentaires sur l'articulation entre les chaperons moléculaires et protéasome sur la dégradation protéasomale des formes soluble et fibrillaire de Sup35p. Dans le second volet des résultats, j'ai décrit mes travaux portant sur la caractérisation des modifications subies par le prion [*PSI*⁺] au cours des différentes phases de croissance, et sur les conséquences inattendues du prion [*PSI*⁺] sur le vieillissement chronologique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Une conclusion et les perspectives ouvertes par ce travail de thèse sont proposées à la fin du manuscrit.

INTRODUCTION

1 Contrôle-qualité des protéines

1.1 La protéostase cellulaire

Au cours de la vie d'une cellule, dans des conditions physiologiques normales, de nombreuses protéines doivent être synthétisées, acquérir leur conformation native, rejoindre leur localisation subcellulaire et éventuellement s'associer au sein de complexes multiprotéiques tels que les ribosomes, les polymérases ou le protéasome. La plupart des protéines ont une durée de vie limitée et extrêmement variable (de quelques minutes à plusieurs jours) selon les fonctions cellulaires qu'elles accomplissent ou les organismes dont elles sont issues. C'est pourquoi les protéines dans une cellule doivent être renouvelées en permanence. L'ensemble des protéines ayant des structures et des fonctions distinctes qui forment des réseaux d'interactions protéine-protéine afin d'assurer le bon fonctionnement de la cellule représente le **protéome** de la cellule (Brehme et al., 2014). L'homéostasie protéique ou **protéostase** se réfère aux processus permettant de contrôler la concentration, la conformation, les interactions et la localisation des protéines vis-à-vis des fluctuations intrinsèques ou environnementales (Balch et al., 2008). Une perte progressive de l'homéostasie cellulaire est intimement associée aux processus de vieillissement cellulaire, étant donné les fonctions cellulaires essentielles assurées par les protéines. L'équilibre et l'intégrité du protéome a donc une importance primordiale (Hartl, 2016).

Une protéine est une chaîne polypeptidique constituée d'acides aminés (structure primaire) dont le repliement fait apparaître un ou plusieurs domaines, ces derniers pouvant être constitué d'hélices- α , de feuillets- β et/ou de boucles (structure secondaire). Ces différents domaines se replient de façon spontanée ou avec l'assistance de chaperons moléculaires afin d'acquérir une structure tridimensionnelle native permettant à la protéine d'assurer sa fonction biologique. Le repliement correct des protéines est donc essentiel pour l'homéostasie cellulaire. Des mécanismes de **Contrôle Qualité des Protéines** (CQP), également appelé réseau protéostatique (RP) (Figure 1), influencent le destin des protéines, de l'activation des protéines naissantes et métastables à l'élimination des protéines en fin de vie, mal repliées ou agrégées (Klaips et al., 2014; Saarikangas and Barral, 2016). Dans chaque cellule, tissu ou organisme vivant, le CQP est optimisé pour assurer une surveillance constante et efficace du protéome dans des conditions physiologiques normales. Cependant, l'équilibre délicat entre

synthèse, repliement et dégradation des protéines peut être rompu, par exemple lorsque les cellules sont soumises à un stress important (ex. choc thermique, rayonnements, agents chimiques, infections par des pathogènes, etc.), au cours du vieillissement où les capacités du CQP sont réduites, ou encore à cause de mutations dans les gènes codant pour des acteurs clés du CQP ou pour des protéines clientes du CQP. Les cellules peuvent, dans certains cas, répondre à ces situations de crise exceptionnelles ou chroniques par exemple en augmentant le niveau d'expression de composants du CQP, tels que les chaperons moléculaires qui ont d'ailleurs été identifiés comme étant des protéines induites par un choc thermique (*Heat-Shock Proteins*, HSP) (Balch et al., 2008; Brehme et al., 2014).

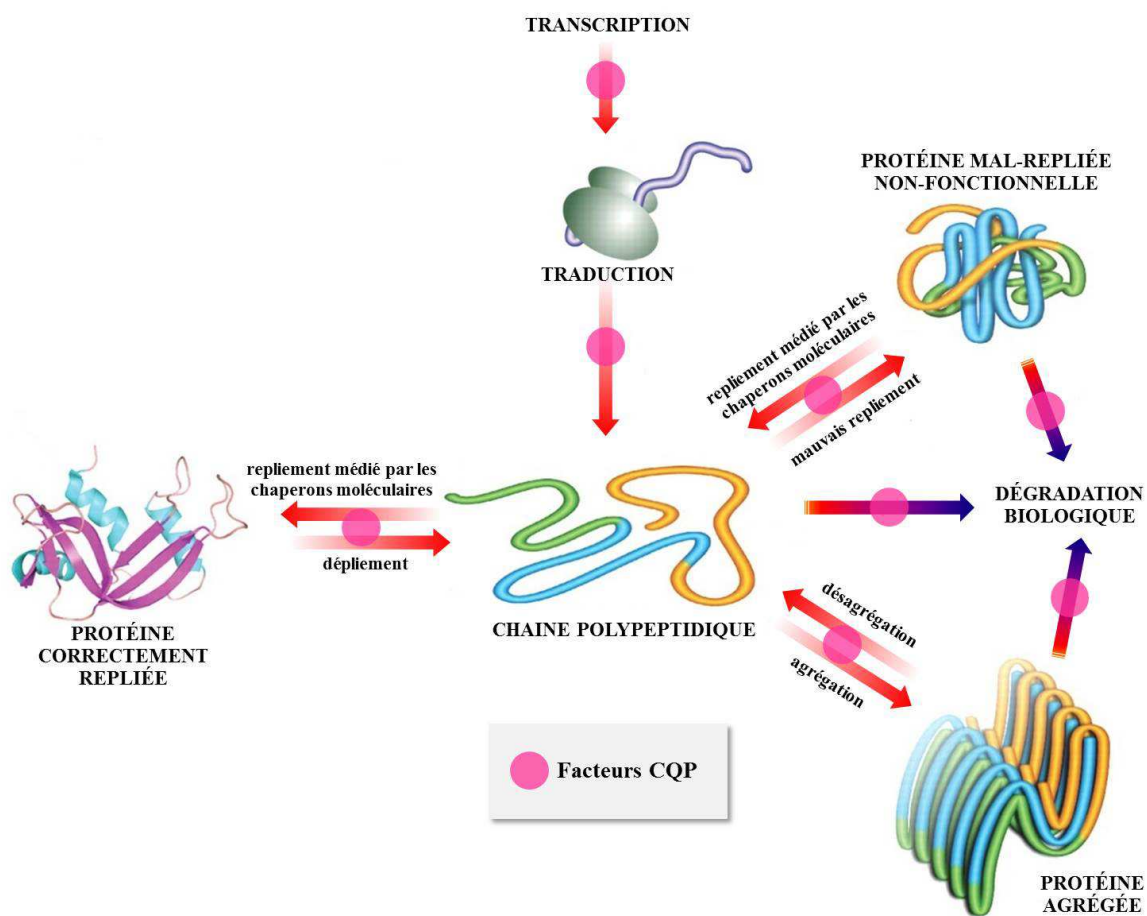


Figure 1. Réseau protéostatique. (Figure adaptée de Balch et al., 2008)

Le réseau protéostatique est représenté en flèches rouges. L'homéostasie protéique résulte de la synthèse/dégradation, repliement/dépliement et agrégation/désagrégation des protéines ; elle est indispensable pour la vie d'une cellule. Les facteurs de contrôle qualité des protéines (facteurs CQP, représentés par des ronds magenta) restaurent l'homéostasie protéique en cas de déséquilibre.

L'adaptation spatio-temporelle de la protéostase cellulaire est nécessaire en raison de la présence d'un protéome en évolution continue. Les cellules synthétisent continuellement de nouvelles protéines structurelles, de ménage ou en réponse à divers stimuli et doivent faire face à l'accumulation de protéines mépliées ou agrégées au cours du vieillissement. De plus, certaines protéines ne sont que marginalement stables aux températures et pH physiologiques, et la cellule doit veiller à maintenir la concentration et la localisation cellulaire de chaque protéine. La protéostase est donc une tâche ardue reposant sur un équilibre délicat qui peut être facilement rompu. Dans certains cas, tel qu'un stress thermique modéré, le CQP est robuste et permet de rétablir l'équilibre. Au cours du vieillissement, une perte progressive (en nombre et en qualité) des acteurs de la protéostase peut conduire à l'accumulation de protéines mal-repliées et à la formation d'agrégats protéiques cytotoxiques. À terme, ces défauts non corrigés peuvent être la cause de pathologies (Balch et al., 2008; Kim et al., 2013; Taylor and Dillin, 2011). Parmi les maladies causées par le mauvais repliement ou l'agrégation protéique, on retrouve notamment les maladies neurodégénératives (les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington, et aussi la sclérose amyotrophique latérale). Ces maladies peuvent survenir de manière sporadique ou de façon héréditaire via des mutations souvent dominantes (Ayyadevara et al., 2015; Balch et al., 2008; Kim et al., 2013; Taylor and Dillin, 2011).

1.2 Repliement et agrégation protéique

Les structures tridimensionnelles de la plupart des protéines représentent un compromis entre la stabilité thermodynamique et la flexibilité conformationnelle requise pour leur fonction biologique. Par conséquent, les protéines sont souvent métastables dans leurs environnements physiologiques et donc susceptibles au mauvais repliement et à l'agrégation (Anfinsen, 1973; Bartlett and Radford, 2009). De plus, une proportion importante de protéines dans les cellules eucaryotes (30%) est classée comme intrinsèquement désordonnées. Elles contiennent des régions flexibles qui ne pourraient adopter une structure ordonnée qu'après interaction avec leurs partenaires dans la cellule. Ces protéines sont particulièrement susceptibles de s'agréger (Dunker et al., 2008).

Les études pionnières d'Anfinsen ont révélé qu'une petite protéine, la ribonucléase dénaturée adopte spontanément sa structure native *in vitro*, ce qui démontre que la structure tridimensionnelle d'une protéine est dictée par sa séquence primaire en acides aminés

(Anfinsen, 1973; Bartlett and Radford, 2009). De nombreux travaux nous ont depuis permis de comprendre comment la séquence linéaire en acides aminés code la conformation native d'une protéine et dirige le processus de repliement. Comme le nombre de conformations qu'une chaîne polypeptidique peut adopter au cours du processus de repliement est très grand, le repliement est une réaction hautement complexe et hétérogène.

D'un point de vue énergétique, la structure tridimensionnelle native d'une protéine représente l'état de plus faible énergie libre (Anfinsen, 1973). Le paysage énergétique du repliement protéique peut être représenté sous forme d'un entonnoir (Figure 2). Le polypeptide désordonné se trouve au bord de l'entonnoir indiquant l'énergie libre la plus élevée. En général, l'entonnoir de repliement a une apparence vallonnée. Les chaînes polypeptidiques forment des intermédiaires de repliement métastables (vallées) puis passent par des états de transition (collines) pour atteindre leur conformation native, état où l'énergie libre est la plus faible. Le repliement partiel ou le mauvais repliement conduisent à l'exposition d'acides aminés hydrophobes au solvant, ce qui peut conduire à l'agrégation protéique (Chiti and Dobson, 2006; Dunker et al., 2008). L'agrégation des protéines peut conduire à la formation d'agrégats amorphes ou à des assemblages beaucoup plus ordonnés tels que les amyloïdes (voir 3.1.1). Alors que la plupart des protéines peuvent adopter ces structures hautement ordonnées *in vitro* (dans des conditions physicochimiques souvent extrêmes et non physiologiques), la situation est heureusement différente *in vivo* où les conditions physicochimiques et l'intervention des chaperons moléculaires notamment empêchent leur formation (Chiti and Dobson, 2006; Eichner and Radford, 2011; Kim et al., 2013). La formation d'intermédiaires oligomériques solubles accompagne souvent la formation des agrégats fibrillaires insolubles. Les oligomères peuvent être considérées comme des intermédiaires dynamiques qui doivent subir des réarrangements structuraux considérables pour former les fibres amyloïdes, l'état le plus stable.

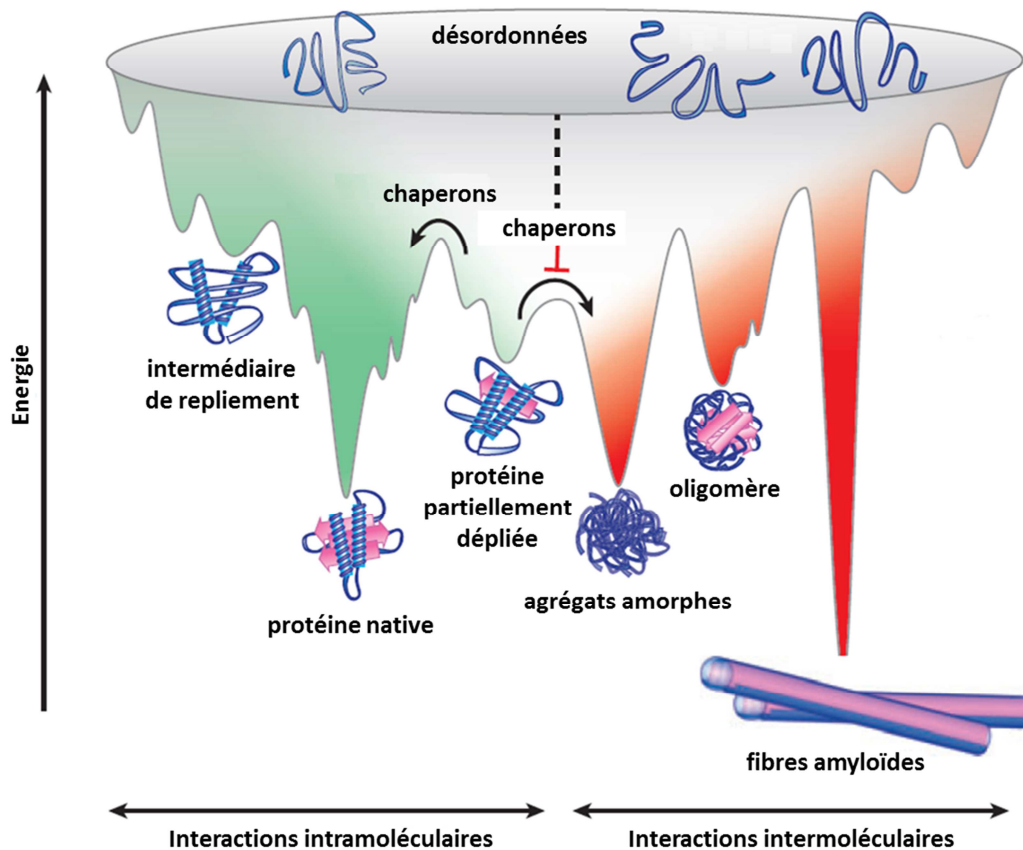


Figure 2 Paysage énergétique du repliement protéique. (Kim et al., 2013)

Des interactions intramoléculaires (partie verte) énergétiquement favorables sont stabilisées au cours du repliement protéique vers l'état natif. Des conformations non-natives mais énergétiquement favorables conduisent à la formation de protéines partiellement dépliées ou mal-repliées momentanément piégées dans des puits de faible énergie. Les chaperons moléculaires et leurs cofacteurs peuvent aider cette population de protéines à surmonter la barrière d'énergie libre et empêcher les interactions intermoléculaires (partie rouge) qui peuvent conduire à l'agrégation protéique.

1.3 Les chaperons moléculaires

1.3.1 Généralités sur les chaperons moléculaires

Les chaperons moléculaires sont des protéines qui assistent le repliement ou l'assemblage en complexes d'autres protéines sans faire partie des structures finales. Ils sont présents dans tous les organismes et tous les compartiments cellulaires. Il existe différentes classes de chaperons moléculaires dans la cellule. Ils ont été initialement classés en différentes familles en fonction de leurs masses moléculaires : petites Hsp, Hsp40, Hsp70, Hsp90 et Hsp100. Les

chaperons moléculaires sont exprimés de manière constitutive et/ou inducible par un stress afin d'assurer des fonctions de ménage (e.g. repliement des protéines nouvellement synthétisées, trafic intracellulaire) d'une part et répondre à des situations de stress protéotoxique (e.g. choc thermique, agrégation protéique) d'autre part (Bukau et al., 2006; Hartl, 1996; Kim et al., 2013).

1.3.2 Activités des chaperons moléculaires dans le cytosol

L'organisation générale des activités des chaperons moléculaires dans le cytosol est hautement conservée au cours de l'évolution (Figure 3). Dans tous les domaines du vivant (procaryotes, archaea, eucaryotes), des chaperons en interaction avec les ribosomes (e.g. TF (*trigger factor*), NAC (*nascent-chain-associated complex*), Hsp70 spécialisés) interagissent en premier lieu avec les chaînes polypeptidiques naissantes qui sont ensuite éventuellement prises en charge par d'autres types de chaperons (e.g. Hsp70, Hsp60). Le repliement débute dès la traduction et s'achève post-traductionnellement après la libération de la chaîne polypeptide par le ribosome ou après le transfert aux chaperons en aval. La dépendance vis-à-vis des chaperons moléculaires est variable en fonction des protéines clientes, de leur localisation intra- ou extracellulaire finale, des organismes et des conditions de croissance (Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Kim et al., 2013).

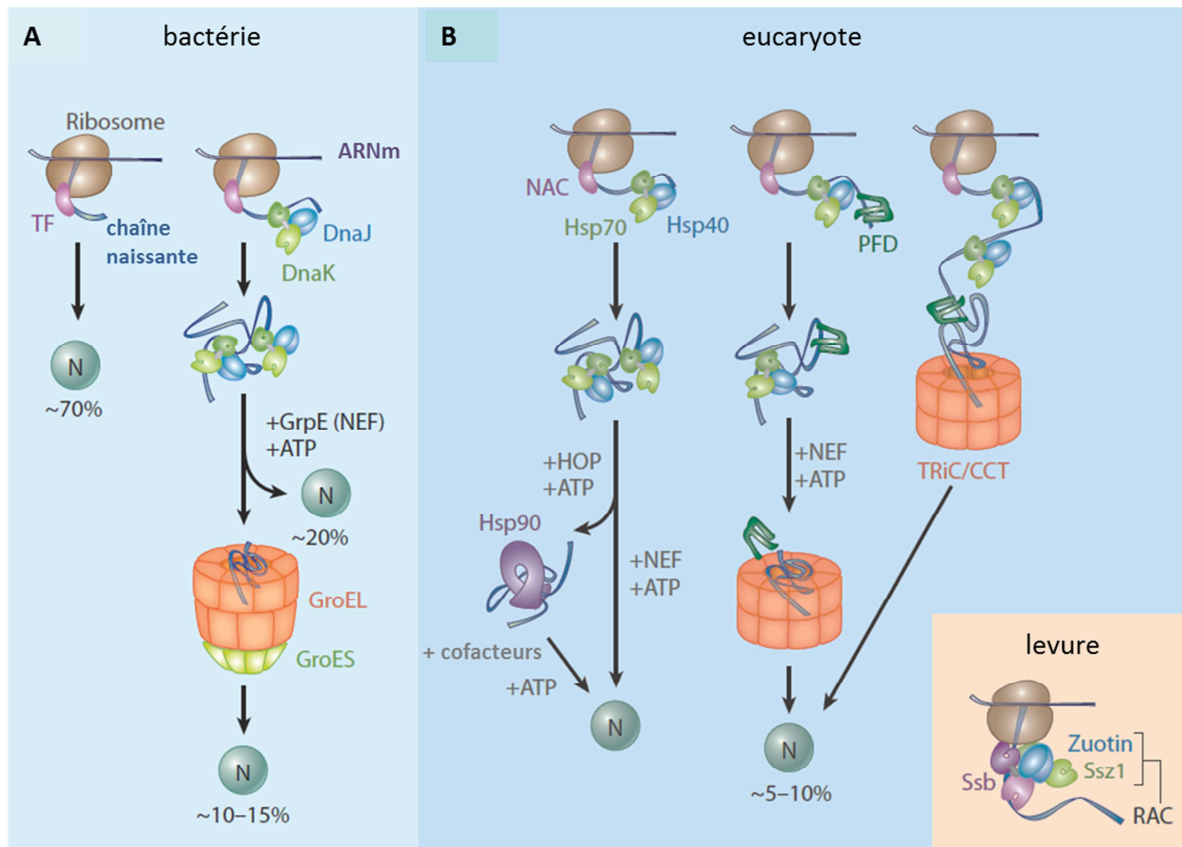


Figure 3 Activité des chaperons moléculaires dans le cytosol chez les procaryotes (A) et les eucaryotes (B) (Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Kim et al., 2013)

Les chaperons en interaction avec le ribosome (TF chez les procaryotes et NAC chez les eucaryotes) assistent le repliement des chaînes polypeptidiques naissantes de façon co-traductionnelle dès la sortie du ribosome. Pour des chaînes polypeptidiques plus longues, la famille Hsp70 (DnaK chez les procaryotes et Hsp70 chez les eucaryotes), avec ses co-chaperons Hsp40 et facteurs d'échange (NEF) modulent le repliement de façon co-traductionnelle ou post-traductionnelle. La préfoldine (PFD) peut assister le repliement en aval de NAC. Les protéines naissantes partiellement repliées peuvent être transférées aux chaperonines (GroEL-GroES chez les procaryotes et TRiC/CCT chez les eucaryotes). Le système Hsp90 reçoit ses substrats à partir de Hsc70 et permet le repliement et l'activation de certaines protéines. Dans l'encart est représenté le système des chaperons moléculaires en interaction avec le ribosome chez la levure ou complexe RAC. RAC est composé de Ssz1 (Hsp70 spécialisée) et de la zuotine (Hsp40). Il assiste le repliement des chaînes naissantes avec Ssb, un autre type d' Hsp70 associée aux ribosomes. Les pourcentages indiquent les flux approximatifs de protéines passant par les divers systèmes de chaperons.

Les chaînes polypeptidiques sont prises en charge dès le début de synthèse protéique par des chaperons moléculaires en interaction avec le ribosome (Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Mayer, 2010). Chez les procaryotes, le facteur TF (*Trigger Factor*) protège les régions hydrophobes des chaînes polypeptidiques naissantes dès leur sortie du ribosome pour maintenir la solubilité des protéines. Le système Hsp70 (DnaK) intervient ensuite pour les chaînes polypeptidiques plus longues (Deuerling et al., 1999; Teter et al., 1999). Il est constitué de Hsp70, ses co-

chaperons Hsp40 (DnaJ) et d'un facteur d'échange NEF (*nucleotide exchange factor*, GrpE). Ce système favorise les repliements co- et post-traductionnels. Certaines protéines nécessitent l'intervention des chaperonines (GroEL/GroES). Les chaperonines sont de larges complexes cylindriques qui encapsulent au moins une portion des chaînes polypeptidiques pour faciliter leurs repliements dans un environnement confiné (Bukau et al., 2006; Hartl, 1996; Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Kim et al., 2013; Mayer, 2010, 2010).

Chez les eucaryotes, le complexe RAC (*Ribosome-Associated Complex*, chez la levure *S. cerevisiae*) ou MPP11 et Hsp70L1 (chez les mammifères) remplacent le TF. Le complexe RAC de levure est un hétérodimère stable composé de Ssz1 (Hsp70 spécialisée) et Zuo1 (une Hsp40). RAC stimule l'activité ATPase d'une autre Hsp70 liée au ribosome, Ssb1/2, et favorise ainsi la fixation de la chaîne naissante sur Ssb1/2. Le complexe NAC (*Nascent chain-Associated Complex*, chez les eucaryotes) peut également s'associer aux ribosomes et aux chaînes naissantes. NAC est constitué de deux sous-unités, α et β . La liaison de NAC au ribosome se fait uniquement par la sous-unité β , et les deux sous-unités interagissent avec la chaîne polypeptidique naissante. Le rôle de NAC dans le repliement des protéines n'est pas bien connu. Les Hsp70 et un autre chaperon moléculaire, la préfoldine (PFD), peuvent délivrer les protéines clientes aux chaperonines (TRiC/CCT). Les Hsp70 peuvent également transférer les protéines naissantes au système Hsp90, notamment pour le repliement des protéines de régulation comme les kinases et les facteurs de transcription. (Bukau et al., 2006; Hartl, 1996; Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Kim et al., 2013; Mayer, 2010, 2010).

1.3.3 Les différentes familles de chaperons moléculaires liées à cette étude

Les différentes familles de chaperons moléculaires présentées brièvement ci-dessus fonctionnent de manière synergique pour maintenir la protéostase cellulaire. Les Hsp70 jouent un rôle central dans le repliement des protéines. Elles coopèrent avec les autres familles de chaperons moléculaires (Hsp40 et Hsp104 etc.). Elles sont impliquées dans les systèmes de contrôle qualité dans le cytosol, les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Elles s'articulent également avec d'autres systèmes cellulaires comme les voies de dégradation et de transport protéique. Chez la levure, Hsp104 joue un rôle important dans la re-solubilisation et la renaturation des agrégats protéiques en coopérant notamment avec le système Hsp70/40. Ces deux grandes familles de protéines jouent des rôles importants et parfois opposés dans la formation et la propagation des prions.

1.3.3.1 Le système Hsp70

Les chaperons moléculaires de la famille Hsp70 sont une classe de protéines ubiquitaires. Ils sont présents dans tous les organismes et tous les compartiments cellulaires. Ils font partie des protéines les plus conservées au cours de l'évolution. Ils sont impliqués dans un spectre très large de fonctions de CQP, telles que le repliement *de novo* des protéines, le repliement des protéines dénaturées par divers stress, le transport des protéines, la translocation membranaire et l'adressage vers des voies de dégradation protéique.

Organisation structurale des Hsp70 et mode d'action

Toutes les protéines de la famille Hsp70 partagent une architecture structurale commune : un domaine ATPase en N-terminal (aussi appelé domaine NBD pour *Nucleotide Binding Domain*), un domaine PBD (*Peptide Binding Domain*) et un domaine 'couvercle (*lid*)' en C-terminal. Le *linker* entre les domaines NBD et PBD est hautement conservé et joue un rôle crucial dans la régulation allostérique des Hsp70 (Kabani and Martineau, 2008) (Figure 4).

Les Hsp70 peuvent se lier à des motifs hydrophobes exposés à la surface des protéines en cours de repliement ou mal-repliées. Leurs rôles sont de prévenir l'agrégation des protéines, de promouvoir le repliement des protéines mal-repliées, de solubiliser les protéines agrégées et de transférer les protéines mal-repliées ou agrégées aux systèmes de dégradation protéolytique. Les cycles d'interaction et de libération des protéines clientes par les Hsp70 sont couplés à des changements conformationnels ATP-dépendants. Lorsque Hsp70 est liée à l'ATP, les domaines PBD et *lid* sont dans une conformation dite 'ouverte' permettant la liaison avec la protéine cliente. Après hydrolyse de l'ATP en ADP, les domaines PBD et *lid* adoptent une conformation dite 'fermée' qui stabilise l'association avec le substrat (Figure 4). L'échange de l'ADP pour de l'ATP est aussi crucial pour la libération du substrat et le recyclage des Hsp70. Ce processus de changement de conformation est soigneusement contrôlé par des co-chaperons spécifiques tels que les chaperons Hsp40 qui stimulent l'activité ATPase des Hsp70 et les facteurs NEFs (*Nucleotide Exchange Factors*) qui facilitent l'échange ADP-ATP (voir ci-dessous) (Bukau et al., 2006; Kabani and Martineau, 2008; Kim et al., 2013).

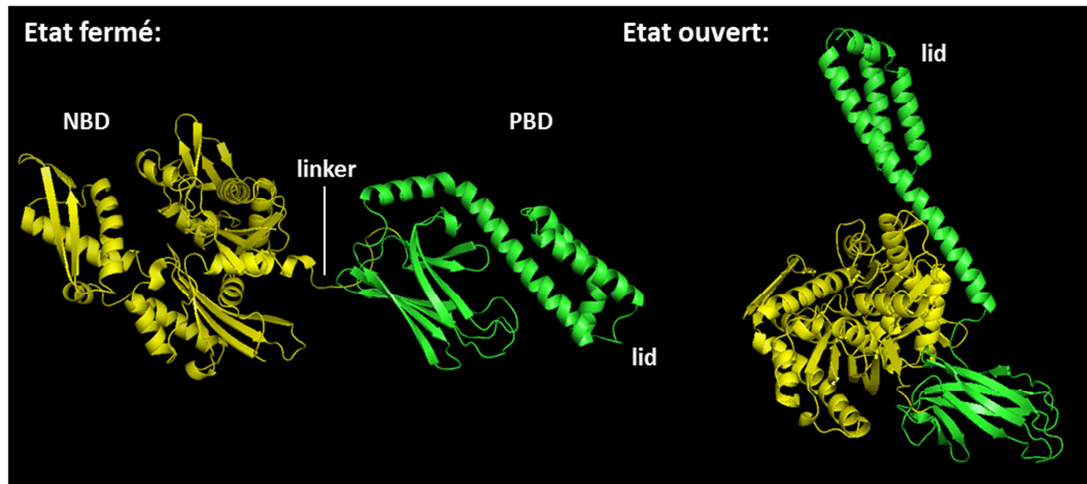


Figure 4 Structure de Hsp70

Les structures représentées sont des structures cristallographiques de DnaK d'*Escherichia coli* (Etat fermé, code PDB : 2KHO ; Etat ouvert, code PDB : 4B9Q).

Co-chaperons de Hsp70

Les co-chaperons Hsp40 (ou protéines à domaine J) et les facteurs d'échanges (NEF) régulent le cycle Hsp70 (Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Mayer, 2010). Les protéines Hsp40 constituent une grande famille de plus de 40 membres chez l'homme (Kampinga and Craig, 2010). Toutes les protéines de la famille Hsp40 contiennent un domaine J permettant l'interaction avec Hsp70 et la stimulation de son activité ATPase (Ahmad et al., 2011; Jiang et al., 2007). Certaines Hsp40 (dites de classes I et II) fonctionnent indépendamment comme des chaperons et permettent le transfert de protéines clientes aux Hsp70. D'autres Hsp40 (dites de classe III) constituent une famille plus diverses de protéines et combinent le domaine J avec une variété de modules fonctionnels (Kampinga and Craig, 2010). L'interaction des Hsp40 avec Hsp70 stimule fortement (> 1000 fois) l'hydrolyse de l'ATP lié sur Hsp70 en ADP, ce qui permet de stabiliser la liaison de Hsp70 avec ses substrats (Hartl and Hayer-Hartl, 2009; Mayer, 2010). La fixation de NEF sur le domaine NBD de Hsp70 facilite la dissociation de l'ADP et la re-fixation d'une nouvelle molécule d'ATP, ce qui déclenche la libération du substrat (Figure 5). Des cycles d'association-dissociation de Hsp70 avec ses protéines clientes par Hsp70 permettent le repliement progressif de ces dernières et préviennent leur agrégation.

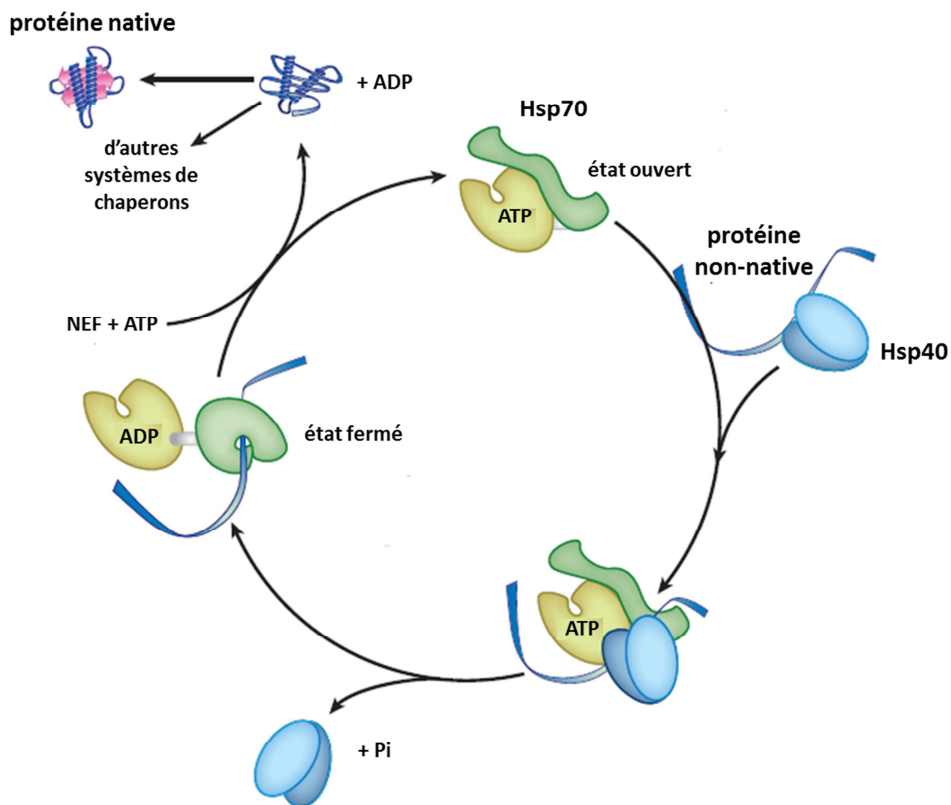


Figure 5 Cycle de réaction du système Hsp70-Hsp40-NEF (Kim et al., 2013; Mayer, 2010)

La fixation d'ATP sur le domaine NBD stabilise l'état ouvert de Hsp70, ce qui permet la fixation du substrat recruté par son co-chaperon Hsp40 pour Hsp70. Hsp40 stimule l'hydrolyse de l'ATP, ce qui conduit à la fermeture du domaine lid sur le substrat lié. NEF stimule la libération de l'ADP et la fixation d'ATP conduit à la libération du substrat.

1.3.3.2 Hsp104

La protéine Hsp104 monomérique est une protéine de 102 kDa de la superfamille des AAA⁺-ATPase. Elles ne sont présentes que chez les procaryotes (ClpB), les champignons et levures, ainsi que chez les plantes. Hsp104 est constituée de 5 domaines : le domaine N-terminal (NTD), deux domaines de fixation des nucléotides (NBD1 et NBD2), un domaine hélicale MD inséré dans le domaine NBD1, et un petit domaine C-terminal (Figure 6A). Les deux domaines NBDs sont indispensables pour l'activité chaperon de Hsp104. Les domaines NTD, MD et CTD de Hsp104 (Figure 6A) jouent également des rôles importants dans la régulation des propriétés fonctionnelles de Hsp104. Ces domaines sont impliqués dans la spécificité de liaison aux substrats, dans la régulation allostérique par fixation et hydrolyse de l'ATP permettant la liaison et la translocation du substrat à l'intérieur de l'enzyme, dans la

stabilisation de Hsp104 hexamérique (Figure 6B), et dans la fixation des cofacteurs (Grimminger-Marquardt and Lashuel, 2010).

Hsp104 n'est fonctionnelle qu'en complexe hexamérique (Figure 6B). La quantité de Hsp104 dans les cellules est faible en conditions normales, et fortement augmentée en condition de stress (Wendler et al., 2009). Hsp104 est connue pour sa fonction 'désagrégase', c'est-à-dire sa capacité à faciliter la dissociation et la renaturation des agrégats protéiques formés par exemple après un choc thermique (Parsell et al., 1994; Wendler et al., 2009). Le mécanisme moléculaire intervenant lors de ce processus est complexe. Il a été montré que Hsp104 resolubilise les agrégats protéiques par extraction des chaînes polypeptidiques couplée à l'hydrolyse de l'ATP (Schaupp et al., 2007; Tessarz et al., 2008; Weibezahn et al., 2004; Wendler et al., 2009) (Figure 6C). De plus, ces activités de renaturation des protéines agrégées par Hsp104 nécessitent sa coopération avec le système Hsp70/Hsp40. Le spectre de substrats de ces chaperons moléculaires comprend les polypeptides mal-repliés, les agrégats amorphes de diverses protéines et les agrégats amyloïdes résistants à la protéolyse (Grimminger-Marquardt and Lashuel, 2010).

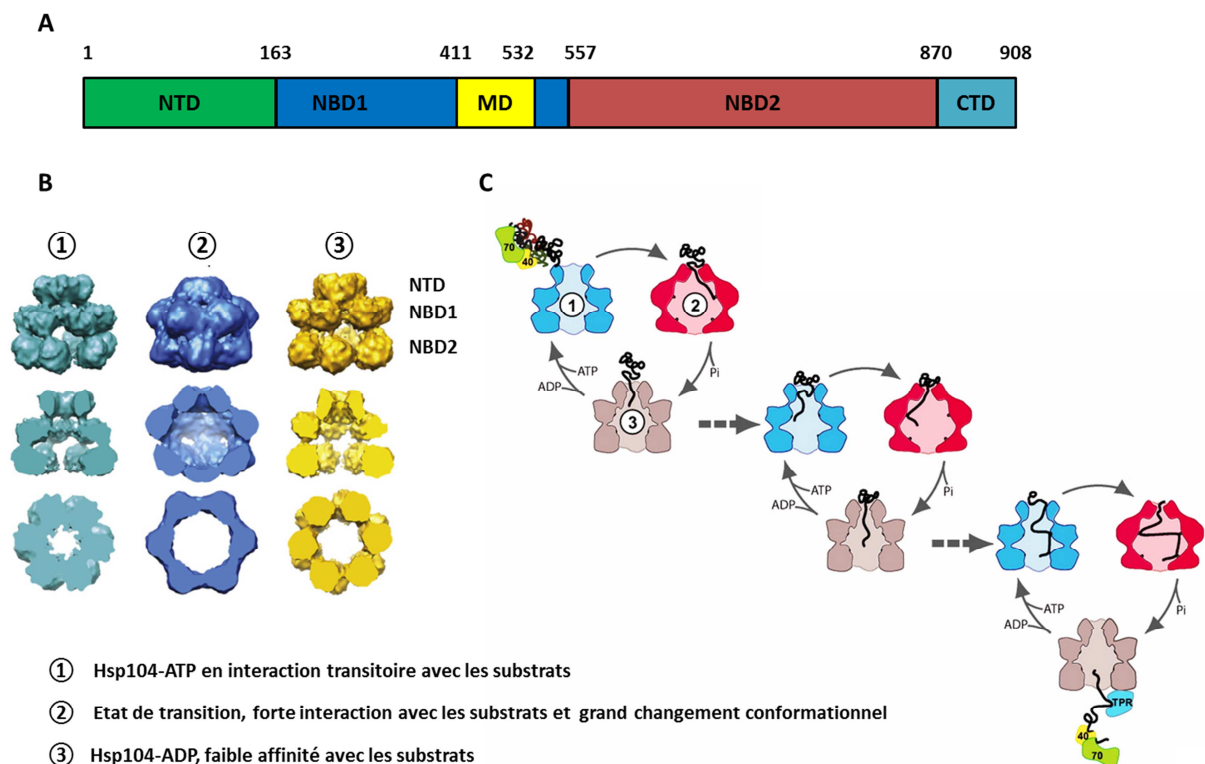


Figure 6 Organisation structurale et mode d'action de Hsp104 (Grimminger-Marquardt and Lashuel, 2010; Mayer, 2010)

A : Structure primaire de Hsp104. NTD : domaine N-terminal ; NBD1 et NBD2 : domaines de fixation des nucléotides ; MD : un domaine hélicale inséré dans le domaine NBD1. CTD : domaine C-terminal. **B : Reconstitution en cryo-microscopie électronique des hexamères de Hsp104 en différents états.** Panneau supérieur : vue de côté ; panneau central : vue de côté coupée verticalement ; panneau inférieur : vue de haut coupée longitudinalement.

C : Mode d'action de Hsp104. La fixation et l'hydrolyse de l'ATP conduisent à des changements conformationnels de Hsp104 hexamérique et à la fixation du substrat. Tout d'abord, les substrats interagissent transitoirement avec Hsp104 liée à l'ATP. Hsp70/Hsp40 facilitent la fixation du substrat par Hsp104. Des cycles successifs d'hydrolyse de l'ATP permettent des réarrangements structuraux du substrat. Le nombre de cycles dépend de la stabilité du repliement ou du degré d'agrégation du substrat. Après la libération par le domaine CTD de Hsp104, le substrat déplié pourrait être transféré aux chaperons Hsp70/Hsp40 pour des étapes de repliement ultérieures.

1.4 Le système ubiquitine-protéasome

Le système CQP est crucial pour contrôler le bon repliement des protéines et ainsi maintenir les fonctions cellulaires. Une composante importante du CQP est la dégradation des protéines en fin de vie, mal repliées ou devant simplement être éliminées par leur implication dans des processus cellulaires hautement régulés tels que la division cellulaire. Le système ubiquitine-protéasome (UPS), composé des enzymes de conjugaison de l'ubiquitine (Ub) et du protéasome 26S, joue un rôle prépondérant dans les mécanismes de CQP.

1.4.1 Ubiquitination des protéines

L'ubiquitine (Ub) est une petite protéine de 76 acides aminés qui est extrêmement conservée chez les eucaryotes mais absente chez les procaryotes. L'ubiquitination des protéines peut se faire par la liaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine (Figure 7) (von Mikecz, 2006). L'ubiquitine peut former des chaînes ramifiées dans lesquelles les molécules d'ubiquitine sont reliées entre elles par l'un de leurs 7 résidus lysine (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63). Elles peuvent également être reliées par une liaison entre leur méthionine N-terminale et un motif di-glycine en C-terminal d'une autre molécule d'ubiquitine.

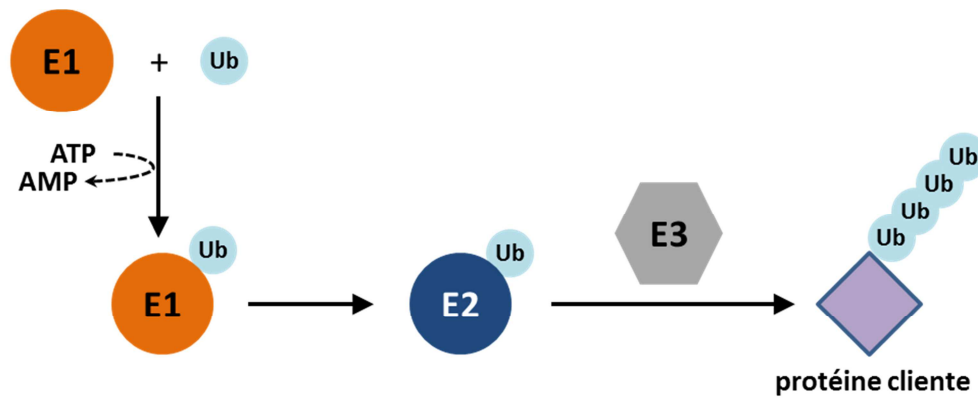


Figure 7 Représentation schématique de l'ubiquitination (Tsakiri and Trougakos, 2015)

La conjugaison des ubiquitines aux protéines clientes est un processus ATP-dépendant médié par une série d'enzymes d'ubiquitination (Figure 7). Plus spécifiquement, une molécule d'ubiquitine est activée par l'enzyme activatrice E1 et transférée de façon ATP-dépendante sur le site actif, un résidu cystéine de l'enzyme E1. L'ubiquitine activée est ensuite transférée sur un groupement sulfure de l'enzyme de conjugaison E2. Et finalement l'ubiquitine est transférée via une ubiquitine-ligase E3 à un groupement amyle d'une lysine exposée à la surface de la protéine cliente (von Mikecz, 2006; Tsakiri and Trougakos, 2015).

En plus de son rôle essentiel dans la dégradation protéasomale, l'ubiquitination est impliquée dans de nombreux processus cellulaires tels que les réponses immunitaires, l'endocytose régulée de récepteurs protéiques, le trafic intracellulaire, la régulation de la transcription, la réparation de l'ADN et l'assemblage de complexes de signalisation. La longueur de la chaîne d'ubiquitines ainsi que les résidus lysine par lesquelles elles sont reliées constituent un véritable code déterminant le destin des protéines ubiquitinées (Hochstrasser, 2009; Tsakiri and Trougakos, 2015).

1.4.2 Organisation structurale du protéasome 26S

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le protéasome 26S est une nanomachine protéolytique d'une masse moléculaire de 2.5 MDa. Il est constitué d'un cœur protéolytique (CP) 20S et d'une ou deux particules régulatrices (RP) 19S situées de part et d'autre de la particule CP (Figure 8). Le CP a une structure cylindrique composée de 4 anneaux heptamériques empilés les uns sur les autres et délimitant une cavité dans laquelle les protéines clientes sont protéolysées. Les deux anneaux externes sont composés de 7 sous-unités- α différentes et contrôlent l'entrée des substrats à l'intérieur de la cavité catalytique du

protéasome. Les deux anneaux centraux sont composés de 7 sous-unités- β différentes qui possèdent trois activités protéolytiques de type caspase (β 1), trypsine (β 2) et chymotrypsine (β 5). La RP est constituée de 17 sous-unités qui forment deux sous-domaines : le domaine « couvercle (*lid*) » constitué de 11 protéines qui permet de dé-ubiquitiner les substrats; et le domaine « base » qui possède 6 sous-unités différentes ayant des activités ATPase spécifiques et non-redondantes facilitant le dépliement des protéines clientes et leur translocation à l'intérieur du cœur catalytique (Leggett et al., 2005; Tsakiri and Trougakos, 2015).

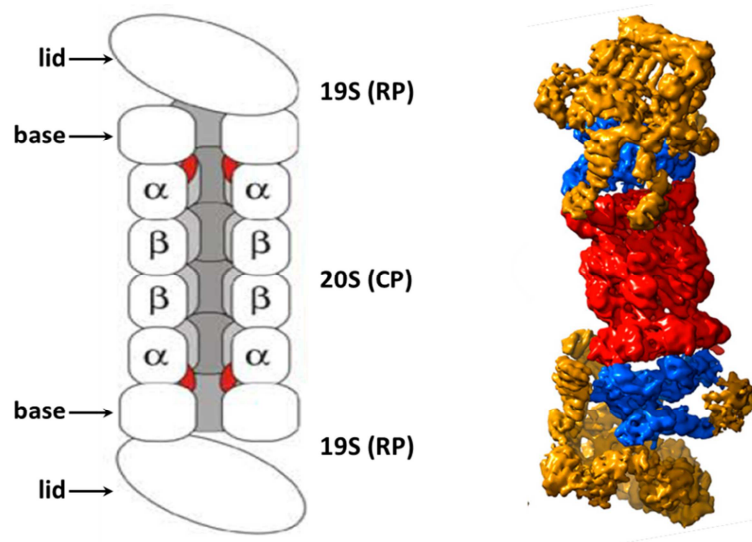


Figure 8 Le protéasome 26S de levure (Lasker et al., 2012)

A gauche est présentée une représentation schématique du protéasome 26S. Le protéasome 26S est composé d'une particule centrale 20S (CP) et deux particules régulatrices 19S (RP). Le 20S est composé de 4 anneaux héptamériques. La RP peut être divisée en deux parties : *lid* et base. A droite est présentée une modélisation obtenue par cryo-microscopie électronique. Le 20S est présenté en rouge, la base est en bleue et le lid est en jaune.

Le protéasome chez les mammifères ressemble à celui de la levure. Plusieurs types de particules régulatrices (e.g. PA28, PA200) sont retrouvés chez les mammifères avec des fonctions spécifiques, dans l'immunité par exemple avec la formation d'immuno-protéasomes (Lasker et al., 2012; Leggett et al., 2005; Tsakiri and Trougakos, 2015; Voges et al., 1999).

1.4.3 Fonctions du système ubiquitine-protéasome (UPS)

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est une voie de dégradation principale dans les cellules. Il est impliqué dans le CQP du noyau, du cytosol et du réticulum endoplasmique. L'UPS est également associé à d'autres voies de dégradation comme l'autophagie, un système

de dégradation des constituants cellulaires dans les lysosomes (ou vacuoles chez la levure) (Tsakiri and Trougakos, 2015). Le protéasome est une machinerie moléculaire sophistiquée qui reconnaît et dégrade les substrats protéiques ubiquitinés en générant des petits fragments polypeptidiques et en permettant le recyclage des ubiquitines (Voges et al., 1999). Il est important de noter que l'ubiquitination n'est pas nécessaire pour la dégradation de certaines protéines, telle que l'ornithine decarboxylase (Murakami et al., 1992). Les protéasomes 26S et 20S peuvent ainsi dégrader une portion significative de protéines dans la cellule indépendamment de l'ubiquitination. Une région désordonnée du substrat semble être requise comme motif universel de reconnaissance par le protéasome (Baugh et al., 2009; Yu et al., 2016). En accord avec ces observations, nous avons montré que des protéines prions de levure peuvent être efficacement dégradées par le protéasome *in vitro* sans ubiquitination préalable. Leur dégradation est initiée par et nécessite leurs domaines prions (voir 3.4.2) désordonnés (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). La fonctionnalité du système UPS est optimale dans les organismes jeunes, mais elle est progressivement perdue au cours du vieillissement ce qui entraîne l'augmentation du stress protéotoxique. Cette perte d'efficacité de l'UPS contribue certainement de façon importante aux maladies liées au vieillissement (Tsakiri and Trougakos, 2015).

2 Agrégation des protéines et vieillissement chez la levure

2.1 Croissance cellulaire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

2.1.1 Croissance et division cellulaire

La croissance cellulaire correspond à l'augmentation globale de la biomasse de la population suite à la division des cellules d'une part, mais également à la vie et au développement de ces cellules au cours du temps d'autre part. En laboratoire, la croissance cellulaire des levures est généralement mesurée en suivant la densité optique à 600 nm au spectrophotomètre (Figure 10, courbe rouge). Une culture de levure dans un milieu donné passe par plusieurs phases de croissance (voir 2.1.2.2).

La division cellulaire chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* se fait par bourgeonnement. Elle se produit selon un cycle mitotique typique, d'une durée d'environ 90-100 min, avec succession des phases G1 (pré-réplication de l'ADN), S (réplication de l'ADN), G2 (préparation de la mitose) et finalement M (mitose) où la cellule fille se sépare de la cellule mère (Figure 9). Le nombre de divisions d'une cellule de levure (voir 2.2.2) peut être suivi et quantifié par micromanipulation sous microscope. Lors de l'épuisement en nutriments du milieu de culture, les cellules cessent de se diviser, mais la croissance se poursuit, dans le sens où les cellules sont vivantes et métaboliquement actives.

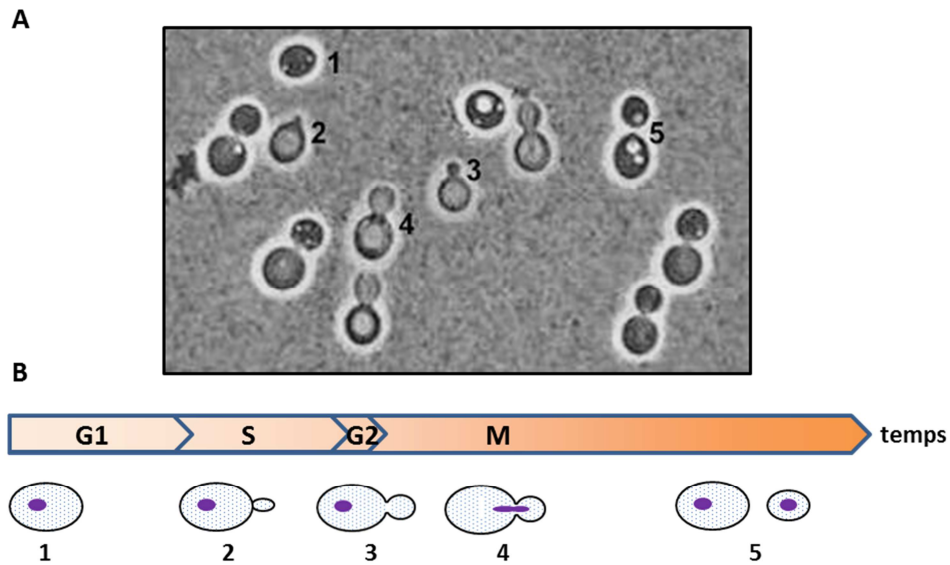


Figure 9 Cycle cellulaire des levures

A : Image en microscopie des cellules en division.

(Source d'image : <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/FungalBiology/sacch2a.jpg>)

B : Représentation schématique des phases du cycle cellulaire de la levure *S. cerevisiae*. La longueur des banderoles représentent la durée des phases correspondantes. Les numéros en dessous des cellules représentatives correspondent aux numéros indiqués dans A.

La disponibilité en nutriments, aussi bien d'un point de vue quantitatif que qualitatif (nature des sources de carbone, sources d'azote, acides aminés, vitamines etc.) sont, avec la température, les principaux facteurs environnementaux qui affectent la progression du cycle cellulaire et la croissance cellulaire chez la levure (Alberghina et al., 2012; Busti et al., 2010; Gutteridge et al., 2010; McKinney and Cross, 1992; Vanoni et al., 1984). Ainsi, lorsqu'une source de carbone pauvre, telle que l'éthanol, est la seule source disponible dans le milieu, les cellules se divisent et poussent lentement, produisant de grandes cellules mères et de très petites cellules filles. En présence d'une source de carbone préférentielle, telle que le glucose, les cellules poussent rapidement et la taille des bourgeons est plus grande (Porro et al., 2009). La croissance cellulaire de *S. cerevisiae* est dépendante de la température, la vitesse maximale de croissance exponentielle étant atteinte à 30°C (Vanoni et al., 1984).

2.1.2 Les phases de croissance de la levure

2.1.2.1 Conditions de croissance en laboratoire

En laboratoire, les levures sont typiquement cultivées à 30°C sous agitation régulière dans un milieu liquide riche (YPD) contenant des sources préférentielles en carbone, azote et vitamines (glucose, peptones et extrait de levure). Certaines conditions expérimentales telles que la sélection de marqueurs d'auxotrophie nécessitent de faire pousser les levures dans des milieux synthétiques définis (appelé SD ou SC) moins riches que le YPD et dans lesquels les levures poussent souvent moins bien). Les levures peuvent également être cultivées sur boîtes de Petri sur un milieu solidifié avec de l'agar et où elles forment des colonies. Ainsi, afin d'obtenir une culture de levures pour des expériences en laboratoire, une pré-culture est généralement inoculée avec une colonie prélevée sur boîte et incubée pendant environ 16 h (sur la nuit). Cette pré-culture saturée (c'est-à-dire contenant des cellules ayant épuisé le glucose et ne se divisant plus ou très lentement ; voir 2.1.2.2) est ensuite diluée dans du milieu frais et incubée jusqu'à atteindre la densité cellulaire souhaitée par l'expérimentateur.

2.1.2.2 Les phases de croissance

Dans les conditions de croissance au laboratoire, les cellules passent d'abord par une courte phase de latence pendant laquelle les cellules réorganisent leurs métabolismes en réponse à la présence renouvelée de glucose dans le milieu. Elles entrent ensuite dans une phase de croissance active où elles se divisent de façon exponentielle (Figure 10, courbe rouge en section bleue) avec un temps de doublement de 90 à 110 min pour *S. cerevisiae*, ce qui est exceptionnellement rapide pour des cellules eucaryotes. Pendant cette période, les cellules fermentent le glucose par glycolyse (Figure 10, courbe violette en section bleue), libérant de l'éthanol (Figure 10, courbe jaune en section bleue) dans le milieu. Lorsque le glucose devient limitant, les cellules arrêtent transitoirement leur croissance et passent par une phase dite de transition (ou shift) diauxique (shift diauxique, Figure 10, section blanche) permettant le passage à un métabolisme respiratoire (Figure 10, section rose). Les cellules recommencent à croître à une vitesse réduite en utilisant l'oxygène et l'éthanol (Figure 10, courbe jaune en section rose) qui a été produit précédemment lors de la phase exponentielle de croissance. Lorsque l'éthanol est épuisé, les cellules rentrent dans une phase dite stationnaire (Figure 10,

section rose pâle) où elles sont arrêtées en phase G0 du cycle cellulaire et ne se divisent plus (Figure 10, courbe rouge). Selon la durée de cette phase stationnaire et les conditions de croissance, les cellules peuvent être retrouvées dans divers états physiologiques tels que la quiescence (cellules en attente de conditions permettant de se diviser et croître à nouveau) ou la senescence (cellules vivantes mais ne pouvant plus se diviser), et finissent éventuellement par mourir.

2.1.2.3 Originalité de la croissance de *S. cerevisiae*

La principale originalité métabolique de *S. cerevisiae* est son exceptionnelle adaptation à la fermentation alcoolique grâce à quoi, même en présence d'oxygène, elle convertit efficacement les sucres en éthanol, ce qui est en théorie moins efficace d'un point de vue énergétique. En présence d'oxygène, la grande majorité des cellules eucaryotes adopte un métabolisme respiratoire qui produit 36 molécules d'ATP par molécule de glucose. Cependant, en présence de grandes quantités de glucose, les levures fermentent le glucose en éthanol même en présence d'oxygène, et ne produisent que 2 molécules d'ATP par molécule de glucose. Lorsque les sucres fermentables sont épuisés, les levures réorientent leur métabolisme vers la respiration de l'éthanol.

Dans la nature, les levures vivent dans un environnement microbien complexe et doivent développer des atouts leur permettant de survivre à la compétition inter-espèces. La fermentation alcoolique est probablement une adaptation évolutive qui permet aux levures de consommer rapidement les sources de carbone communes aux microorganismes et maintenir une prolifération rapide. La production d'éthanol pourrait être une manière de stocker l'énergie sous une forme externalisée mais aussi un moyen de 'lutte' contre d'autres micro-organismes moins tolérants à l'éthanol que la levure

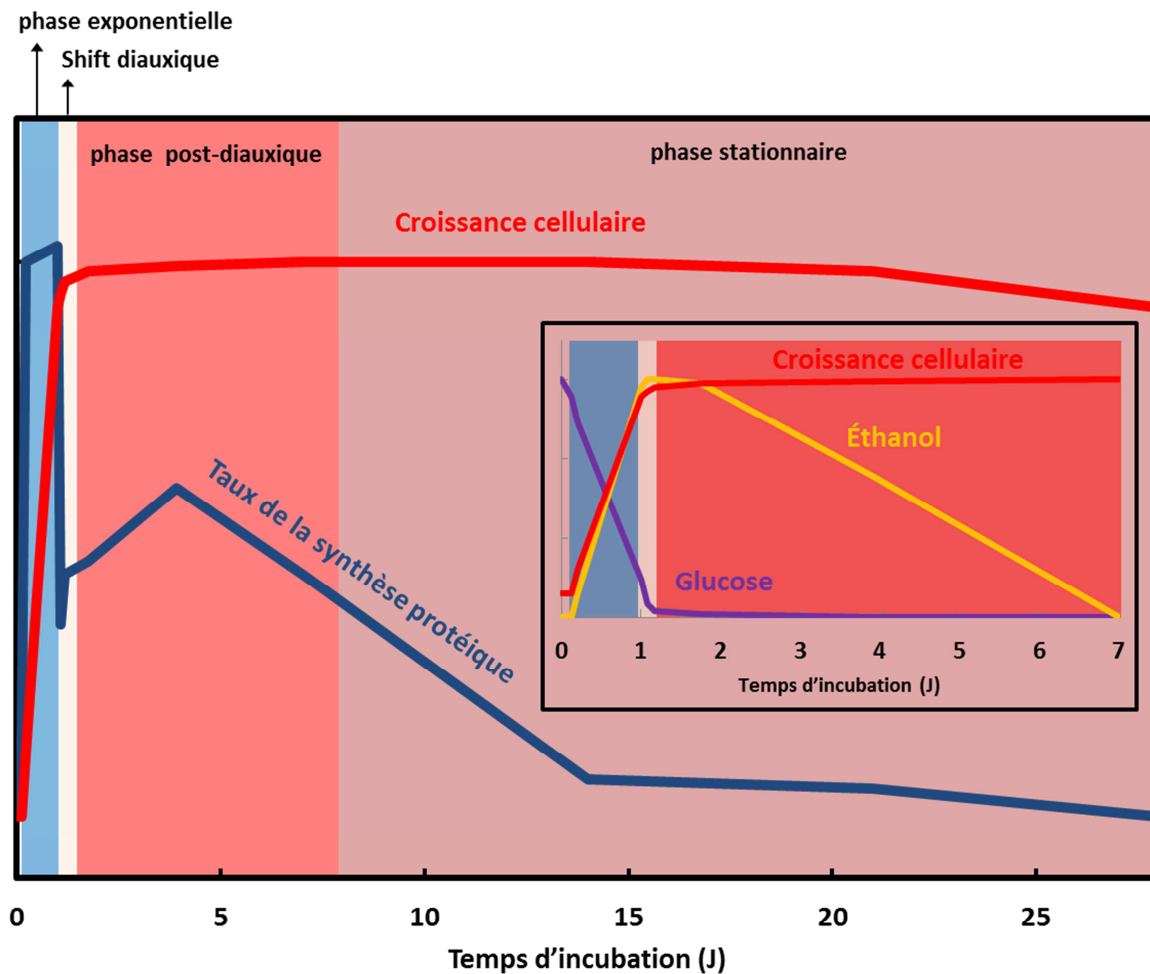


Figure 10 Croissance de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en milieu riche.

La courbe rouge représente la croissance cellulaire suivie par sa DO (densité optique) à 600 nm. La courbe bleue représente le taux de synthèse protéique au cours de la croissance (voir texte pour explications détaillées). Dans l'encart, les niveaux du glucose et d'éthanol dans le milieu de culture sont représentés respectivement par des courbes violette et jaune.

2.1.3 Phase stationnaire et quiescence

2.1.3.1 Caractéristiques des cellules en phase stationnaire

Comme mentionné ci-dessus, en cas de carence nutritive, les levures arrêtent de croître et se préparent à l'entrée en phase stationnaire. L'entrée en phase stationnaire est un processus très complexe, hautement régulé, qui active un programme pour la survie à long terme en l'absence de nutriments. Elles subissent divers changements physiologiques, biochimiques et morphologiques. Des analyses moléculaires ont identifié des changements dans la transcription et la traduction des protéines dans les cellules en phase stationnaire. Le taux de

transcription globale est d'environ 3 à 5 fois plus faible pour les cellules en phase stationnaire qu'en phase exponentielle (Choder, 1991). Cependant, les cellules en phase stationnaire peuvent mettre en place des réponses transcriptionnelles similaires à celles en phase exponentielle en réponse à différents stress (Jelinsky et al., 2000). De plus, elles sont capables d'induire très rapidement la transcription de nombreux gènes permettant la reprise de la division cellulaire lorsque les nutriments sont de nouveau disponibles. Au niveau de la traduction, le taux de synthèse protéique (Werner-Washburne et al., 1996)(Figure 10, courbe bleue) diminue fortement lors de la transition diauxique, mais augmente légèrement au cours de la phase post-diauxique. Lorsque les cellules entrent en phase stationnaire, le taux de synthèse protéique diminue spectaculairement à environ 0.3% par rapport à celui de cellules en phase exponentielle (Herman, 2002; Werner-Washburne et al., 1996). Les cellules en phase stationnaire ont des parois cellulaires épaissies (de Nobel et al., 2000) et contiennent des mitochondries plus abondantes et des chromosomes condensés morphologiquement distincts (Galdieri et al., 2010; Herman, 2002; Werner-Washburne et al., 1996). Elles induisent l'autophagie, et sont plus résistantes à la chaleur et aux stress osmotiques (Plesset et al., 1987) ainsi qu'aux traitements avec des drogues toxiques (de Nobel et al., 2000). En effet, certains changements des cellules en phases diauxique et stationnaire ressemblent à ceux observés chez des cellules ayant subi des stress oxydatifs, tels que l'induction des gènes de chaperons moléculaires et l'accumulation de tréhalose (Gray et al., 2004; Herman, 2002; Werner-Washburne et al., 1996). Pour que les cellules puissent développer ces caractéristiques de résistances lors de l'entrée en phases diauxique puis stationnaire, les cellules ont besoin de détecter sensiblement et correctement l'épuisement imminent de nutriments essentiels. Certaines carences nutritionnelles ne provoquent pas l'entrée en phase stationnaire. Ainsi lorsque des acides aminés nécessaires à la croissance de cellules auxotrophes sont limitants, ces dernières meurent rapidement au lieu de rentrer en phase stationnaire (Saldanha et al., 2004).

2.1.3.2 Les levures en quiescence

L'existence d'un véritable état de quiescence chez la levure a fait l'objet d'un débat scientifique car il est difficile de distinguer aisément les cellules en croissance lente en phase G1 des cellules en quiescence (Brauer et al., 2008; Coller, 2011; Klosinska et al., 2011). Pour ces raisons, dans de nombreuses études, la différence entre levures en croissance lente,

levures en carence nutritive et en arrêt de division, levures en croissance diauxique, quiescentes voire sénescences ou mortes, n'est pas toujours clairement établie.

La quiescence est un état physiologique ubiquitaire des cellules eucaryotes. Elle est généralement caractérisée par l'arrêt réversible de la division cellulaire, la réduction de la taille cellulaire, l'augmentation de la tolérance aux stress, la réduction du débit traductionnel et transcriptionnel, l'induction de l'autophagie et le prolongement de la longévité (Coller, 2011; Galdieri et al., 2010; Gray et al., 2004). Il a été montré que les cultures de levure en phase stationnaire n'étaient pas synchronisées et contiennent un mélange des cellules avec et sans bourgeons (Gendron et al., 2003). Une étude récente basée sur la densité des cellules (Figure 11) a montré que les cellules en phase stationnaire sont des populations mélangées ayant des propriétés morphologiques et physiologiques différentes. La population la plus dense est homogène et a la capacité d'initier à nouveau un cycle cellulaire lorsque les cellules sont remises dans un milieu frais (Allen et al., 2006). Cette population a été considérée comme étant constituée de véritables cellules en état de quiescence (cellules Q) (Aragon et al., 2008; Li et al., 2013; McKnight et al., 2015; Miles et al., 2013).

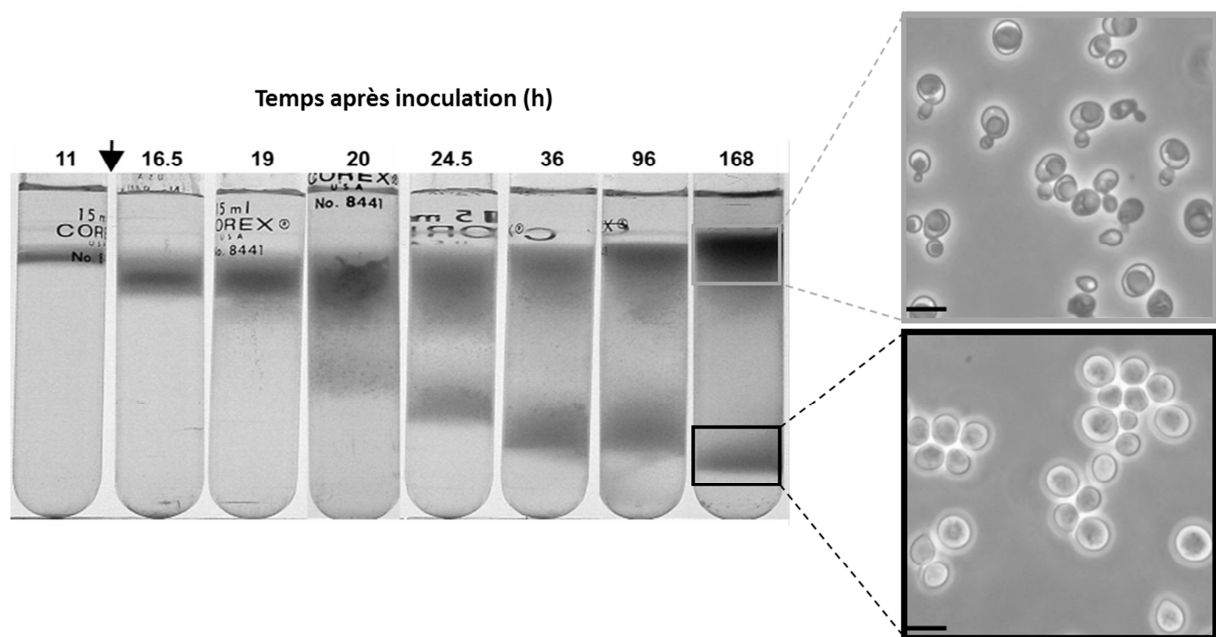


Figure 11 Purification des cellules de levure quiescentes. (Allen et al., 2006)

Séparation de cellules de levures en différentes phases de croissance sur un gradient de densité par centrifugation. Les cellules en phase stationnaire contiennent des populations ayant des propriétés morphologiques et physiologiques différentes. Les fractions en haut qui sont moins denses contiennent des cellules bourgeonnées et non-bourgeonnées. Les fractions en bas qui sont plus denses contiennent uniquement des cellules sans bourgeons. (Barre d'échelle = 10 µm)

2.1.3.3 Les marqueurs de la quiescence

Des analyses du métabolome global des cellules qui sont rentrées en quiescence par différentes voies n'ont pas révélé de marqueurs ou de signatures métaboliques spécifiques à la quiescence (Aragon et al., 2008; Klosinska et al., 2011). Cependant, ces études ont montré que le transcriptome des cellules en quiescence est clairement différent de celui de cellules arrêtées en phase G0 (Gasch et al., 2000; Martinez et al., 2004; Radonjic et al., 2005). Par ailleurs, les profils obtenus sont très différents en fonction des conditions d'entrée en quiescence (Gresham et al., 2011; Klosinska et al., 2011; Saldanha et al., 2004; Wu et al., 2004).

Certaines protéines et complexes protéiques se réorganisent au sein de différentes structures cytoplasmiques lorsque les cellules entrent en quiescence : l'actine, le principal constituant du cytosquelette, forme des corps d'actine (Sagot et al., 2006); le protéasome se réorganise en particules PSGs (*proteasome storage granules*) (Laporte et al., 2008) ; l'assemblage des P-bodies impliqués dans la dégradation des ARNm (Bregues et al., 2005; Teixeira, 2005) ; la phosphoribosylpyrophosphate amidotransférase Ade4p se ré-organise en granules (Narayanaswamy et al., 2009; Noree et al., 2010); des protéines telles que la CTP (cytosine triphosphate) synthase Ura7/Ura8 s'assemblent en structures filamenteuses (Noree et al., 2010). De plus, dans les cellules quiescentes, la compaction de la chromatine est augmentée grâce à l'activité de l'histone H1, Hho1p (Schäfer et al., 2008). Une étude récente a également révélé l'importance d'une lysine désacétylase Rpd3p dans la répression transcriptionnelle lors de l'entrée en quiescence (McKnight et al., 2015).

Les pluparts de ces réorganisations ont été observées dans des cellules quiescentes produites lors de la carence en sources de carbone. Nous ne savons pas si ces réorganisations sont spécifiques à la quiescence ou s'il s'agit seulement d'une réponse à des signaux nutritionnels concomitants à l'entrée en quiescence. En effet, un signal spécifique peut déclencher la réorganisation de complexes protéiques indépendamment de l'établissement de la quiescence. Par exemple la formation des filaments de CTP synthase dépend de la disponibilité en NTPs (nucléosides triphosphate), le produit final de la CTP synthase. La présence de NTPs inhibe l'activité enzymatique de la CTP synthase et cause sa polymérisation dans le cytoplasme (Noree et al., 2010). La présence d'adénine dans le milieu de culture entraîne la formation de

granules d'Ade4p (Noree et al., 2010). De même, différents stress cellulaires peuvent conduire à induire la formation de P-bodies (Bregues et al., 2005; Teixeira, 2005).

2.2 Vieillessement de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 La levure *Saccharomyces cerevisiae*, un modèle de recherche sur le vieillissement

2.2.1.1 La levure *Saccharomyces cerevisiae*, un modèle de cellule eucaryote

De nombreux gènes, machineries cellulaires et processus moléculaires sont très conservés entre la levure *S. cerevisiae* et d'autres espèces eucaryotes, y compris l'Homme. Il est ainsi remarquable que de nombreux gènes de levure peuvent être efficacement remplacés par leurs homologues humains, et ce malgré l'énorme distance évolutive qui sépare ce champignon unicellulaire de l'ensemble des eucaryotes supérieurs. De plus, cet organisme unicellulaire facilement manipulable a été caractérisé en détails aux niveaux génétique, génomique et moléculaire, et des outils puissants ont été développés pour modifier ou contrôler la quasi-totalité des processus cellulaires. La levure *S. cerevisiae* est le premier organisme eucaryote dont le génome ait été entièrement séquencé (Goffeau et al., 1996). Ces atouts ont fait de la levure *S. cerevisiae* un modèle biologique puissant dont l'étude a permis des avancées importantes dans la compréhension du fonctionnement d'une cellule eucaryote et de ses interactions avec son environnement. On peut par exemple citer des études pionnières sur la régulation de l'expression génique, sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse au glucose, sur le trafic intracellulaire et les mécanismes de sécrétion ou encore sur l'apoptose (Denoth Lippuner et al., 2014; De Vos et al., 2011). Plusieurs prix Nobel ont été attribués sur la base de découvertes réalisées chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, un autre modèle biologique de choix. Le dernier en date a récompensé en 2013 le Dr. Randy W. Schekman (ainsi que les Drs Thomas C. Südhof et James E. Rothman) pour ses travaux sur le trafic vésiculaire chez la levure.

2.2.1.2 Vieillessement de la levure *Saccharomyces cerevisiae* : un modèle biologique du vieillissement des cellules eucaryotes

Les signes de vieillissement sont évidents chez la plupart des organismes multicellulaires. En revanche, les organismes unicellulaires ont longtemps été considérés comme immortels. Par exemple, une culture de levure *Saccharomyces cerevisiae* peut être maintenue indéfiniment si les nutriments sont renouvelés périodiquement. Lorsque Barton a suivi la division des cellules de levure en enlevant systématiquement les cellules filles produites, il a découvert que les cellules mères individuelles finissent par mourir (Barton, 1950). De plus, cette mortalité augmente progressivement avec le vieillissement (Mortimer and Johnston, 1959). Dès lors, beaucoup d'études ont prouvé que la levure *S. cerevisiae* est un modèle précieux pour étudier la régulation du vieillissement de cellules eucaryotes en division active (Longo et al., 2012; Maskell et al., 2003). De plus en plus d'évidences ont prouvé que la levure *S. cerevisiae* en phase stationnaire est également très utile pour comprendre le processus de vieillissement de cellules eucaryotes post-mitotiques (Coller, 2011; Fabrizio and Longo, 2003; Gray et al., 2004; Longo et al., 2012).

2.2.2 Notions de vieillissement répliatif et chronologique

Comme tous les organismes vivants, la levure naît, vit, et finit par mourir, parfois de « vieillesse ». Ainsi la levure a été utilisée avec succès comme modèle pour étudier les mécanismes impliqués dans la longévité. Il existe deux paradigmes d'étude du vieillissement chez la levure : le **vieillessement répliatif** (RLS, *replicative lifespan*) et le **vieillessement chronologique** (CLS, *chronological lifespan*) (Hartl, 2016; Longo et al., 2012).

Le RLS est défini par le nombre de cellules filles qu'une cellule mère peut produire avant d'entrer en sénescence (Mortimer and Johnston, 1959). Chaque division cellulaire laisse une cicatrice (Figure 12) permettant de compter le nombre de cellules filles produites (Pringle, 1991). Cette cicatrice est issue du double anneau de septine qui se forme au niveau du site de bourgeonnement et qui permet la constriction et la séparation de la cellule fille de la cellule mère. Le RLS peut être mesuré avec plus de précision par micromanipulation sous microscope en déplaçant et en comptant les petites cellules filles au fil des divisions cellulaires. La principale conclusion de la recherche sur le RLS est que les cellules de levure

ne se divisent pas éternellement. Au contraire, elles s'arrêtent après un nombre limité de divisions cellulaires (normalement 20 à 25) avant d'entrer dans une période de sénescence suivie par la mort cellulaire (Mortimer and Johnston, 1959).

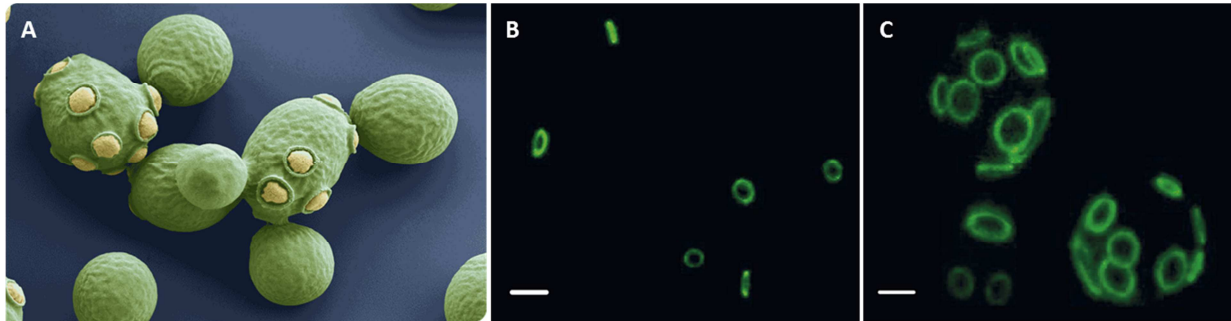


Figure 12 Images représentatives des cicatrices de bourgeonnements

A : Le bourgeonnement laisse des cicatrices (visibles en microscopie électronique) sur la surface des cellules mères.

(http://www.microbiologyonline.org.uk/themed/sgm/img/slideshows/3.1.4_fungi_2.png)

B et C : Images en microscopie confocale de cellules vierges (B, barre d'échelle = 5 μm) qui présentent une seule cicatrice et des vieilles cellules (C, barre d'échelle = 3 μm) qui présentent plusieurs cicatrices en fonction de leurs âges. (Powell et al., 2003)

Le CLS est défini par la durée pendant laquelle des cellules de levure quiescentes peuvent rester viables en l'absence de nutriments. La viabilité est évaluée par la capacité des levures à se diviser et former des colonies (CFU, *Colony Forming Unit*) lorsqu'elles sont transférées d'un milieu appauvri ou de l'eau à un milieu riche. Les levures cultivées en milieu minimum atteignent normalement la densité maximale en moins de 3 jours d'incubation et survivent pendant environ 6 jours. La phase post-diauxique dans ce milieu synthétique est extrêmement courte. Au contraire, en milieu riche, après 3 jours d'incubation, les cellules maintenues dans le milieu YPD épuisé ou transférées dans l'eau peuvent survivre pendant plusieurs semaines. Elles ont donc une phase stationnaire prolongée (Fabrizio and Longo, 2003; Longo et al., 2012).

Ces deux modèles de vieillissement chez la levure *S. cerevisiae* (mais également chez *S. pombe*) sont des outils utiles pour l'étude mécanistique et la comparaison des processus de vieillissement de cellules proliférantes et non-proliférantes. Le RLS est considéré comme comparable à des phénomènes de vieillissement observés chez les cellules eucaryotes supérieures en division ; le CLS est utile pour le vieillissement des cellules en arrêt de division telles que les neurones (Denoth Lippuner et al., 2014; Fabrizio and Longo, 2003; Hartl, 2016; Longo et al., 2012).

2.2.3 Marqueurs du vieillissement

2.2.3.1 Les marqueurs du vieillissement

Kennedy et ses collègues ont montré que la durée de vie des cellules filles était moins longue lorsque celles-ci sont issues de vieilles cellules mères (Kennedy et al., 1994). Ces données suggèrent que les cellules mères vieilles « transmettent leur âge » aux dernières cellules filles qu'elles produisent au cours de leur vie. Une autre étude a montré que lorsque l'on croise une cellule vieille avec une cellule jeune, la durée de vie répllicative du zygote est déterminée par la cellule haploïde la plus âgée (Müller, 1985), ce qui suggère que le vieillissement est un phénotype dominant. Toutes ces observations ont conduit à proposer l'existence de marqueurs du vieillissement qui s'accumulent dans les cellules au cours de leur vie. Ces marqueurs du vieillissement sont retenus dans la cellule mère lors de la division cellulaire au cours du vieillissement réplificatif (Denoth Lippuner et al., 2014; Shcheprova et al., 2008). Ils sont aussi accumulés dans les cellules au cours du vieillissement chronologique. Il a ainsi été montré que les cellules maintenues en phase stationnaire pendant longtemps ont des durées de vie réplificatives raccourcies (Ashrafi et al., 1999; Maskell et al., 2003).

Les marqueurs du vieillissement devraient répondre à quatre critères (Denoth Lippuner et al., 2014; Henderson and Gottschling, 2008) : 1, ils devraient s'accumuler avec l'âge ; 2, ils devraient être séquestrés asymétriquement dans les vieilles cellules lors de la mitose ; 3, la prévention ou la réduction des marqueurs du vieillissement devraient conduire à l'extension de la durée de vie cellulaire ; et 4, l'augmentation du niveau des marqueurs de vieillissement devrait réduire la durée de vie cellulaire. Cette définition suppose que les marqueurs du vieillissement sont des composants cytotoxiques que les cellules n'arrivent pas à restaurer ou éliminer. Plusieurs marqueurs du vieillissement ont été identifiés chez la levure *S. cerevisiae*, tels que les agrégats protéiques, les mitochondries fragmentées et endommagées, les grosses vacuoles, les cercles d'ADNr extrachromosomiques (ERCs), etc. (Figure 13) (Denoth Lippuner et al., 2014).

2.2.3.2 Les marqueurs de vieillissement sont asymétriquement distribués entre les cellules mères et les cellules filles

La division cellulaire asymétrique est un processus où les composants cellulaires sont distribués asymétriquement dans deux cellules ayant des caractéristiques et destins différents. Ce processus est essentiel pour le développement cellulaire et pour la maintenance du nombre et de la différenciation des cellules souches chez les organismes supérieurs multicellulaires (Higuchi-Sanabria et al., 2014). Il est présent également dans les cellules unicellulaires comme les bactéries et la levure (Denoth Lippuner et al., 2014; Higuchi-Sanabria et al., 2014; Lord and Wheals, 1980).

Durant la division cellulaire chez la levure, les composants endommagés sont séquestrés et retenus asymétriquement dans les cellules mères (Figure 13). Plusieurs études ont révélé que le cytosquelette cellulaire pourrait agir de façon active ou passive dans la distribution asymétrique des marqueurs du vieillissement au cours de la division cellulaire (Fehrenbacher et al., 2004; Liu et al., 2011). Il pourrait agir comme un filtre pour empêcher la transmission des matériels endommagés de la cellule mère à la cellule fille (Higuchi et al., 2013).

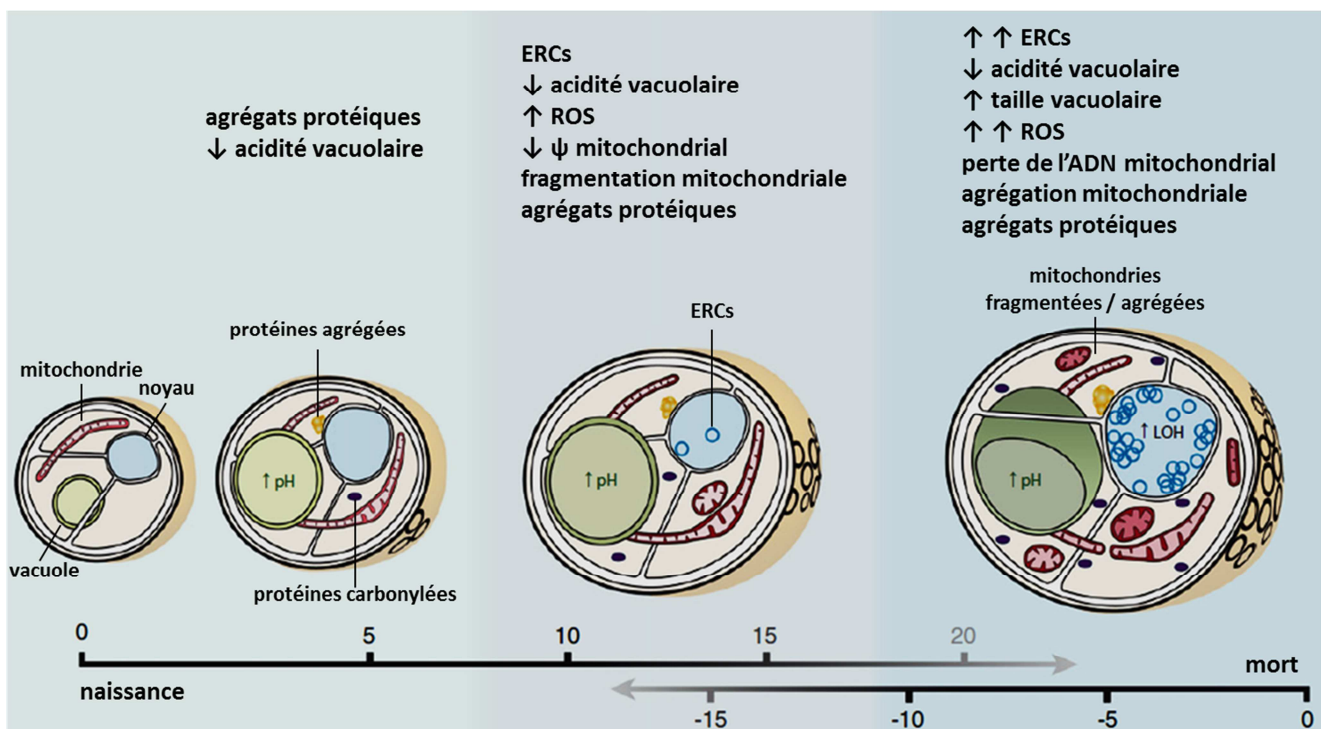


Figure 13 Rétention asymétrique des marqueurs de vieillissement dans les cellules mères au cours du vieillissement. (Denoth Lippuner et al., 2014)

Les marqueurs du vieillissement sont retenus de façon asymétrique et s'accumulent progressivement dans les cellules mères. Dans le cytoplasme, les protéines agrégées et carbonylées sont retrouvées dans les vieilles cellules. Les agrégats protéiques sont souvent attachés à la membrane (IPOD et JUNQ) et co-localisent avec Hsp104 ; La taille ainsi que l'acidité de la vacuole augmentent dans les cellules mères au cours du vieillissement ; Dans le noyau, les cercles d'ADNr extrachromosomique (ERCs) sont formés par la recombinaison homologue des répétitions d'ADNr. Les ERCs sont fortement retenus dans les cellules mères ; Les mitochondries sont fragmentées et agrégées dans les vieilles cellules, et leurs potentiels membranaires (ψ) diminuent également. En même temps, le niveau de ROS augmente dans les vieilles cellules mères.

Chez la levure *S. cerevisiae*, les marqueurs du vieillissement sont retenus dans la cellule mère et les organelles fonctionnelles et les facteurs de rajeunissement sont transportés et/ou enrichis dans la cellule fille au cours de la division cellulaire. Cela permet la production d'une cellule fille immaculée ayant la potentialité d'avoir une durée de vie complète (Figure 14) (Shcheprova et al., 2008). La présence des marqueurs du vieillissement raccourcit la durée de vie cellulaire et ralentit la croissance cellulaire : les cellules filles de très vieilles cellules mères ont une durée de vie réduite (Kennedy et al., 1994); la durée de la division cellulaire augmente progressivement pour les cellules mères et pour les dernières cellules filles produites tardivement avant la mort cellulaire (Egilmez and Jazwinski, 1989). Cependant, ces dernières produisent des cellules filles dépourvues de ces marqueurs de vieillissement et ayant une durée vie normale (Figure 14, première colonne à droite) (Egilmez and Jazwinski, 1989; Kennedy et al., 1994; Lee et al., 2012; Xie et al., 2012).

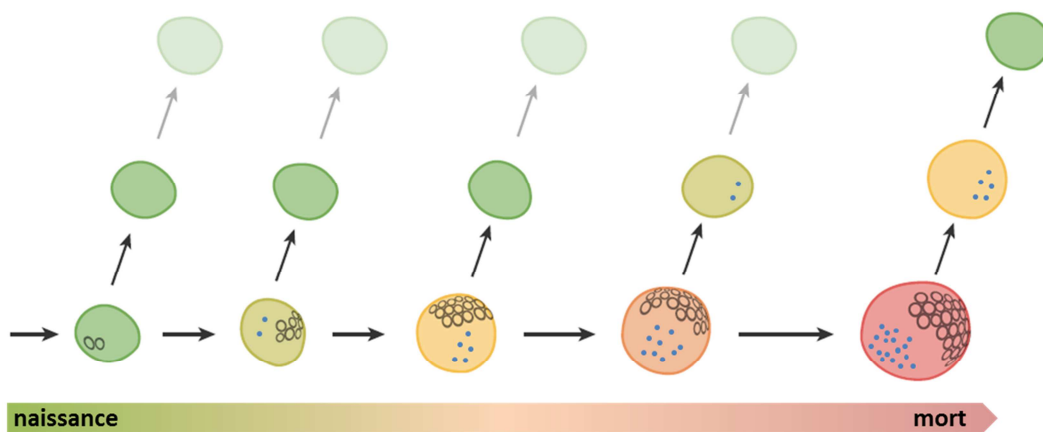


Figure 14 Représentation schématique du vieillissement réplcatif chez la levure. (Denoth Lippuner et al., 2014)

La rétention asymétrique des marqueurs du vieillissement permet le rajeunissement des cellules filles. La taille des cellules augmente au cours du vieillissement. Les couleurs correspondent à l'âge des cellules. Les cercles représentent les cicatrices laissées par chaque bourgeonnement. Les points représentent les marqueurs du vieillissement.

2.3 Liens entre agrégation des protéines et vieillissement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Lors que les cellules vieillissent, les protéines endommagées commencent à s'accumuler dans le cytoplasme en formant des agrégats protéiques. Ces agrégats protéiques sont préférentiellement conservés dans la cellule mère au cours de la division cellulaire, ce qui permet la production d'une cellule fille avec une durée de vie complète, mais en même temps accélère le vieillissement des cellules mères (Denoth Lippuner et al., 2014; Higuchi-Sanabria et al., 2014). Deux hypothèses peuvent expliquer cette ségrégation asymétrique : 1, la séquestration des protéines endommagées dans les cellules mères ; 2, l'élimination des agrégats protéiques des cellules filles (soit par dégradation soit par transport rétrograde de la cellule fille vers la cellule mère). Les deux processus sont importants pour assurer la survie des cellules rajeunies (Liu et al., 2011; Spokoini et al., 2012). Trois exemples types d'agrégats protéiques sont présentés un peu plus en détails dans les prochains paragraphes.

2.3.1 Les différents types d'agrégats protéiques dans les cellules

Agrégats induits par le choc thermique

Le stress induit par un bref shock thermique peut conduire à l'agrégation des protéines. Les agrégats protéiques induits par le choc thermique (HSG, *heat shock granule*) sont préférentiellement retenus dans la cellule mère. Cette rétention asymétrique est médiée par des composants du CQP tels que les chaperons Hsp104, Hsp42 ou encore le protéasome (Escusa-Toret et al., 2013; Specht et al., 2011; Zhou et al., 2011). Des liens importants existent aussi avec le cytosquelette (Liu et al., 2011) et des compartiments cellulaires tels que le réticulum endoplasmique (ER) ou les mitochondries (Zhou et al., 2014). Une étude protéomique par spectrométrie de masse a permis l'identification de plus de 170 protéines endogènes qui sont sensibles à la chaleur (Wallace et al., 2015). De plus, ils ont montré que la plupart des agrégats protéiques induits par un choc thermique sont resolubilisés et renaturés lors que les cellules sont remises à la température normale.

IPOD et JUNQ

Deux structures correspondant à des inclusions protéiques ont été identifiées: JUNQ/INQ (*juxtannuclear/intranuclear quality control compartment*) et IPOD (*insoluble protein deposit*).

Ces deux compartiments protéiques sont invariablement retenus dans la cellule mère lors de la division cellulaire (Kaganovich et al., 2008). Les IPODs sont formés suite à la surexpression de prions de levure, telles que Rnq1p, Ure2p, ou encore de l'exon-1 de l'huntingtine humaine contenant un domaine polyglutamines (Htt103Q). Ces structures se retrouvent à proximité de la vacuole et échangent très peu avec le cytoplasme. Les JUNQs/INQs sont formés suite à l'inhibition du protéasome par le MG132 et contiennent des protéines ubiquitinées telles que VHL (*Von Hippel Lindau protein*). JUNQs/INQs sont retrouvés à proximité ou à l'intérieur du noyau cellulaire et peuvent être désassemblés par l'action du protéasome et des chaperons moléculaires.

Dépôts protéiques associés au vieillissement

La plupart des investigations sur cette problématique ont été réalisées sur des cellules soumises à divers stress comme facteurs déclenchants de l'agrégation protéique. Récemment, Saarikangas et Barral ont étudié l'agrégation des protéines dans des conditions normales chez la levure *S. cerevisiae* au cours du vieillissement. Ils ont montré que les levures développent un dépôt de protéines agrégées (APOD) pendant le vieillissement précoce qui est retenu asymétriquement dans la cellule mère et se maintient comme un seul dépôt protéique pour le restant de la vie cellulaire. Cette structure associée au vieillissement est différente des inclusions protéiques induites par les stress. La formation du dépôt APOD dépend du chaperon Hsp42 qui recrute de façon non-aléatoire des protéines clientes pour la machinerie de repliement Hsp104/Hsp70/Hsp40. Parmi ces protéines clientes, on retrouve par exemple la forme soluble de la protéine prion Sup35p. De plus, la perte de Hsp42 conduit à une distribution symétrique des agrégats protéiques et prolonge la durée de vie de la cellule mère. (Saarikangas and Barral, 2015).

2.3.2 Effet des agrégats protéiques sur le vieillissement

L'homéostasie cellulaire est finement contrôlée par de nombreuses voies cellulaires en interaction les unes avec les autres et avec des facteurs environnementaux (Figure 1). Un système CQP entièrement fonctionnel constitue un système tampon contre les déstabilisations causées par différents stress (Figure 15, cercle vert). Cependant, des protéines mutées ou des protéines intrinsèquement désordonnées métastables (e.g. les protéines prions) ont tendance à s'agréger lorsque la capacité du système CQP est dépassée (Figure 15, cercle rouge) (Balchin et al., 2016; Hartl, 2016; Kim et al., 2013; Taylor and Dillin, 2011). La capacité du CQP

s'effondre progressivement au cours du vieillissement (Balchin et al., 2016; Hartl, 2016). L'aggrégation protéique interfère directement avec la fonctionnalité du CQP, et constitue à la fois le résultat et la cause d'un CQP effondré (Figure 15). Autrement dit, le vieillissement et l'aggrégation protéique forment un cercle vicieux : la perte de fonctionnalité du CQP au cours du vieillissement favorise l'aggrégation protéique ; en retour l'aggrégation protéique accélère le vieillissement.

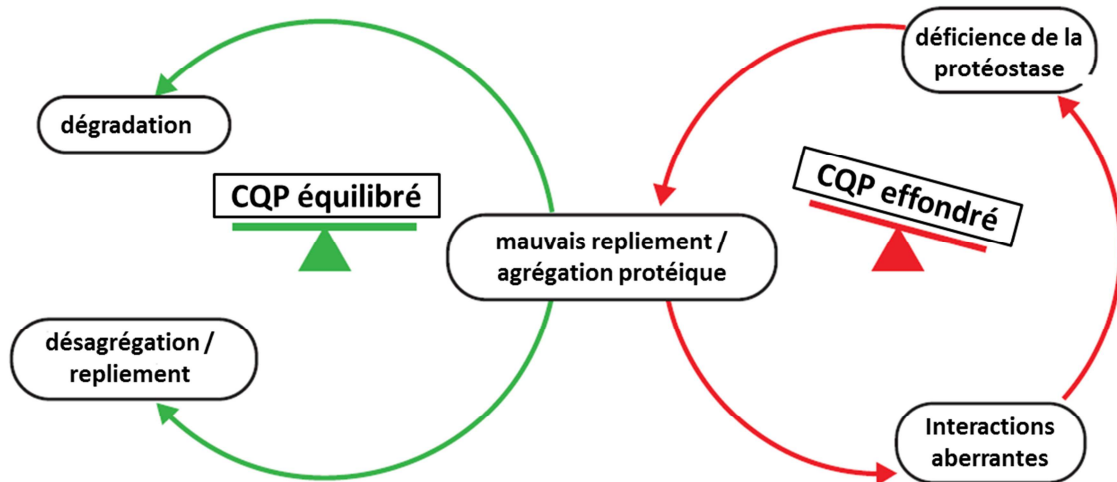


Figure 15 CQP équilibré versus CQP effondré. (Balchin et al., 2016)

La gestion des agrégats protéiques est critique dans la détermination de la viabilité et la durée de la vie cellulaire. Les protéines ont été optimisées pour maintenir leur solubilité à des températures et des concentrations physiologiques au cours de l'évolution. Ainsi, des variations de température ou d'abondance peuvent conduire à une perte de solubilité de certaines protéines particulièrement sensibles à ces paramètres. De manière intéressante, des études récentes ont proposé que les cellules séquestrent activement les protéines en surplus ou mal repliées dans des dépôts protéiques transitoires ou stables lorsque leur dégradation rapide échoue (Cohen et al., 2006; Escusa-Toret et al., 2013; Falsone et al., 2012; Kaganovich et al., 2008; Sontag et al., 2014; Wallace et al., 2015; Walther et al., 2015). Il a aussi été supposé que la formation de certaines inclusions protéiques pouvaient correspondre à une réponse cellulaire adaptative impliquée dans la régulation de processus cellulaires par modification d'activités enzymatiques (Petrovska et al., 2014), de l'expression génétique (Decker and Parker, 2012) ou par le stockage de complexes protéiques (Laporte et al., 2008). La formation de ces structures est souvent contrôlée par les chaperons moléculaires. Pour les distinguer des

agrégats amorphes causées par des protéines mal-repliées, de telles structures ont été nommées « corps coalescents » (Tableau 1).

Bien que la présence de corps coalescents puisse aider les cellules à survivre sous certaines conditions de stress, la persistance à long terme d'agrégats protéiques tels que les agrégats amyloïdes sont intimement liés aux pathologies du vieillissement.

Tableau 1 Caractérisation des corps coalescents chez les levures

Corps coalescent	Etat physique et stabilité	Principe(s) de formation	Fonction(s)	Localisation	protéine(s) chargée(s) étudiée(s)	chaperon(s) associé(s)
Dépôt protéique associé au vieillissement (APOD)	Vraisemblablement des agrégations amorphes ou amyloïdes (non caractérisé). Faible turnover. Persistant et irréversible.	Formation durant le vieillissement réplicatif. Favorisé par Hsp42, et empêché par Hsp104/Hsp70 et Mca1.	Site de collection des protéines agrégées qui régule le contrôle qualité protéique au cytosol. Associé avec le vieillissement.	non caractérisé	prion Sup35p	Hsp104 Hsp70 Ydj1 les petits Hsps
Agrégats induits par le choc thermique. (Q-bodies, CytoQ, stress foci)	Vraisemblablement des agrégations amorphes. Turnover élevé. Réversible.	Formation lors du stress thermique.	Mécanisme de stockage des protéines pendant le stress. Favorise l'homéostasie cellulaire.	cytoplasme et noyau (membrane ER)	~ 170 protéines endogènes. Des marqueurs exogènes comme Ubc9ts et VHL.	Hsp110 Hsp104 Hsp90 Hsp70 Ydj1 les petits Hsps
IPOD	Des agrégats amyloïdes. Faible turnover. Persistant (vraisemblablement irréversible)	Surexpression des protéines amyloïdogéniques.		localisé sur la membrane de la vacuole du côté cytosol	Rnq1p, Ure2p, Huntingtin PolyQ (103), (Ubc9ts)	Hsp104 Hsp42
INQ/JUNQ	Des agrégats amorphes. Turnover élevé. Réversible.	Surexpression de VHL et inhibition du protéasome. Déstabilisé par la désubiquitinase Ubp3	Site de stockage ou d'opération pour les protéines mal-repliées ubiquitinées. Organisation nucléaire en cas d'endommagement ADN.	associé avec l'enveloppe nucléaire	VHL (Ubc9ts). 13 protéines endogènes.	Hsp104 Hsp70 Sis1 les petits Hsps Btn2
PSG (proteasome storage granules)	Réversible	Formation lors de l'entrée à la phase de quiescence, chute de pH.	non caractérisé	cytoplasme	Rpn12, Scl1, Pre6	Hsp42

(Saarikangas and Barral, 2016)

3 Les protéines prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

3.1 Généralités sur les prions de levure

3.1.1 Les prions, agents infectieux de nature protéique

Les prions sont des protéines qui ont la capacité d'adopter des conformations non natives qui serviront d'amorces pour la conversion et le recrutement de monomères homologues au sein d'agrégats insolubles de haut poids moléculaire. Il s'agit donc de vecteurs d'une véritable hérédité structurale qui peuvent se propager d'une cellule à l'autre, voire d'un organisme à l'autre, transmettant ainsi leur conformation anormale aux protéines homologues dans un mécanisme qualifié d'auto-réplicatif.

Le terme « **prion** » a été proposé pour la première fois en 1982 par Stanley B. Prusiner (Prusiner, 1982), et correspond à l'acronyme de '*proteinaceous infectious particles*'. Pour « sa découverte d'un nouveau principe biologique de l'infection, le prion », Stanley Prusiner a été lauréat du prix Nobel de Physiologie ou Médecine en 1997. En effet, diverses hypothèses ont été proposées dans les années 80 concernant la nature des agents infectieux qui causaient des maladies dégénératives telles que la tremblante de mouton, la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou le Kuru. La résistance étonnante de ces agents infectieux à la digestion par des nucléases ou encore aux irradiations UV n'était pas compatible avec des agents infectieux à base d'acides nucléiques, telles qu'une infection virale ou microbienne. En revanche, plusieurs groupes de recherche ont montré que ces agents infectieux pouvaient être inactivés par des protéases (protéinase K, trypsine, etc.) ou par des dénaturants agissant sur les protéines (thiocyanate de guanidium, SDS, phénol, urée etc.), suggérant que ces agents infectieux pouvaient être de nature protéique. Prusiner et ses collègues ont isolé une protéine nommée prion (PrP^{Sc} , Sc pour scrapie) à partir de cerveaux de hamsters infectés par la maladie de la tremblante du mouton (Bolton et al., 1982). Des travaux ultérieurs ont montré que l'agent infectieux PrP^{Sc} et la protéine native PrP^{c} sont codés par le même gène chromosomique (Basler et al., 1986; Oesch et al., 1985). La démonstration qu'une souris transgénique dépourvue du gène codant pour la PrP était insensible à l'agent pathogène responsable de ces encéphalopathies transmissibles a fortement soutenu l'hypothèse de transmission par un agent de nature uniquement protéique (*protein-only*) (Sailer et al., 1994).

Plusieurs autres protéines se comportant comme des prions ont été également identifiées chez l'Homme tels que le peptide amyloïde- β et tau pour la maladie d'Alzheimer (AD), l' α -synucléine pour la maladie de Parkinson (PD) et la huntingtine pour la maladie de Huntington (HD). Toutes ces protéines peuvent former des agrégats protéiques infectieux qui sont à l'origine de l'initiation et de la progression de ces pathologies.

Des prions sont également retrouvés chez des microorganismes tels que la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* et le champignon filamenteux *Podospora anserina* (Aguzzi and Calella, 2009; Brundin et al., 2010; Colby and Prusiner, 2011; Liebman and Chernoff, 2012).

3.1.2 Les prions de levure, un modèle d'étude des protéines infectieuses

Les prions de levure et les protéines prions humaines présentent des similitudes évidentes en terme de structures, de mécanismes de formation et de propagation ou encore en terme d'interaction avec les chaperons moléculaires (Bousset and Melki, 2002). La levure a ainsi été utilisée comme système modèle pour l'étude de l'agrégation de protéines impliquées dans des maladies neurodégénératives (e.g. AD, PD et HD).

Dans les années 60-70, les chercheurs ont décrit chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* les phénotypes $[PSI^+]$ (Cox, 1965) et $[URE3]$ (Aigle and Lacroute, 1975) et montré qu'ils étaient dominants et hérités de manière non-Mendélienne. S'inspirant des travaux sur la protéine prion PrP^{Sc} chez les mammifères, le généticien Reed Wickner a le premier proposé en 1994 que ces phénotypes sont causés par les formes prions des protéines Sup35p (Patino et al., 1996; Paushkin et al., 1996; Ter-Avanesyan et al., 1994) et Ure2p (Wickner, 1994). Les arguments en faveur de cette hypothèse sont les suivants : 1) les phénotypes $[PSI^+]$ et $[URE3]$ correspondent respectivement à des mutations « perte-de-fonction » des gènes *SUP35* et *URE2* ; 2) ces phénotypes peuvent être perdus par les cellules sous certaines conditions, mais sont capables de réapparaître spontanément sans introduction d'un matériel génétique étranger (plasmide ou virus) dans les cellules ; 3) la propagation de $[PSI^+]$ et $[URE3]$ nécessite la présence de domaines prion (PrD), requis pour l'agrégation des protéines Sup35p et Ure2p ; 4) la fréquence d'apparition de ces phénotypes augmente fortement lorsque Sup35p ou Ure2p sont surexprimées (Bousset and Melki, 2005).

[*PSI*⁺] et [*URE3*] sont les prions les plus étudiés chez la levure, mais une vingtaine d'autres prions ont été récemment identifiés chez la levure *S. cerevisiae* (Alberti et al., 2009; Crow and Li, 2011; Nizhnikov et al., 2014). Les protéines prions chez la levure *S. cerevisiae* partagent des caractéristiques communes comme la présence d'un PrD, domaine généralement dispensable pour la fonction de ces protéines (lorsque celle-ci est connue) mais strictement requis pour leur conversion vers leur forme prion.

3.2 Les prions [*PSI*⁺] et [*URE3*] chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1 Les protéines prions Sup35p et Ure2p

Sup35p est un facteur de terminaison de la traduction, homologue de la protéine humaine eRF3 (*eukaryotic translational release factor 3*). Ure2p est un régulateur négatif de l'utilisation des sources d'azote pauvre en présence d'éléments nutritifs préférentiels tels que l'ammonium. Ces protéines sont respectivement à l'origine des phénotypes [*PSI*⁺] et [*URE3*] chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Chez la levure, le gène *SUP35* codant pour Sup35p est un gène essentiel, sa délétion étant létale pour les cellules. La protéine Sup35p possède 685 acides aminés et est composée de trois domaines (Figure 16A) : 1) le domaine N-terminal N(PrD), comprenant les résidus 1-123, est strictement requis pour l'agrégation de Sup35p sous sa forme prion. Ce domaine est particulièrement enrichi en glutamines et asparagines et contient également des répétitions d'un oligopeptide ayant comme séquence consensus PQGGYQQ-YN; 2) le domaine intermédiaire M (résidus 124-253) est riche en acides aminés chargés et requis pour la solubilité de la protéine et la stabilité de [*PSI*⁺]; 3) le domaine C-terminal C (résidus 254-685) possède une activité GTPase et il est impliqué dans la fonction de terminaison de la traduction (Stansfield et al., 1995). Ce domaine est nécessaire et suffisant pour la viabilité de la levure.

Le gène *URE2* codant pour Ure2p n'est pas essentiel et des mutants *ure2Δ* sont viables. La protéine Ure2p est composée de 354 acides aminés qui se divisent en deux domaines (Figure 16B) : 1) un domaine PrD en N-terminal riche en Q/N est à l'origine de l'apparition du prion [*URE3*]; 2) un domaine C nécessaire pour sa fonction de régulation du métabolisme azoté. Sous sa forme native, Ure2p forme des dimères via son domaine C (Thual et al., 2001). Le domaine C de Ure2p a une structure similaire à celle des glutathion-S-transférases (GST) et se

lie au glutathion avec une grande affinité (Bousset et al., 2001a, 2001b). Il a été montré que Ure2p a également une activité peroxydase *in vitro* (Bai et al., 2004). Ure2p pourrait donc avoir un rôle supplémentaire dans la protection des cellules contre les stress oxydants. En effet, les cellules mutantes $\Delta ure2$ sont hypersensibles à un grand nombre d'agents oxydatifs et métaux lourds (Cardenas et al., 1999).

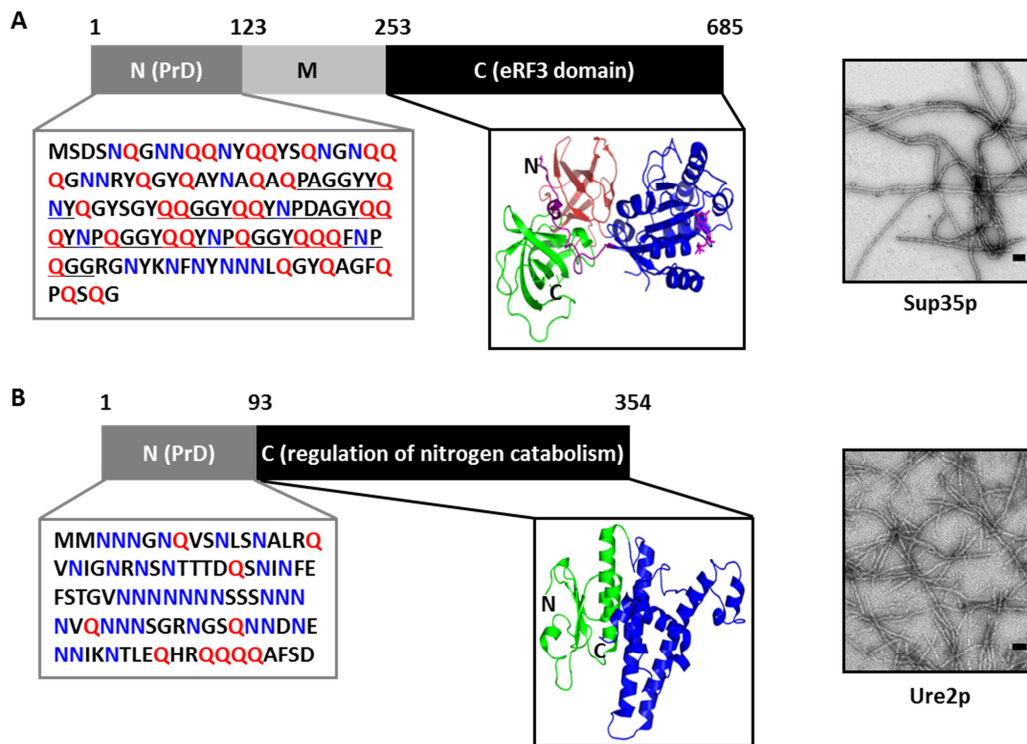


Figure 16 Organisation structurale des protéines prions Sup35p et Ure2p chez la levure *S. cerevisiae* (Kabani and Melki, 2011)

Les domaines PrDs sont représentés en gris foncé et leurs compositions en acides aminés sont montrées. Les répétitions d'oligopeptides dans le domaine PrD de Sup35p sont soulignées. Le domaine M de Sup35p est représenté en gris clair. Les domaines C-terminaux sont représentés en noir et leurs fonctions biologiques sont indiquées. Les structures atomiques de Sup35p (code PDB : 1R5N) (Kong et al., 2004) et Ure2p (code PDB : 1G6Y) (Bousset et al., 2001b) sont aussi montrées. Les images en microscopies électroniques en coloration négative des fibres de Sup35p et Ure2p sont présentées à droite (Barre d'échelle = 0.1 μm).

Les domaines PrD de Sup35p et Ure2p sont supposés être désordonnés dans la protéine native de ces protéines car ils sont notamment sensibles à la protéolyse (Kabani et al., 2014; Taylor et al., 1999; Wang et al., 2015). Seuls les domaines C qui sont structurés ont permis des études structurales au niveau atomique (Figure 16) (Bousset et al., 2001a; Kong et al., 2004). Lors de la polymérisation de Sup35p en fibres, son PrD subit de grands changements conformationnels qui conduisent à la formation d'un cœur amyloïde (Gorkovskiy et al., 2014;

Schütz et al., 2014). L'organisation structurale du domaine C au sein des fibres sera discutée plus loin. Par contre, Ure2p sous sa forme fibrillaire conserve une conformation quasi-native (Bousset et al., 2002, 2003, 2004; Redeker et al., 2007).

3.2.2 Fonctions et phénotypes [*PSI*⁺] et [*URE3*]

3.2.2.1 La terminaison de la traduction médiée par Sup35p et le phénotype [*PSI*⁺]

Chez les eucaryotes, la terminaison de la traduction se met en place lorsqu'un codon stop (UAA, UGA, UAG) entre dans le site accepteur A du ribosome. Ce processus nécessite deux protéines, eRF1 et eRF3 (connues respectivement sous les noms Sup45p et Sup35p, chez la levure), qui se fixent sur au niveau du site A du ribosome en formant un complexe eRF1/eRF3/GTP. eRF1 est responsable de la reconnaissance du codon stop. Après hydrolyse du GTP par eRF3, eRF1 déclenche l'hydrolyse du polypeptidyl-ARNt et permet la libération de la protéine nouvellement synthétisée (Jackson et al., 2012; Mugnier and Tuite, 1999). Frolova et al. ont montré que eRF1 stimule l'activité GTPase de eRF3 (Frolova et al., 1996). Kononenko et al ont montré que le domaine C-terminal de eRF1 seul n'était pas suffisant pour stimuler la fixation et l'hydrolyse du GTP par eRF3. Le domaine intermédiaire M de eRF3 (mais pas son domaine N-terminal) est également exigé pour les deux procédés (Kononenko et al., 2007). En retour, eRF3 stimule l'activité peptidyl-ARNt hydrolase de eRF1, et cette réaction est abrogée en présence de GMP-PNP, un analogue non hydrolysable du GTP, GMP-PNP (Alkalaeva et al., 2006). Ainsi, eRF1 et eRF3 agissent de façon synergique pour la reconnaissance des codons stop et la libération des polypeptides néo-synthétisés.

L'étude de la terminaison de la traduction chez la levure a été facilitée par l'étude de mécanismes de translecture au niveau de mutations non-sens. Un exemple type est l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1* qui comporte un codon stop UGA précoce dans la séquence codante de ce gène impliqué dans la voie de biosynthèse de l'adénine (Chernoff et al., 1995; Cox, 1965). Cet allèle est couramment utilisé pour visualiser la présence du prion [*PSI*⁺] chez la levure. Ainsi, dans des souches *ade1-14*, les cellules [*psi*⁻] sont auxotrophes pour l'adénine et forment des colonies rouges alors que les cellules [*PSI*⁺] sont prototrophes pour l'adénine et forment des colonies blanches (voir explications détaillées dans la légende de la Figure 17).

De plus, il existe différentes souches du prion $[PSI^+]$ ayant des phénotypes de suppression non-sens différents et qui forment des colonies ayant des couleurs allant du rose au blanc (voir 3.2.4).

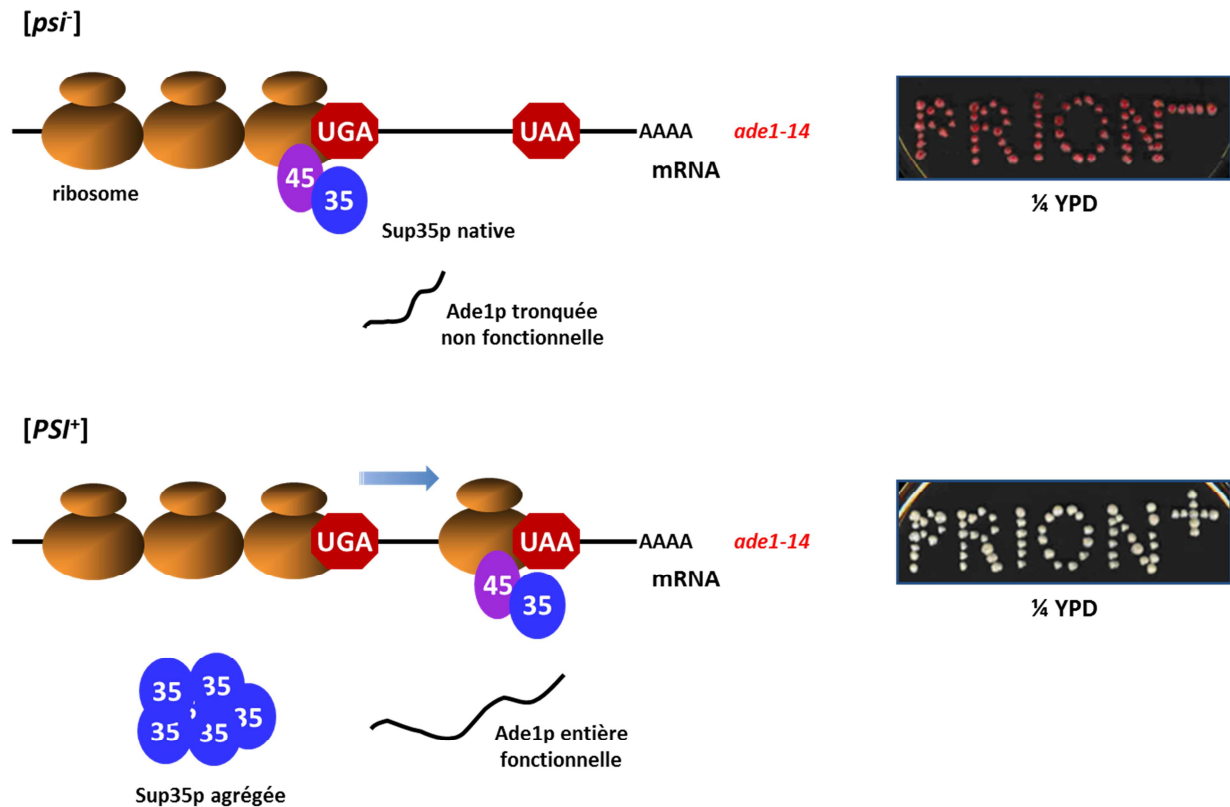


Figure 17 Système rapporteur permettant de visualiser la présence du prion $[PSI^+]$ chez la levure *S. cerevisiae*. (Crédit photo : Gary W. Jones)

La terminaison de la traduction dans des cellules non-prion $[psi^-]$ (haut) est médiée par l'interaction de Sup45p et Sup35p. L'allèle *ade1-14* contient un codon stop UGA qui empêche la synthèse d'une protéine Ade1p fonctionnelle. Les cellules $[psi^-]$ sont donc auxotrophes pour l'adénine et présentent une coloration rouge due à l'accumulation d'un précurseur métabolique dans la voie de biosynthèse de l'adénine. Dans des cellules $[PSI^+]$ (bas), une fraction significative de Sup35p est agrégée sous sa forme prion. La terminaison de la traduction est ainsi moins efficace et le taux de translecture plus élevé. Des protéines Ade1p fonctionnelles peuvent donc être synthétisées. Les cellules $[PSI^+]$ sont prototrophes pour l'adénine et les colonies sont blanches.

3.2.2.2 La régulation du catabolisme azoté par Ure2p et le phénotype $[URE3]$

Ure2p est un régulateur du métabolisme azoté chez la levure *S. cerevisiae* (Coschigano and Magasanik, 1991). Lorsque les sources d'azote optimales comme l'ammonium ou la glutamine sont disponibles, Ure2p agit comme un co-répresseur transcriptionnel qui inhibe notamment les activateurs transcriptionnels Gln3p et Gat1p. Gln3p et Gat1p sont requis pour

l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme azoté (Figure 18) (Courchesne and Magasanik, 1988; Cunningham et al., 2000). Ure2p qui est localisée dans le cytosol se fixe aux formes phosphorylées de Gln3p et Gat1p, et les empêche de pénétrer dans le noyau (Cardenas et al., 1999; Cox et al., 2000; Cunningham et al., 2000). Les cellules où Ure2p n'est pas fonctionnelle ne répondent plus à la voie de répression du catabolite azoté (NCR, *Nitrogen Catabolite Repression*) et peuvent donc utiliser des sources d'azote pauvre même en présence de sources préférentielles (Coschigano and Magasanik, 1991; Courchesne and Magasanik, 1988).

Le premier système rapporteur ayant permis de mettre en évidence le prion [URE3] est basé sur des souches *ura2Δ* (voir détails dans la légende de la Figure 18). Cependant, cette souche ne permet ni de visualiser facilement la présence ou l'absence du prion [URE3], ni de faire la distinction entre différentes souches de ce prion (Schlumpberger et al., 2001).

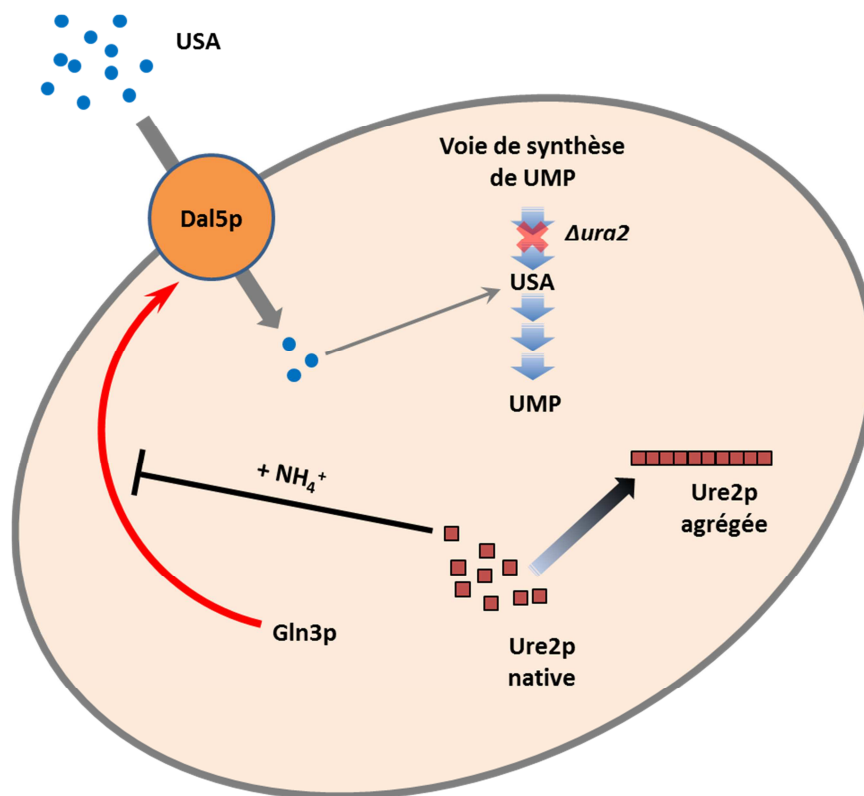


Figure 18 La croissance de cellules *ura2Δ* en présence d'uréidosuccinate dépend de l'activité de Ure2p. (Figure adaptée de la thèse de Jimmy Savistchenko, 2008)

La voie de biosynthèse de l'uracile est bloquée dans des cellules *ura2Δ* en raison de l'absence d'activité ATCase (aspartate carbamoyl transferase). La croissance de ce mutant nécessite la présence d'acide ureidosuccinique (USA) dans le milieu. Dal5p est une perméase membranaire capable d'importer l'USA dans la cellule. L'activation de Dal5p nécessite un activateur transcriptionnel Gln3p (flèche rouge). En présence d'une source d'azote riche dans le milieu de

culture, l'activité de Gln3p est réprimée par Ure2p, ce qui entraîne l'inhibition de l'expression de Dal5p (flèche d'inhibition en noir). Les souches *ura2Δ [ure-0]* (sans prion) ne peuvent donc pas pousser sur un milieu contenant de l'USA. Dans des cellules *[URE3]*, lorsque Ure2p est agrégée sous sa forme prion, Ure2p ne peut plus inhiber Gln3p et l'expression de Dal5p est donc possible, même en présence de sources d'azote répressives. Les cellules *ura2Δ [URE3]* peuvent importer et métaboliser l'USA présent dans le milieu de culture et s'y développer.

Pour faciliter les études sur le prion *[URE3]*, Schlumpberger et al., ont mis au point un nouveau système rapporteur analogue à celui utilisé pour *[PSI⁺]*, basé sur l'expression Ure2p-dépendante du gène *ADE2* (Schlumpberger et al., 2001) (voir détails dans la légende de la Figure 19). Les cellules *[ure-0]* sont auxotrophes pour l'adénine et forment des colonies de couleur rouge. Les cellules *[URE3]* sont prototrophes pour l'adénine et forment des colonies dont la couleur va du rose au blanc, en fonction de la proportion de protéines Ure2p agrégées dans différentes souches de prion *[URE3]* (voir 3.2.4).

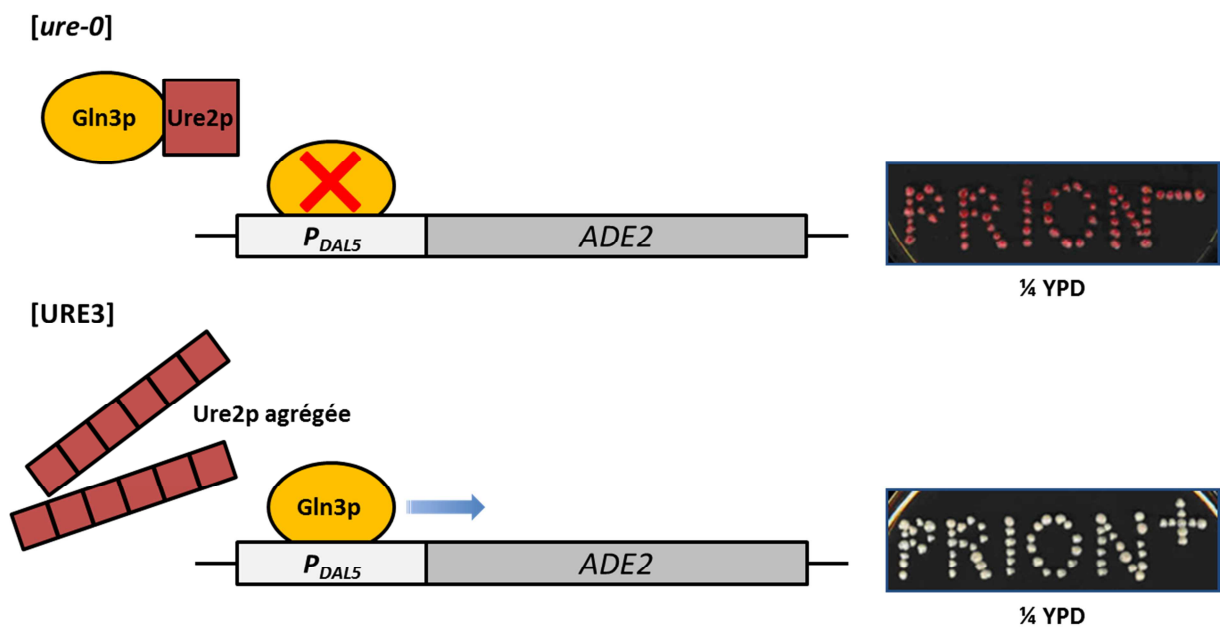


Figure 19 Système rapporteur permettant de visualiser la présence du prion *[URE3]* chez la levure *S. levure* (Figure adaptée de (Schlumpberger et al., 2001)). (Crédit photo : Gary W. Jones)

Le promoteur de *DAL5* (P_{DAL5}), contenant le site de fixation de Gln3p, est inséré en amont du gène *ADE2*. Dans les cellules *[ure-0]* (haut), Ure2p est active. En présence d'une source préférentielle d'azote, Ure2p inhibe Gln3p ce qui empêche l'induction du promoteur P_{DAL5} . Les cellules *[ure-0]* sont donc auxotrophes pour l'adénine et forment des colonies de couleur rouge. Dans les cellules *[URE3]* (bas), Ure2p est agrégée sous sa forme prion et Gln3p peut donc activer le promoteur P_{DAL5} et la transcription de *ADE2*. Les cellules *[URE3]* sont donc prototrophes pour l'adénine et forment des colonies de couleur blanche.

3.2.3 Etudes structurales des assemblages fibrillaires de Sup35p et de Ure2p

3.2.3.1 Prions et amyloïdes

Il a été proposé que les protéines prions forment des fibres de type amyloïde, des agrégats protéiques hautement ordonnés. Les fibres amyloïdes sont généralement ramifiées et constituées de brins β plissés perpendiculaires à l'axe des fibres. Les fibres amyloïdes montrent une biréfringence jaune-verte à la lumière polarisée lorsqu'elles sont liées au Rouge Congo. Des fluorophores tels que la thioflavine-T ou la primuline présentent des changements détectables de leurs spectres d'émission de fluorescence après fixation à des fibres amyloïdes. Ces fluorophores sont couramment utilisés au laboratoire comme marqueurs de la polymérisation en fibres des protéines prions. Cependant, ces colorants sont des rapporteurs imparfaits car ils ne sont pas nécessairement spécifiques à un seul type de structures fibrillaires (Bousset et al., 2003; Groenning et al., 2007). Les fibres amyloïdes peuvent être visualisées par microscopie électronique où elles se présentent comme de longs filaments non ramifiés avec des diamètres de 6-12 nm (Figure 20A) (Sunde and Blake, 1997). La structure interne caractéristique des fibres amyloïdes a été étudiée par diffraction au rayon X et montre 1), une réflexion méridienne à environ 4.7 Å correspondant aux liaisons hydrogène entre les brins β ; 2), une réflexion équatoriale à environ 6-11 Å correspondant à la distance entre des empilements de feuillets β (Figure 20, B et C) (Greenwald and Riek, 2010).

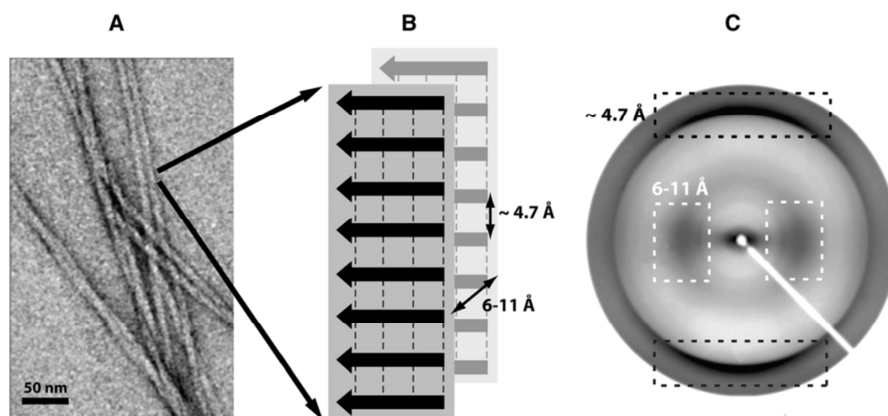


Figure 20 Structure de fibres amyloïdes (Greenwald and Riek, 2010)

(A) Fibres amyloïdes visualisées par microscopie électronique en coloration négative.

(B) Représentation schématique des feuillets- β croisés au sein des fibres amyloïdes. Les liaisons hydrogène sont représentées par des pointillés

(C) Un cliché typique de diffraction aux rayons X avec une réflexion méridienne à 4.7 Å (boîtes noires en pointillés) et une réflexion équatoriale à 6-11 Å (boîtes blanches en pointillés).

Bien que les amyloïdes soient constitués de brins β plissés, plusieurs arrangements structuraux des brins β au sein de fibres amyloïdes ont été proposés à ce jour et sont résumés dans la Figure 21 (Shewmaker et al., 2011). Les brins β peuvent être agencés de façon parallèles ou antiparallèles et former des feuillets super-plissés le long de l'axe de la fibre. A noter que les polypeptides qui peuvent former de telles structures peuvent avoir une structure très différente dans leur forme monomérique, voire être complètement désordonnés. La structuration en brins β se fait de façon concomitante à l'assemblage en fibres. L'organisation en brins β plissés parallèles (Figure 21, A et E) est l'architecture classique des amyloïdes pathologiques comme la β_2 -microglobuline, $A\beta_{1-40}$ et $A\beta_{1-42}$, ainsi que celle des prions de levure Rnq1p et Sup35p (Shewmaker et al., 2009). Des petits peptides tels que les fragments de $A\beta$ ($A\beta_{16-22}$, $A\beta_{11-25}$ et $A\beta_{34-42}$) forment des fibres amyloïdes constitués de brins β antiparallèles (Figure 21B). Une étude récente en RMN du solide a montré que la mutation Osaka de $A\beta_{1-40}$ $E22\Delta$ entraînait la formation d'amyloïdes composés de brins β antiparallèles (Schütz et al., 2015). Les hélices β (Figure 21C) sont composées d'enroulement des brins β autour de l'axe de filament avec des liaisons hydrogènes intramoléculaires qui stabilisent la structure. Le prion [Het-s] chez le champignon filamenteux *Podospora anserina* possède une telle structure. D'autres organisations structurales ont été proposées (Figure 21D), avec par exemple un empilement de protéines dans une conformation quasi-native dans la forme fibrillaire de Ure2p (voir ci-dessous). Cette diversité structurale est sans doute à l'origine de l'existence de différentes souches de prions (voir 3.2.4).

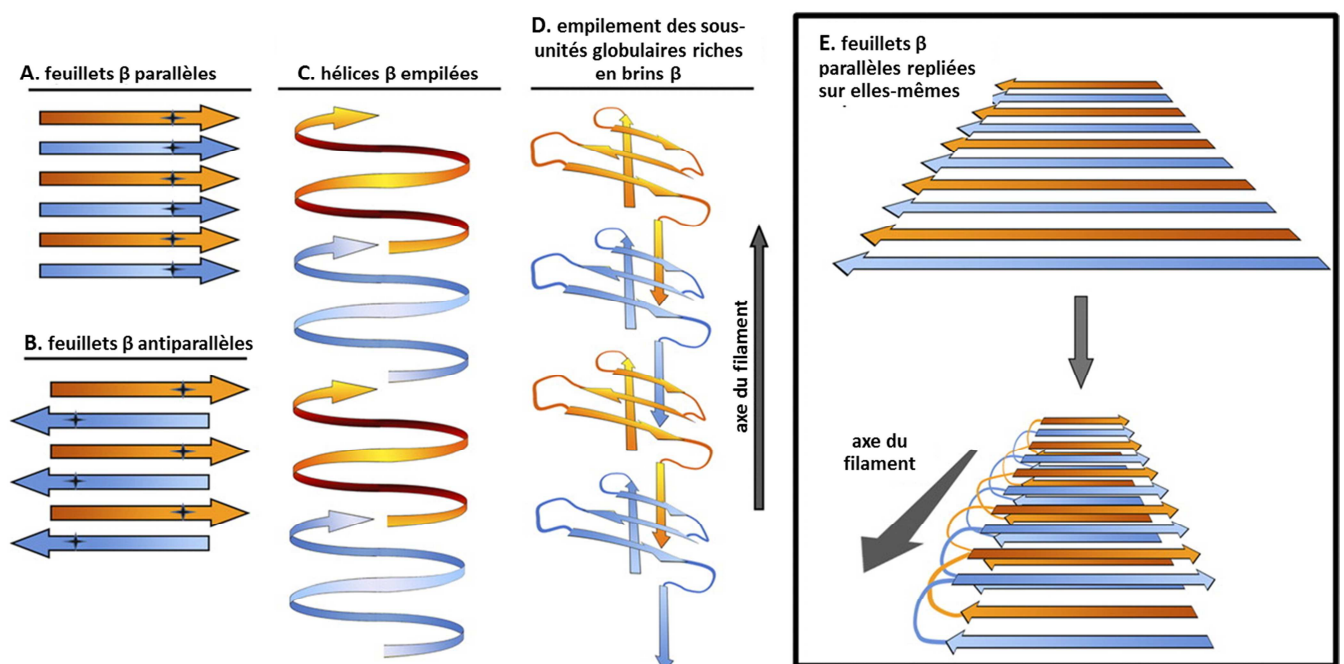


Figure 21 Les différents arrangements structuraux proposés pour les filaments amyloïdes. (adaptée de la figure 1 de Shewmaker et al., 2011)

Les brins β peuvent être agencés de façon (A) parallèles ou (B) antiparallèles et empilés le long de l'axe du filament avec une interdistance de 4.7 Å. (C) Les hélices β empilées sont formées par l'enroulement d'un polypeptide le long de l'axe de la fibre et par la formation de brins β parallèles intramoléculaires. (D) Certaines protéines peuvent s'assembler linéairement en structure filamenteuse par d'autres mécanismes, par exemple par l'échange et l'empilement de domaines riches en feuillets β . (E) Les feuillets β parallèles peuvent se replier sous la forme de feuillets dans l'axe de la fibre. Par ailleurs, des interactions des chaînes latérales peuvent favoriser la stabilité de ces feuillets β .

3.2.3.2 Etudes structurales des fibres de Sup35p

Le domaine prion N-terminal de Sup35p joue un rôle crucial dans la formation et la propagation du prion [PSI^+] (DePace et al., 1998). La protéine entière (Sup35p), les domaines N et M (Sup35NM) ou encore le domaine N seul (Sup35N) sont capables de s'assembler spontanément en fibres amyloïdes *in vitro* (Figure 22) (Glover et al., 1997; King and Diaz-Avalos, 2004; Krzewska and Melki, 2006; Krzewska et al., 2007; Shewmaker et al., 2009; Tanaka et al., 2004). Les fibres formées par Sup35p entière, Sup35NM et Sup35N sont infectieuses dans le sens où elles sont capables d'induire efficacement l'apparition du prion [PSI^+] lorsqu'elles sont introduites dans des cellules [psi^-] (King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004). Il a été cependant montré par RMN du solide que les fibres formées par Sup35p et Sup35NM présentent des différences significatives (Figure 22), malgré le fait que les deux assemblages reposent sur un cœur amyloïde en brins β constitué des 30 premiers acides aminés (Luckgei et al., 2013, 2014; Schütz et al., 2014). De plus, Sup35p et Sup35NM présentent des différences notables dans leurs vitesses de polymérisation et dans leurs propriétés infectieuses (Krzewska et al., 2007). Malgré son utilité comme modèle d'étude, Sup35NM n'est donc pas complètement représentatif de [PSI^+] (Kabani and Melki, 2011).

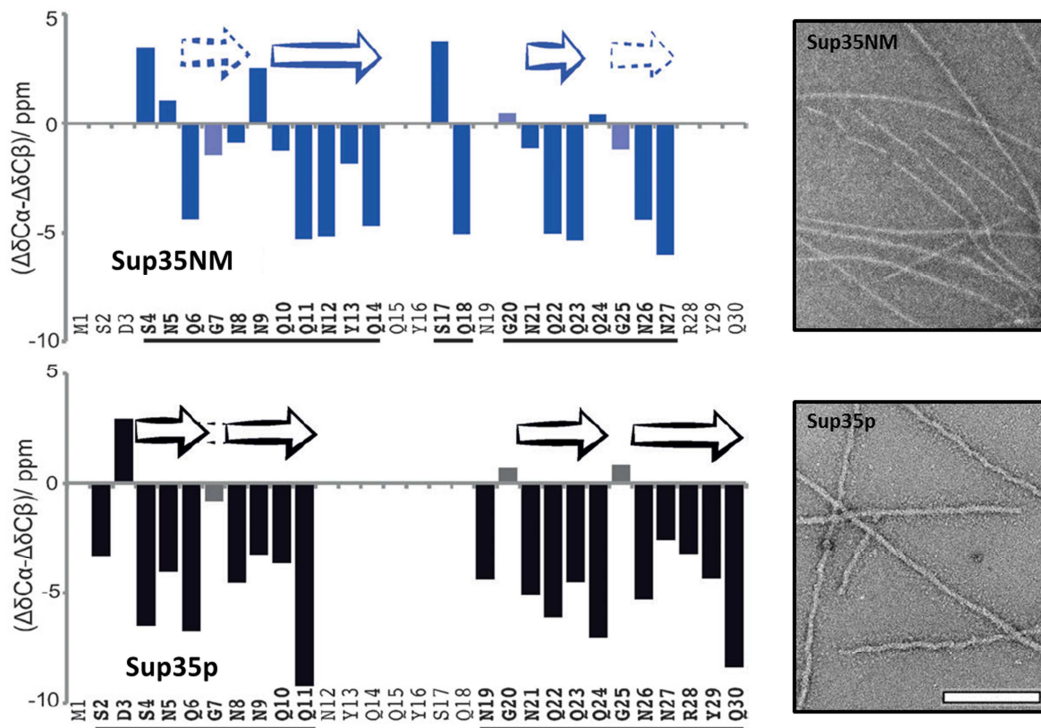


Figure 22 Comparaison de la structure secondaire du cœur amyloïde des fibres de Sup35NM (haut) et de Sup35p entière (bas) étudiée par RMN du solide (Luckgei et al., 2013). Les brins β sont représentés par des flèches. Les flèches en pointillés représentent des extensions possibles des brins- β comprenant des résidus glycine. Les images en microscopie électronique des fibres correspondantes sont montrées à droite (Barre d'échelle = 0.2 μ m).

Le domaine M de Sup35p est flexible dans la protéine native et au sein des fibres (Baxa et al., 2011; Luckgei et al., 2014; Schütz et al., 2014). Ce domaine n'est pas requis pour l'agrégation de Sup35p ni pour la formation de $[PSI^+]$. Il jouerait un rôle dans la solubilité de Sup35p et serait requis pour la stabilité de $[PSI^+]$ au cours de la division cellulaire (Liu et al., 2002). Le domaine M serait également le site de fixation de certains chaperons moléculaires (e.g. Hsp104) qui jouent un rôle important dans la propagation de $[PSI^+]$ (voir 3.4.1) (Helsen and Glover, 2012).

Une perte complète de la fonction du domaine C de Sup35p est létale pour les levures. Les levures peuvent cependant tolérer une réduction significative du niveau d'expression de Sup35p (Valouev et al., 2002). De plus, il a été montré que la protéine Sup35p agrégée sous sa forme prion pourrait conserver au moins une partie de ses fonctions biologiques (Krzewska et al., 2007; Pezza et al., 2014). Ainsi, ces données suggèrent que le domaine C conserve sa structure native au sein des fibres. Une étude en cryo-microscopie électronique de fibres de Sup35p générées *in vitro* a en effet suggéré que les domaines C « flottent » librement autour

du cœur amyloïde des fibres avec lequel elles seraient reliées via tout ou une partie du domaine M dans une conformation flexible et étendue (Baxa et al., 2011). Néanmoins, une étude menée au laboratoire sur des mutants du domaine C-terminal de Sup35p a montré que ce domaine avait une influence significative sur l'assemblage de la protéine en fibres et pouvait contribuer à la propagation du prion [*PSI*⁺] (Kabani et al., 2011).

3.2.3.3 Etudes structurales des fibres de Ure2p

La nature amyloïde ou non-amyloïde des fibres formées par Ure2p est sujette à controverse. Au laboratoire, la caractérisation structurale de Ure2p a été réalisée sur une protéine purifiée et assemblée en fibres dans des conditions de pH et de sels physiologiques. Thual et al., ont observé des profils de dégradation protéolytique comparables pour Ure2p soluble et fibrillaire. Ils ont proposé pour la première fois que seuls de petits changements conformationnels accompagnent la polymérisation de Ure2p en fibres (Thual et al., 1999). Depuis, de nombreuses études biochimiques et biophysiques et structurales ont montré que le domaine globulaire C-terminal de Ure2p fait partie intégrante de l'architecture des fibres, et qu'il conserve une structure native au sein des fibres (Bousset et al., 2001b, 2002, 2003, 2004, 2010; Fay et al., 2005; Habenstein et al., 2012; Loquet et al., 2009; Redeker et al., 2007).

Les fibres de Ure2p présentent des caractéristiques typiquement associées aux amyloïdes: elles ressemblent morphologiquement à des fibres amyloïdes en microscopie électronique; elles sont résistantes à la protéolyse ; elles se lient à la thioflavine-T ; elles montrent une biréfringence jaune-verte en lumière polarisée après liaison du Rouge Congo (Bousset et al., 2001b; Taylor et al., 1999; Thual et al., 1999, 2001). Cependant, ces propriétés ne sont pas spécifiques aux fibres amyloïdes (Bousset et al., 2004). Une étude des échanges hydrogène/deutérium en spectrométrie de masse visant à comparer l'accessibilité au solvant entre la forme soluble et fibrillaire de Ure2p n'a pas permis de trouver des changements structuraux majeurs (Redeker et al., 2007). Le contenu en structures de type brin β des fibres de Ure2p (~20%) est comparable à celui de la protéine soluble (~17%). De plus, des études en spectroscopie infra-rouge (FTIR), par diffraction aux rayons X et par RMN du solide des fibres de Ure2p ont montré l'absence des signatures typiques des amyloïdes (e.g. épaulement du spectre infrarouge à 1623-1618 cm^{-1} ; une réflexion à 4.7 Å) (Bousset et al., 2002, 2003; Habenstein et al., 2012; Loquet et al., 2009). Un modèle « quasi-natif » de l'organisation

structurale des fibres de Ure2p a ainsi été proposé au laboratoire (Figure 23B) (Loquet et al., 2009).

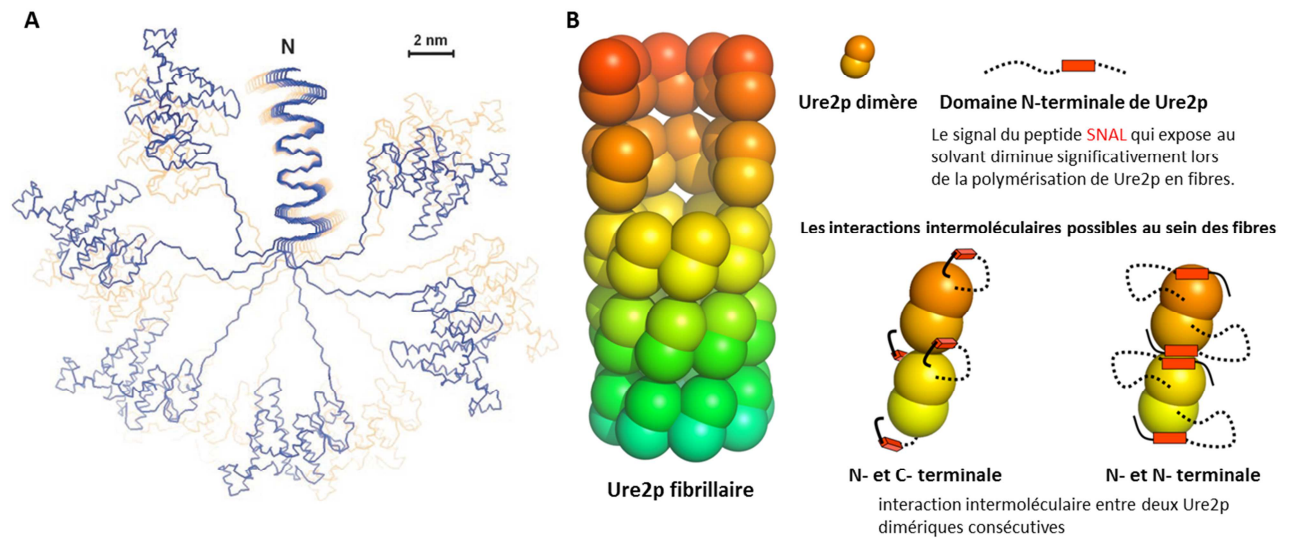


Figure 23 Modèles de l'organisation structurale proposés pour les fibres de Ure2p (Kajava et al., 2004; Loquet et al., 2009)

A) modèle « feuillets β parallèles ». Le modèle montre une vue axiale le long du filament avec 12 β -serpentes empilées (6 en bleues et 6 en jaunes) qui forment un cœur amyloïde. Les domaines C de Ure2p qui gardent leurs conformations natives entourent le cœur amyloïde.

B) modèle « quasi-natif ». Les dimères de Ure2p à l'état quasi-natif au sein des fibres sont représentés par une double sphère. Le domaine N-terminal est représenté par un fil courbé en pointillé. Les résidus SNAL dont l'accessibilité au solvant change de façon significative dans les fibres sont représentés en ruban rouge. Différentes interactions intermoléculaires entre deux dimères de Ure2p consécutifs peuvent être établies et sont représentées.

Kajava et al. ont proposé un modèle très différent en « feuillets β parallèles » (Figure 21A, Figure 23A) dans lequel le PrD de Ure2p forme un cœur amyloïde (Kajava et al., 2004). Il est cependant important de noter que le modèle « feuillets- β parallèles » est principalement basé sur l'étude du domaine PrD seul et non pas sur la protéine entière. Le domaine PrD isolé peut s'agréger de façon différente par rapport à la protéine entière, comme c'est le cas pour Sup35p (Figure 22). En effet, il a été montré au laboratoire que les fibres formées par le domaine PrD de Ure2p sont effectivement amyloïdes et montrent une réflexion à 4.7 Å en diffraction aux rayons X (Bousset et al., 2010). Cependant les fibres formées par le PrD ne sont pas infectieuses, contrairement à celles formées par la protéine Ure2p entière, et ne sont donc pas représentatives du prion [URE3] (Habenstein et al., 2012).

3.2.4 Les souches de prions [*PSI*⁺] et [*URE3*]

Une même protéine prion, la PrP, peut causer des pathologies aux caractéristiques distinctes chez l'Homme ou chez les animaux (e.g. scrapie du mouton, encéphalopathie spongiforme bovine, maladie de Creutzfeldt Jacob). Dickinson et ses collègues ont isolé différents agents pathogènes impliqués dans la scrapie du mouton et montré que les caractéristiques de chacun de ces agents (e.g. sévérité de la maladie, durée de vie de l'animal) sont conservées après leur transmission en série (Dickinson and Meikle, 1969; Fraser and Dickinson, 1973). Par la suite, on qualifiera ces différentes formes de «**souches de prion**». Dans les années 90s, il a été montré que ces souches différaient par le niveau glycosylation de la PrP (Otvos and Cudic, 2002).

De nombreuses études ont depuis suggéré que les souches de prion proviennent d'une variabilité structurale, c'est-à-dire la capacité d'une même protéine prion à adopter plusieurs conformations différentes (Bousset et al., 2013; Colby and Prusiner, 2011; Colby et al., 2009; Collinge et al., 1996; Peelaerts et al., 2015). On retrouve ce phénomène de souches dans les protéines de type prion impliquées dans les maladies neurodégénératives. Ainsi, au laboratoire, il a été montré que l' α -synucléine est capable de former des assemblages fibrillaires structurellement différents ('fibres' et 'rubans') qui sont capables d'induire un phénotype de type 'maladie de Parkinson' ou de type 'atrophie multi-systématisée' lorsqu'ils sont injectés dans des animaux modèles (Bousset et al., 2013; Peelaerts et al., 2015).

Les prions de levure forment également différentes souches caractérisées par des structures et des conséquences phénotypiques distinctes (Frederick et al., 2014). Ainsi, la protéine prion Sup35NM recombinante est capable de former deux différents types de fibres après polymérisation à 4°C ou 37°C. Ces deux types de fibres peuvent induire deux souches de [*PSI*⁺] phénotypiquement distinctes, appelées respectivement fort (*strong*) ou faible (*weak*), lorsqu'elles sont réintroduites dans des cellules [*psi*⁻] par transformation (Diaz-Avalos et al., 2005; King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004). Ces phénotypes fort ou faible correspondent à différents taux de suppression non-sens au niveau de l'allèle *ade1-14* (voir 3.2.2.1), ce qui conduit à la formation de colonies roses (faible) ou blanches (fort) (Figure 24A). Au niveau cellulaire, ces deux souches se manifestent d'une part par des ratios Sup35p soluble/Sup35p agrégée différents (Figure 24B), et d'autre part par une différence de taille des particules de prion résistantes aux détergents (Figure 24C). Les fibres de Sup35NM formées à

4°C et 37°C présentent des différences notables en terme de cinétique d'assemblage, de stabilité thermodynamique, d'agencement du cœur amyloïde et d'interaction avec les chaperons moléculaires (Tanaka et al., 2004; Tessier and Lindquist, 2007; Toyama et al., 2007)

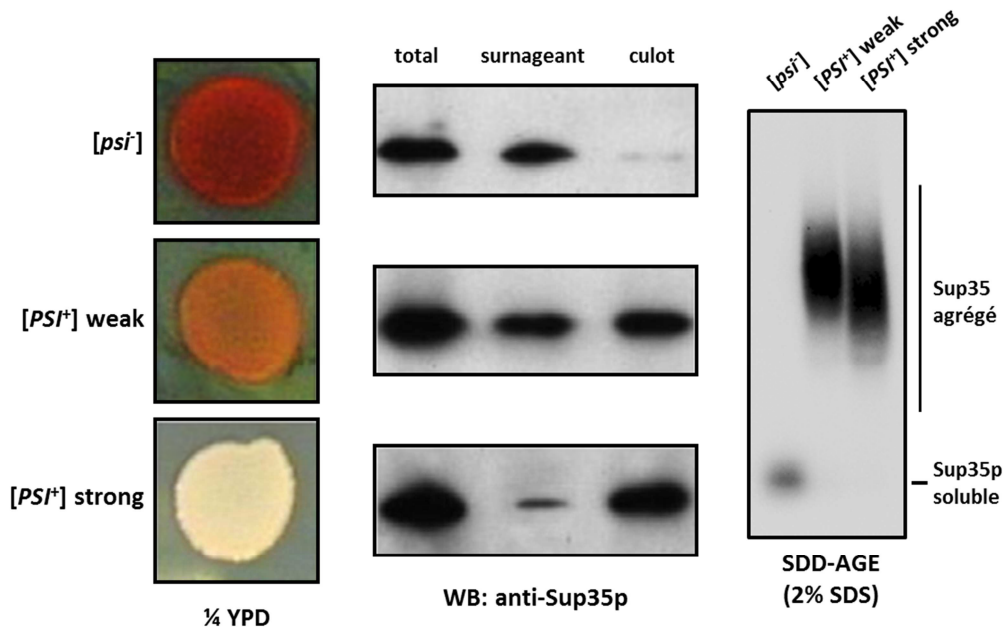


Figure 24 Les souches du prion $[PSI^+]$

Les souches que nous utilisons au laboratoire nous permettent de distinguer les différentes souches du prion $[PSI^+]$ au niveau phénotypique. La souche sans prion $[psi^-]$, les souches $[PSI^+]$ *weak* et *strong* présentent respectivement des couleurs rouge, rose et blanche sur un milieu appauvri en adénine (gauche), en fonction du taux de séquestration de la protéine soluble par les particules prions. Par conséquent, les protéines sont solubles dans la souche $[psi^-]$ et majoritairement agrégées dans la souche $[PSI^+]$ *strong*. La souche $[PSI^+]$ *weak* présente un phénotype intermédiaire (milieu). En outre, une analyse sur gel d'agarose en condition semi-dénaturante (SDD-AGE) montre que les particules de prions résistantes au SDS sont plus grandes dans la souche $[PSI^+]$ *weak* que $[PSI^+]$ *strong* (droite).

Ure2p est également capable de former des souches différentes qui vont se manifester par des colorations des colonies $[URE3]$ allant du rose au blanc dans des souches ayant le système rapporteur P_{DAL5} -ADE2 (voir 3.2.2.2) (Brachmann et al., 2005). La caractérisation structurale de ces variants n'a pas encore été faite. Néanmoins, les différences obtenues entre différents laboratoires concernant la nature amyloïde ou non-amyloïde des fibres de Ure2p (voir 3.2.3.3) reflète sans doute cette diversité structurale.

3.3 La réplication et la propagation des protéines prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1 Modèles de réplication des protéines prions

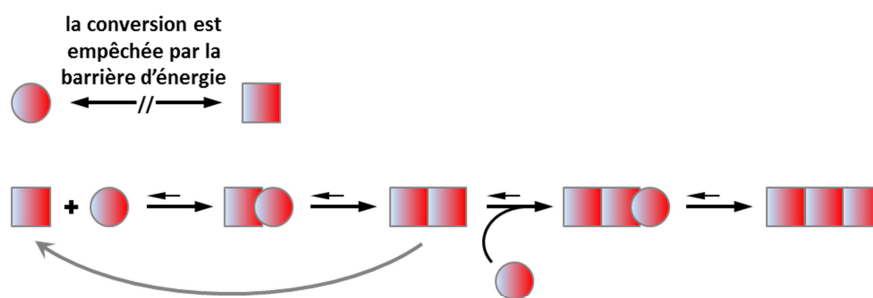
Deux modèles de travail ont été proposés pour expliquer la réplication des protéines prions (Figure 25) (Aguzzi and Calella, 2009; Bousset and Melki, 2005; Brundin et al., 2010). Les deux modèles font appel à un changement de conformation qui peut être un événement de repliement alternatif du polypeptide ayant des propriétés de prion. En effet, une protéine peut exister sous différentes formes dans la cellule : la forme native fonctionnelle (majoritaire) et des formes non natives (minoritaires) parmi lesquelles la forme prion est celle qui a la capacité de polymériser en fibres ordonnées. Cet événement est rare, sinon toutes les protéines prions s'agrègeraient rapidement. De plus, certaines mutations peuvent déstabiliser la structure native des polypeptides et favoriser la conversion vers des formes non natives et augmenter la probabilité d'apparition des prions (Chien et al., 2003; Kabani et al., 2011; Tanaka et al., 2004).

Dans le premier modèle, dit de « conversion assistée » (Figure 25A), l'apparition de la forme prion est normalement réprimée par une barrière énergétique élevée. La conversion de la forme native en forme prion nécessite l'interaction directe des deux formes de la protéine. L'apparition spontanée de la forme prion ou l'introduction de formes prions exogènes conduit à l'agrégation des protéines prions. Dans ce modèle, ce sont les molécules sous forme native qui sont recrutées. Dans le second modèle, dit de « nucléation-polymérisation » (Figure 25B), la forme native est en équilibre avec la forme prion. L'interaction des formes prions les unes avec les autres entraîne leur stabilisation et déplace ainsi l'équilibre vers la forme prion. Ce sont les molécules ayant la même conformation prion qui sont recrutées.

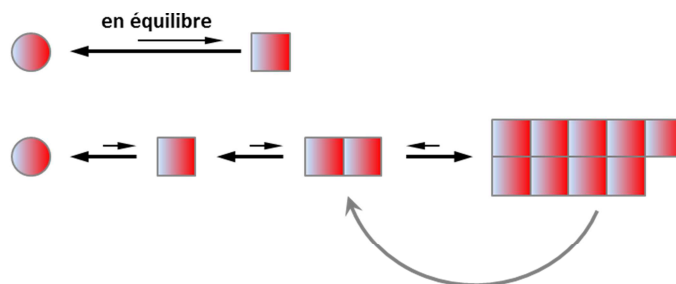
Dans ces deux modèles, les polymères peuvent être fragmentés dans certaines conditions, *in vitro* par des forces mécaniques (e.g. sonication), *in vivo* par des chaperons moléculaires (e.g. Hsp104 (Wegrzyn et al., 2001)). La fragmentation des agrégats prions augmente le nombre de noyaux disponibles pour le recrutement de monomères et conduit donc à leur réplication de façon efficace (Figure 25, A et B, flèches grises).

L'étude de la polymérisation des protéines prions *in vitro* (Figure 25C) favorise plutôt le second modèle dans lequel l'équilibre se déplace vers la formation du prion lorsque des oligomères stables de prion se sont formés (Glover et al., 1997; Scherzinger et al., 1999; Vanik et al., 2004). Cependant, un argument fort en faveur du modèle de conversion assistée est le fait que les prions obtenus *in vitro* par polymérisation en présence de noyaux préformés ou *in vivo* par transformation de fibres ont la même identité structurale que le matériel ayant servi à les induire (e.g. variant fort or faible) (King and Diaz-Avalos, 2004; Tanaka et al., 2004).

A Modèle de conversion assistée



B Modèle de nucléation-polymérisation



C Cinétique de polymérisation des protéines prions

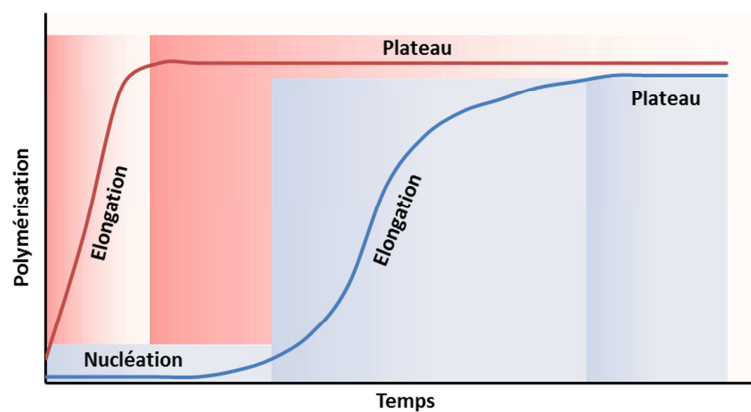


Figure 25 Modèles de réplcation des protéines prions. (Aguzzi and Calella, 2009; Bousset and Melki, 2005; Brundin et al., 2010)

(A) Le modèle de conversion assistée postule une interaction entre la forme prion (représentée par des carrés), qui peut être d'origine exogène, et la forme native (représentée par des ronds). La forme prion convertit la forme native en forme prion et la recrute au sein de complexes macromoléculaires. Le polymère non natif peut continuer à croître par addition et conversion des formes natives des protéines prions. La conversion spontanée de la forme native en forme prion est empêchée par une barrière d'énergie élevée.

(B) Dans le modèle de nucléation-polymérisation, la forme native est en équilibre avec la forme prion. Les protéines sous leurs formes prions peuvent interagir de façon transitoire les unes avec les autres de manière spontanée. Lorsqu'un noyau hautement ordonné et suffisamment stable est formé, d'autres monomères sous forme prion peuvent alors être très efficacement recrutés. L'équilibre entre les deux formes est alors modifié en faveur de la forme prion.

(C) L'agrégation des protéines prions peut être suivie expérimentalement grâce à des fluorophores. La formation d'oligomères stables est thermodynamiquement défavorable, ce qui se traduit par une phase de nucléation (courbe bleue). Les oligomères stables s'allongent en recrutant des substrats monomériques de manière exponentielle jusqu'au plateau où tous les monomères ont été recrutés. La cinétique de polymérisation est représentée par une courbe sigmoïdale (courbe bleue). La phase de nucléation peut être abolie par l'addition de prions dans la réaction de polymérisation (courbe rouge).

3.3.2 Modèle de propagation des prions de levure

La réplication des protéines prions se produit dans le cytoplasme. Deux voies de propagation des protéines prions sont connues à ce jour. Les particules infectieuses de prion (également appelées 'propagons') peuvent être transmises verticalement de la cellule mère à la cellule fille lors de la division cellulaire (Figure 26) ou par mélange de cytoplasmes lors d'un croisement sexuel (Aigle and Lacroute, 1975; Cox, 1965). Les rôles que jouent les chaperons moléculaires et le système ubiquitine-protéasome dans la propagation des prions de levure seront discutés dans la partie suivante.

La découverte au laboratoire que Sup35p sous sa forme prion infectieuse est sécrété dans le milieu extérieur à l'intérieur de vésicules extracellulaires (Figure 26) a conduit à proposer un nouveau mode de propagation verticale des protéines prions chez la levure. Dans ce modèle, les propagons encapsulés dans ces vésicules seraient protégés de l'action des chaperons moléculaires, des systèmes protéolytiques et des mécanismes de ségrégation asymétriques des agrégats lors de la division cellulaire (Kabani and Melki, 2015, 2016). La possibilité d'un transfert horizontal des prions de levure par export puis import de vésicules chargées en prions a également été proposée. La transmission horizontale de cellule à cellule pourrait être possible dans certaines conditions physiologiques et/ou environnementales spécifiques

(restant à déterminer) permettant aux vésicules de traverser la paroi cellulaire des levures et d'être internalisées dans le cytoplasme (Kabani and Melki, 2015, 2016).

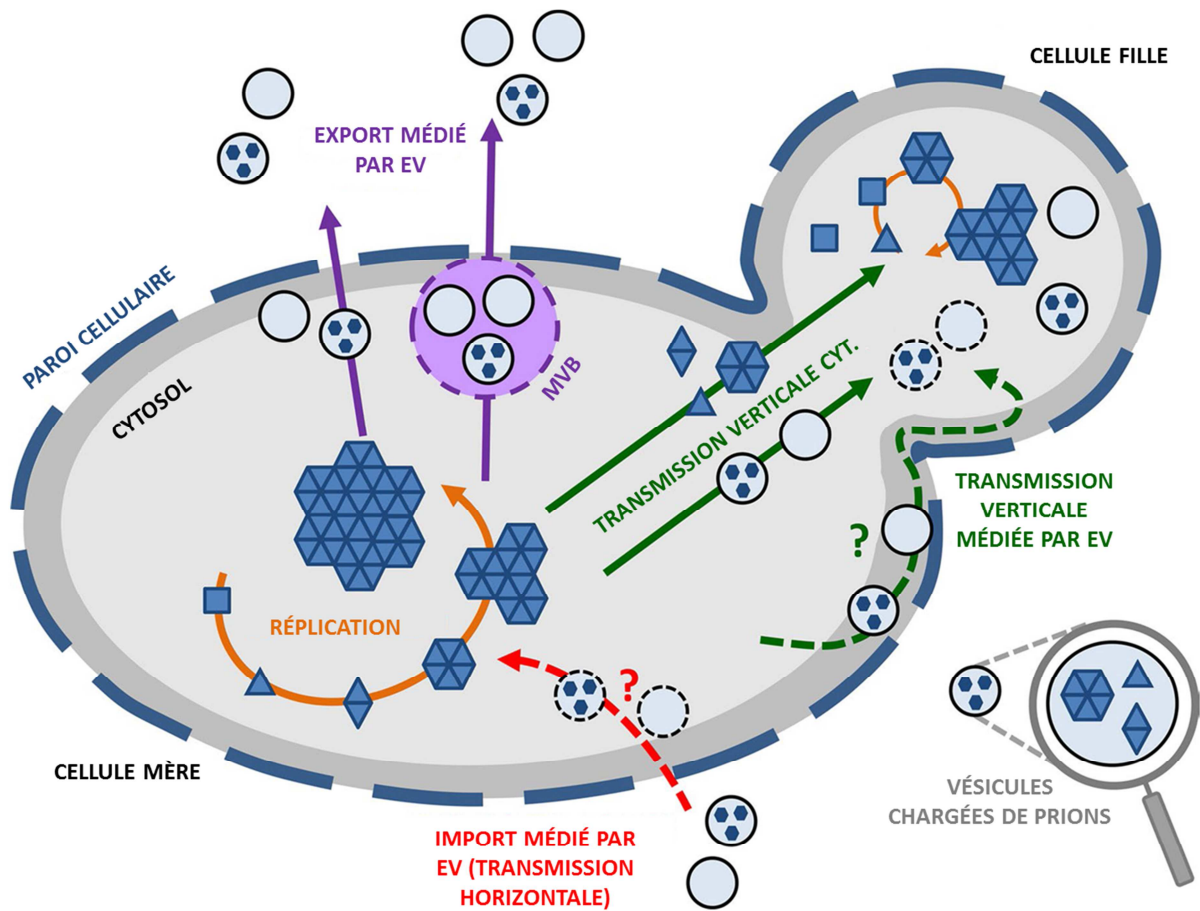


Figure 26 Modèle de propagation des protéines prions chez la levure. (Kabani and Melki, 2015, 2016)

La réplification des protéines prions est représentée par une flèche orange pleine. La conversion des protéines prions de leur forme native (carrés) vers leur forme prion (triangles) ainsi que la formation d'agrégats de taille diverse ont lieu dans le cytoplasme. Les propagons peuvent être transmis verticalement de la cellule mère à la cellule fille lors de la division cellulaire (flèche verte pleine).

Les protéines prions peuvent être adressées dans des vésicules et exportées dans le milieu extracellulaire (flèche violette pleine). L'export des protéines prions pourrait se faire via la voie MVB (*multi-vesicular bodies*). La transmission horizontale des protéines prions pourrait être possible si les vésicules chargées de prions pouvaient traverser la paroi cellulaire et être importées dans la cellule dans des conditions spécifiques (flèche rouge pointillée). La transmission verticale des protéines prions de la cellule mère à la cellule fille pourrait être également médiée par des vésicules intracellulaires (flèche verte solide) ou extracellulaire lors de l'établissement du bourgeon (flèche verte pointillée) pendant la division cellulaire.

Au laboratoire, la transmission des prions est réalisée souvent par introduction de matériel infectieux exogène dans des levures [*prion*] dont les parois cellulaires ont été détruites par

l'action d'enzymes telle que la lyticase (Figure 27A) (King and Diaz-Avalos, 2004; King et al., 2006; Tanaka, 2010; Tanaka et al., 2004). La sélection pour un marqueur d'auxotrophie permet la sélection de levures ayant internalisé du matériel exogène. Cette technique permet de démontrer la nature *protein-only* des prions et d'estimer la nature infectieuse (quantitativement par la fréquence d'induction et qualitativement par les phénotypes prions induits) d'objets obtenus et caractérisés *in vitro* sur les plans biochimique et structural (e.g. oligomères, fibres amyloïdes ou non-amyloïdes, intactes ou traitées par des chaperons moléculaires, protéases, etc.) (Kabani and Melki, 2011).

Le transfert cytoplasmique de prions peut également se faire par cytoduction (Figure 27B) (Zakharov and Yarovoy, 1977). Seule la fusion cytoplasmique, et non pas la fusion nucléaire, est requise entre la cellule donneuse et la cellule réceptrice pour la transmission du prion (King et al., 2006). La cytoduction repose sur *kar1*, un mutant de caryogamie, qui empêche la fusion des noyaux qui a normalement lieu après croisement de deux cellules de signes sexuels opposés. Ainsi, après croisement, le contenu cytoplasmique des deux cellules parentales est mélangé mais le diploïde obtenu est instable et abouti à la formation de cellules haploïdes lors des divisions suivantes (Wickner et al., 2006; Zakharov and Yarovoy, 1977). Cette technique permet de démontrer la nature cytoplasmique et infectieuse d'une protéine prion car aucun matériel génétique nucléaire n'est échangé entre les cellules donneuses et receveuses. Elle permet également d'étudier l'effet de mutations particulières présentes dans la cellule receveuse sur la propagation du prion (Wickner et al., 2006; Zakharov and Yarovoy, 1977).

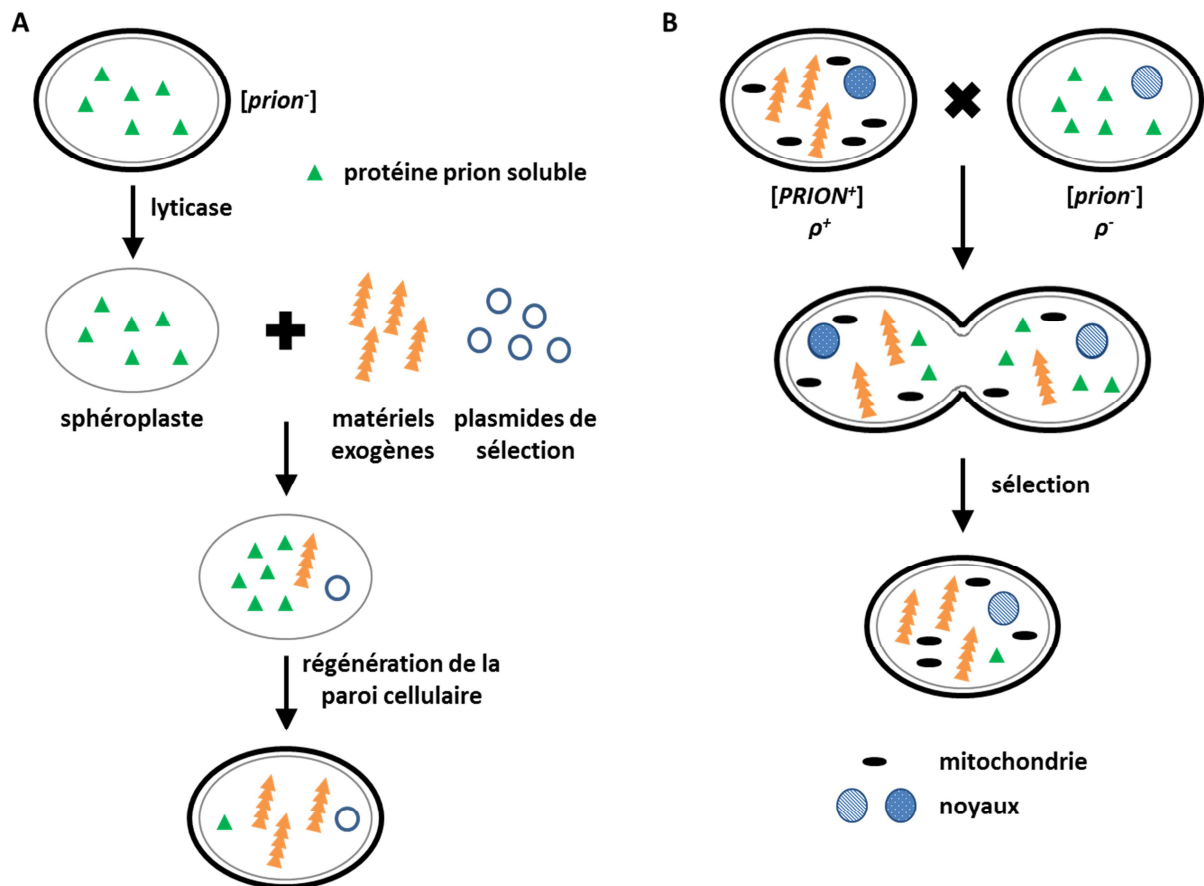


Figure 27 Présentation schématique de la transformation de sphéroplastes par introduction de matériel infectieux exogène (A) et de la cytoduction (B). (Halfmann et al., 2012a; King et al., 2006; Tanaka, 2010; Zakharov and Yarovoy, 1977)

3.4 Les chaperons moléculaires et le système ubiquitine-protéasome dans la formation et la propagation des prions

La formation, la propagation et l'élimination des prions de levure sont contrôlées par de nombreux facteurs cellulaires (e.g. chaperons moléculaires, systèmes protéolytiques, cytosquelette) et soumise à l'influence de facteurs environnementaux (e.g. nutriments, stress, température). Dans cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux chaperons moléculaires et au système ubiquitine-protéasome (UPS), dont les effets sur les prions de levure sont présentés ci-après.

3.4.1 Chaperons moléculaires et propagation des prions de levure

3.4.1.1 Chaperons moléculaires et formation *de novo* des prions de levure

La formation *de novo* des prions de levures est intimement liée au niveau d'expression et à l'activité des principaux composants du CQP, tels que les chaperons moléculaires Hsp70 ou Hsp104. Elle dépend également des conditions environnementales qui vont venir perturber la protéostase. L'apparition spontanée des prions est ainsi fortement induite par des stress protéotoxiques tel qu'un choc thermique, un stress oxydant ou de fortes concentrations en sels (Tyedmers et al., 2008).

La formation *de novo* des prions demeure cependant un évènement extrêmement rare car le repliement correct des protéines en général est strictement contrôlé par les composants du CQP. L'apparition spontanée des prions est en partie le résultat d'un échec du CQP où les protéines prions mal-repliées échappent au contrôle de leur repliement par les chaperons moléculaires et à leur dégradation par les machineries protéolytiques.

Diverses études ont montré que la surexpression de Ssa1p et la délétion de Ssb1p et Ssb2p augmentent la formation *de novo* du prion [*PSI*⁺] (Chernoff et al., 1999; Newnam et al., 1999). L'altération de l'activité des facteurs HSF (*heat-shock transcription factor*) qui régulent les niveaux d'expression des HSPs influence fortement la formation spontanée du prion et modifie le spectre des souches [*PSI*⁺] induites (Park, 2006). L'augmentation du niveau d'expression de Hsp104 induit la formation *de novo* du prion [*URE3*] (Kryndushkin et al., 2011). L'altération des niveaux d'expression de Ydj1p (Kryndushkin et al., 2011) ou de Sse1p (orthologue de Hsp110 chez la levure) (Fan et al., 2007) perturbe aussi l'apparition spontanée de [*PSI*⁺] et [*URE3*].

Il faut noter que, dans certains cas, la formation *de novo* des prions dépend aussi de la présence d'un autre prion. L'exemple le mieux étudié et le plus spectaculaire est [*PSI*⁺], dont l'induction *de novo* est strictement dépendante de la présence du prion [*PIN*⁺] (voir 3.5) ou d'autres agrégats protéiques riches en Q/N (Derkatch and Liebman, 2007; Derkatch et al., 1997, 2001).

3.4.1.2 Chaperons moléculaires et propagation des prions de levure

Les chaperons moléculaires protègent les cellules contre l'agrégation protéique induite par divers stress. Ils reconnaissent aussi les agrégats amyloïdes et jouent un rôle important dans la propagation des prions chez la levure. Des perturbations dans le fonctionnement des chaperons moléculaires peuvent conduire à l'augmentation du taux d'apparition ou d'élimination des prions (ou les deux) (Chernova et al., 2014; Liebman and Chernoff, 2012). Les effets des chaperons moléculaires principaux sur la propagation des prions [*PSI*⁺] et [*URE3*] sont résumés dans le Tableau 2.

Tableau 2 Effets des chaperons moléculaires sur la propagation des prions [*PSI*⁺] et [*URE3*]

Chaperons moléculaires		Effet sur les prions	
Famille	Protéine	Surexpression	Délétion ou inactivation
Hsp100	Hsp104	cure [<i>PSI</i> ⁺]	cure [<i>PSI</i> ⁺] et [<i>URE3</i>]
Hsp70	Ssa(1-4)	déstabilise [<i>PSI</i> ⁺] antagonisme avec la surexpression de Hsp104 cure [<i>URE3</i>] (Ssa1)	déstabilise [<i>PSI</i> ⁺] cure [<i>URE3</i>] (Ssa2)
	Ssb(1,2)	déstabilisation [<i>PSI</i> ⁺] synergie avec la surexpression de Hsp104	antagonisme avec la surexpression de Hsp104
Hsp40	Sis1	synergie avec la surexpression de Hsp104	défavorise [<i>PSI</i> ⁺] cure [<i>URE3</i>]
	Ydj1	cure [<i>URE3</i>]	ne cure pas [<i>PSI</i> ⁺]

Hsp104 dans la propagation des prions de levure

Hsp104 est une *désagrégase* supposée capable de fragmenter les fibres amyloïdes, augmentant ainsi le nombre d'extrémités capables de recruter des monomères nouvellement synthétisés (Inoue et al., 2004; Kryndushkin et al., 2003; Shorter and Lindquist, 2004). Il a tout d'abord été montré que le prion [*PSI*⁺] requiert Hsp104 pour sa propagation *in vivo* (Chernoff et al., 1995). Mis à part [*ISP*⁺] (voir 3.5), la propagation de tous les prions de levure connus à ce jour dépend de Hsp104 (Chernova et al., 2014; Liebman and Chernoff, 2012). L'inhibition de l'activité ATPase de Hsp104 par l'ajout de concentrations milli-molaires de chlorure de guanidine (GdHCl) dans le milieu pendant la croissance cellulaire conduit à une

perte progressive des prions (Ferreira et al., 2001; Ness et al., 2002) (Tableau 2). La surexpression de Hsp104 élimine les prions [*PSI*⁺] (Chernoff et al., 1995) (Tableau 2) et [*MOD*⁺] (voir 3.5) (Suzuki et al., 2012), mais pas les autres prions de levure.

Hsp70 et Hsp40 dans la propagation des prions de levure

La surexpression de Ssa1p peut défavoriser la propagation du prion [*PSI*⁺] (Allen et al., 2005; Borchsenius et al., 2001, 2006) (Tableau 2), en présence ou non de [*PIN*⁺] (Mathur et al., 2009). Au niveau moléculaire, la surexpression de Ssa1p augmente à la fois la taille des polymères de Sup35p et aussi la proportion de Sup35p non-agrégé (Allen et al., 2005). Ssa1p interagit physiquement avec les agrégats de Sup35p *in vitro* (Krzewska and Melki, 2006) et *in vivo* (Bagriantsev et al., 2008). La surexpression de Ssb1p déstabilise les souches de [*PSI*⁺] *weak* (Chacinska et al., 2001; Kushnirov et al., 2000) (Tableau 2). Des mutations dans *SSA1* (Jung et al., 2000) ou la délétion de *SSA2* déstabilisent certaines souches de [*PSI*⁺] (Newnam et al., 2011) (Tableau 2).

Tous les chaperons moléculaires de la famille Ssa agissent sur [*PSI*⁺] dans le même sens lorsqu'ils sont surexprimés dans les cellules (Allen et al., 2005). Cependant, des effets différents ont été observés lorsque chacune des protéines Ssa est exprimée individuellement dans des cellules *ssa1-4Δ* (Sharma and Masison, 2008; Sharma et al., 2009). Les protéines de la famille Ssa diffèrent les unes des autres de par leurs effets sur d'autres prions de levure. Par exemple, [*URE3*] peut être curé par la surexpression de Ssa1p (mais pas par celle de Ssa2p) et par la mutation de Ssa2p (mais pas de Ssa1p) (Schwimmer and Masison, 2002; Tibor Roberts et al., 2004) (Tableau 2). Une différence d'acide aminé à la position 83 entre les deux protéines est supposée être responsable de ces différences (Sharma and Masison, 2011).

Les Hsp70 coopèrent avec leurs co-chaperons de la famille Hsp40, Ydj1 et Sis1, dans la propagation des prions de levure (Hines et al., 2011; Moriyama et al., 2000; Sharma and Masison, 2009). Une protéine Sis1p fonctionnelle est notamment requise pour la stabilité des prions [*PIN*⁺] (Sondheimer et al., 2001), [*PSI*⁺] et [*URE3*] (Higurashi et al., 2008).

Articulation de Hsp104 et Hsp70/Hsp40 dans la propagation des prions de levure

Données in vivo

La propagation des prions requiert l'articulation entre les chaperons Hsp104 et les familles Hsp70 (Ssa1-4p et Ssb1/2p) et Hsp40 (Ydj1p et Sis1p). Beaucoup d'études de la mutation ou de la surexpression d'un ou plusieurs chaperons sous certaines conditions de stress ont été effectuées pour illustrer l'effet des chaperons sur la formation et la propagation des prions

(Chernova et al., 2014; Liebman and Chernoff, 2012) (Tableau 2). Ssa1p et Ssb1p présentent des effets opposés sur la propagation de $[PSI^+]$. La surexpression de Ssa1p facilite la propagation du $[PSI^+]$ en présence d'un niveau élevé de Hsp104 (Allen et al., 2005; Newnam et al., 1999) (Tableau 2). En revanche, la surexpression de Ssb1p augmente l'efficacité de cure du prion $[PSI^+]$ par la surexpression de Hsp104, alors que la délétion de *SSB1/2* a l'effet inverse (Chernoff et al., 1999) (Tableau 2). Le domaine de fixation du substrat est responsable pour les différents effets de Hsp70 observés (Allen et al., 2005). La surexpression de Sis1p facilite la cure de $[PSI^+]$ par la surexpression de Hsp104 (Kirkland et al., 2011) (Tableau 2). La capture de Sup35p par 4BAP, une forme 'piège' de Hsp104 inactive, dépend de Sis1p (Tipton et al., 2008). Cela suggère que Sis1p permet le recrutement de Ssa1p et Hsp104 aux agrégats de prions. Cependant, des résultats contradictoires ont montré que le domaine de fixation du substrat de Sis1p est dispensable pour la propagation de $[PSI^+]$ (Kirkland et al., 2011).

Il semblerait que la conséquence des actions des chaperons moléculaire sur $[PSI^+]$ dépende de l'équilibre entre Hsp104 et Hsp70/40, plutôt que de la quantité de chacune de ces protéines en soi. Par exemple, suite à un choc thermique modéré à 39°C pendant 30-60 min le niveau de Hsp104 augmente plus vite que celui de Hsp70, ce qui conduit à la déstabilisation du prion $[PSI^+]$ *weak* lorsque les cellules sont remises à température normale (Newnam et al., 2011). Une incubation plus longue (plusieurs heures) à haute température restaure l'équilibre entre Hsp104 et Hsp70, et la stabilité du prion (Newnam et al., 2011). Des études récentes ont montré une fragmentation efficace des agrégats du prion $[PSI^+]$ lorsque le complexe Ssa1p/Sis1p se lie aux agrégats et puis recrute Hsp104. En absence de Ssa1p, et même en surexprimant Hsp104, la désagrégase n'est pas capable de fragmenter efficacement les agrégats du prion (Seyffer et al., 2012; Winkler et al., 2012).

Données in vitro.

Les données obtenues *in vivo* par mutation ou surexpression de certains facteurs sur la propagation de $[PSI^+]$ ne sont pas toujours simples à interpréter et des données contradictoires sont parfois publiées par différents groupes. Une analyse en tubes à essais est ainsi nécessaire pour documenter les effets simples ou combinés des chaperons moléculaires décrits ci-dessus. Plusieurs études *in vitro* ont ainsi documenté les effets des chaperons moléculaires sur l'assemblage spontané des protéines prions solubles et sur le désassemblage des fibres préformées des protéines prions (Krzewska and Melki, 2006; Savistchenko et al., 2008; Shorter and Lindquist, 2008). Elles ont montré que Hsp70 seul ou en combinaison avec ses

co-chaperon Hsp40 peut inhiber l'assemblage de Sup35p et de Ure2p (Krzewska and Melki, 2006; Savistchenko et al., 2008; Shorter and Lindquist, 2008). Au contraire, Hsp104 à faible concentration stimule leurs assemblages en particules de hauts poids moléculaires (Figure 28) (Shorter and Lindquist, 2008). Hsp104 à forte concentration resolubilise les particules de prions. Cette activité peut être réduite par Ssa1p ou renforcée par Ssb1p (Shorter and Lindquist, 2008) (Figure 28).

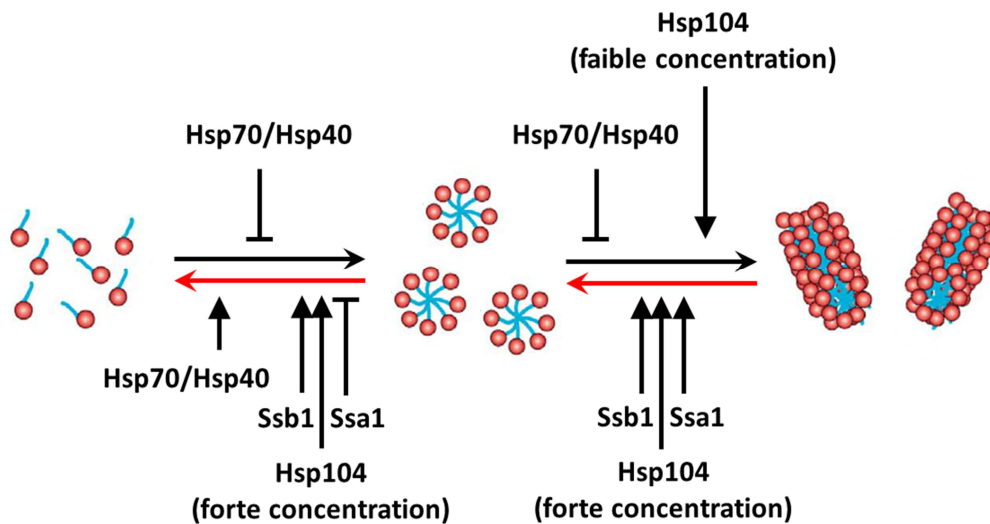


Figure 28 Représentation schématique des effets des chaperons moléculaires sur l'assemblage ou le désassemblage de Sup35p ou Ure2p. (Krzewska and Melki, 2006; Savistchenko et al., 2008; Shorter and Lindquist, 2008)

De telles études *in vitro* ne sont pas non plus exemptes de problèmes et génèrent parfois des données contradictoires entre différents laboratoires, et pouvant en partie s'expliquer par des différences dans les méthodes de purification, d'analyse et d'assemblage des protéines d'intérêt (Krzewska and Melki, 2006; Shorter and Lindquist, 2008).

Ainsi, une vision plus réaliste de l'effet des chaperons moléculaires ou d'autres composants cellulaires (e.g. protéasome) ne pourra être obtenue qu'en combinant les deux types d'approches : génétique et cellulaire d'un côté, biochimique et structurale de l'autre.

3.4.2 Le système ubiquitine-protéasome et la dégradation des protéines prions

La présence de dépôts protéiques intracellulaires ubiquitinylés est caractéristique de certaines maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson, d'Alzheimer ou de Huntington (Lennox et al., 1988; Lowe et al., 1988). Le système UPS joue un rôle

prépondérant dans l'élimination de protéines anormales potentiellement cytotoxiques. Un dysfonctionnement du système ubiquitine-protéasome est cependant fréquemment associé à la présence d'inclusions protéiques cytosoliques (Bence et al., 2001; Kristiansen et al., 2007). Chez la levure, des liens avaient été suggérés entre la voie UPS et la propagation du prion [*PSI*⁺] (Allen et al., 2007; Chernova et al., 2003). La délétion du gène *UBP6* (codant pour un enzyme impliqué dans le recyclage de l'ubiquitine) défavorise l'expression phénotypique et l'apparition *de novo* de [*PSI*⁺] (Chernova et al., 2003). Au contraire, l'augmentation du pool d'ubiquitine libre favorise l'expression phénotypique et l'induction *de novo* de [*PSI*⁺], et supprime tous les défauts causés par *ubp6*Δ (Chernova et al., 2003). La délétion des gènes *UBC4* (codant pour une enzyme de conjugaison de l'ubiquitination) ou *UBP6* peut réduire l'efficacité de cure du prion [*PSI*⁺] par la surexpression de Hsp104 (Allen et al., 2007). *ubc4*Δ facilite aussi l'apparition spontanée du prion [*PSI*⁺] (Allen et al., 2007). Des travaux au laboratoire ont plus directement révélé un rôle du protéasome dans le turnover de protéines prions *in vivo* et *in vitro* (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). Sup35p s'accumule dans des mutants *rpn4*Δ qui expriment moins de protéasome (Kabani et al., 2014). Le turnover de Ure2p *in vivo* est dépendant de l'activité protéasomale (Wang et al., 2015). Les formes solubles de Sup35p et Ure2p peuvent être dégradées par le protéasome *in vitro* (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). La dégradation de Sup35p et Ure2p est initiée par leurs domaines PrD déstructurés et ne nécessite pas leur ubiquitination (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). En revanche, tandis que les fibres de Sup35p peuvent être dégradées par le protéasome *in vitro*, nous avons montré au cours de cette thèse que les fibres de Ure2p sont complètement résistantes (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015).

3.5 Les autres protéines prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Au cours des dernières années, il est devenu de plus en plus évident que les protéines prions sont beaucoup plus répandues que ce que l'on pensait. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, plusieurs prions ont été identifiés et caractérisés à des niveaux divers (voir Tableau 3 pour une liste non exhaustive). Ces protéines n'ont pas d'homologies de séquence entre elles, mais partagent certaines caractéristiques telles que la présence d'un domaine prion riche en Q/N. Il est intéressant de noter que la plupart de ces protéines participent directement ou indirectement à la régulation de l'expression génique et du métabolisme cellulaire.

[*PSI*⁺] et [*URE3*] ont été initialement identifiés comme des prions de par leurs propriétés génétiques inhabituelles (Wickner, 1994). Le prion [*PIN*⁺] (ou [*RNQ*⁺]) a été identifié comme étant nécessaire à la formation *de novo* du prion [*PSI*⁺] (Derkatch et al., 1997, La désignation du [*PIN*⁺] est pour [*PSI*⁺] *inducibility*). La présence de [*PIN*⁺] facilite aussi la formation *de novo* d'autres prions chez la levure, y compris [*URE3*] (Bradley et al., 2002). La formation du prion [*PIN*⁺] est due à la conversion de la protéine Rnq1p (dont la fonction biologique n'est pas connue) sous une forme prion. Il faut cependant noter que d'autres prions peuvent également présenter des propriétés de type [*PIN*⁺] (Derkatch et al., 2001; Osherovich and Weissman, 2001).

D'autres protéines ont été identifiées par des approches bio-informatiques comme des prions putatifs sur la base d'algorithmes recherchant des biais de séquence tels que ceux retrouvés dans les domaines PrD riches en Q/N déjà connus (Michelitsch and Weissman, 2000). Un criblage à grande échelle plus récent a permis d'identifier 19 nouveaux PrD potentiels capables de s'agréger sous une forme prion dans les cellules lorsqu'ils sont surexprimés sous la forme d'une fusion avec eYFP (Alberti et al., 2009).

[*SWI*⁺] est la forme prion de Swi1p, une des 11 sous-unités de SWI/SNF, un complexe de remodelage de la chromatine qui joue un rôle important dans la régulation transcriptionnelle (Du et al., 2008). Lorsque Swi1p est sous sa forme prion [*SWI*⁺], il se délocalise du noyau vers le cytoplasme. Le phénotype associé au prion [*SWI*⁺] se traduit par une vitesse de croissance réduite sur des sources de carbone tels que le raffinose, le galactose et le glycérol (Du et al., 2008).

[*OCT*⁺] est la forme prion de Cyc8p qui est également impliquée dans la régulation globale de la transcription (Patel et al., 2009). Cyc8p forme un complexe corépresseur avec 4 molécules de Tup1p (*Ssn6-Tup1 complex*) qui réprime des gènes impliqués dans la sporulation et le croisement sexuel, dans la réponse au stress environnementaux, dans la réparation d'ADN et dans la répression par le glucose (Smith and Johnson, 2000). Comme pour [*SWI*⁺], le changement conformationnel de Cyc8p vers la forme prion [*OCT*⁺] conduit à sa délocalisation du noyau vers le cytoplasme où elle s'accumule sous la forme d'agrégats (Patel et al., 2009).

Le déterminant du prion [*MOT3*⁺] est le facteur de transcription Mot3p (Alberti et al., 2009). Mot3p intervient principalement dans la répression des gènes anaérobiques pendant la croissance aérobie (Abramova et al., 2001). Mot3p est également impliquée dans la

régulation des gènes impliqués dans la synthèse des composants de la paroi cellulaire, tels que *DANI* et *FLO11* (Holmes et al., 2013), et dans la signalisation par les phéromones sexuelles (Grishin et al., 1998). Dans les cellules soumises à un stress osmotique élevé, Mot3p est nécessaire pour la répression de la biosynthèse de l'ergostérol afin de rigidifier la membrane cellulaire (Montañés et al., 2011). Les cellules [*MOT3*⁺] présentent les phénotypes associés à la perte de fonction de Mot3p (Alberti et al., 2009).

Parmi les 8 prions ayant des fonctions connues (Tableau 3), la moitié d'entre eux est impliquée dans la régulation de la transcription. Les agrégats de prions se localisent généralement dans le cytoplasme, à l'exception du prion [*ISP*⁺] qui forme des agrégats nucléaires (Rogoza et al., 2010). Le prion [*ISP*⁺] est la forme prion d'un autre régulateur globale de la transcription, Sfp1p. Contrairement aux autres prions décrits à ce jour, le phénotype [*ISP*⁺] ne se manifeste pas simplement comme une perte de fonction de Sfp1p. [*ISP*⁺] se manifeste par un phénotype « d'anti-suppression », c'est-à-dire de suppression de la translecture de codons stop. De plus, et contrairement aux autres prions mentionnés ci-dessus, la propagation du prion [*ISP*⁺] ne dépend pas de Hsp104 (Rogoza et al., 2010)

[*MOD*⁺] est un nouveau prion chez la levure qui confère une résistance à l'azole, un agent antifongique, et au 5-fluorouracile (5FU). A l'exception de Mod5p, une isopentenyl-transférase d'ARNt chez la levure, qui a un domaine PrD riche en acides aminés hydrophobes, les autres PrDs sont riches en acides aminés Q/N (Suzuki et al., 2012).

[*NUP100*⁺] est la forme prion d'une nucléoporine Nup100p, un composant du complexe NPC (*Nuclear Pore Complex*). Nup100p présente toutes les caractéristiques d'une protéine prion *in vivo* et *in vitro*. Cependant la forme prion [*NUP100*⁺] conduit à très peu de conséquences phénotypiques (Halfmann et al., 2012b).

En plus des prions à base « amyloïde », d'autres phénomènes à base de protéines transmissibles ont été aussi décrits chez la levure. Le prion [*GAR*⁺] est formé par un complexe de deux protéines, Std1p (une protéine de signalisation par le glucose) et Pma1p (une pompe membranaire à protons). La présence du prion [*GAR*⁺] conduit à la croissance cellulaire sur glycérol en présence d'un analogue de glucose non-métabolisable. La propagation du [*GAR*⁺] ne dépend pas de Hsp104, et le complexe Std1p-Pma1p ne montre pas de caractéristiques d'un amyloïde (Brown and Lindquist, 2009). Un autre phénomène à base de protéines transmissibles est basé sur l'autocatalyse enzymatique plutôt que sur l'agrégation protéique.

La protéine impliquée est la protéase B qui peut générer spontanément un état héritable de façon cytoplasmique, appelé $[\beta]$, dans les cellules qui manquent de protéases A fonctionnelles. $[\beta]$ est un prion parce qu'il est infectieux, curable, et sa formation *de novo* induite par la surexpression du gène codant pour la protéase B (Roberts and Wickner, 2003).

Tableau 3 Prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

prion	protéine	Localisation intracellulaire	fonction biologique de la protéine native	phénotype associé au prion	Structure de type amyloïde	domaine riche en Q/N
[<i>PSI</i> ⁺]	Sup35p	cytoplasme	terminaison de la traduction	perte de fonction (augmentation de la suppression non-sens)	Oui	Oui
[<i>URE3</i>]	Ure2p	cytoplasme	régulation du catabolisme de l'azote	perte de fonction (utilisation des sources d'azote pauvres)	Non	Oui
[<i>PIN</i> ⁺]/[<i>RNQ</i> ⁺]	Rnq1p	cytoplasme	ND	stimulation de la formation <i>de novo</i> des autres prions	Oui	Oui
[<i>SWI</i> ⁺]	Swi1p	noyau	régulation de la transcription	perte de fonction (perturbation de l'exploitation de carbone)	Oui	Oui
[<i>OCT</i> ⁺]	Cyc8p	noyau	régulation de la transcription (répresseur)	perte de fonction (perturbation du métabolisme carboné, floculation)	ND	Oui
[<i>MOT3</i> ⁺]	Mot3p	noyau	régulation de la transcription (répresseur)	perte de fonction (changement de composition de la paroi cellulaire)	Oui	Oui
[<i>JSP</i> ⁺]	Sfp1p	noyau	régulation de la transcription (activateur)	antisuppression	ND	Oui
[<i>MOD</i> ⁺]	Mod5p	membrane	modification d'ARNt	augmentation du niveau d'ergostérol et résistance aux drogues antifongiques	Oui	Non
[<i>NUP100</i> ⁺]	Nup100p	deux cotés de NPC (<i>nuclear pore complex</i>)	FG-nucléoporine	légère augmentation de la vitesse d'import nucléaire	ND	Oui

(Chernova et al., 2014; Liebman and Chernoff, 2012; Tuite, 2013)

3.6 Les effets biologiques des prions de levure

Alors que les prions chez les mammifères sont généralement liés à des maladies (Aguzzi and Calella, 2009; Brundin et al., 2010), la question de savoir si les prions de levure sont des entités « bénéfiques » ou « délétères » est encore débattue (Halfmann et al., 2012a; Liebman and Chernoff, 2012; Tuite, 2013; Wickner et al., 2011). L'agrégation et la perte de fonction de protéines prions peuvent être considérées comme des événements pathologiques pour la levure. Cependant, les prions chez la levure ne sont généralement pas létaux. De par leurs rôles dans la régulation génétique et métabolique, ils pourraient contribuer à la plasticité phénotypique des levures en fonction des conditions environnementales. Un même prion de levure pourrait avoir des conséquences phénotypiques très différentes en fonction du génotype de l'hôte, de l'environnement, ou des souches de prion.

3.6.1 Arguments en faveur d'un rôle physiologique des prions de levure

3.6.1.1 Existence d'amyloïdes fonctionnels

Il a été montré que les séquences de plus de 200 domaines protéiques partagent des similarités avec des PrD (Harrison and Gerstein, 2003; Michelitsch and Weissman, 2000), ce qui suggère que la formation de prions est un trait très ancien au cours de l'évolution qui pourrait être aussi répandu chez d'autres organismes. En effet, on retrouve des amyloïdes fonctionnels chez des organismes répartis dans tous les domaines du vivant. [*HET-s*] chez le champignon *Podospora anserina* est le premier prion qui a été décrit comme bénéfique pour les cellules d'hôtes (Coustou et al., 1997). Il est impliqué dans la régulation de la formation des hétérokaryons. Chez la bactérie, la polymérisation des fibres Curli est impliquée dans la formation de biofilm et l'invasion de l'hôte (Evans et al., 2015). De plus, les amyloïdes fonctionnels sont aussi présents dans les organismes multicellulaires et sont impliqués dans le stockage des hormones peptidiques (Maji et al., 2009), la production de soie (Römer and Scheibel, 2008) ou encore la mémoire à long terme (Si et al., 2010)

3.6.1.2 [PSI⁺] et [PIN⁺] sont retrouvés dans la nature

[PSI⁺] et [URE3] ont longtemps été considérés comme des artifices de laboratoire n'existant pas chez les levures à l'état naturel (Chernoff et al., 2000; Nakayashiki et al., 2005; Resende et al., 2003). En 2012, Halfmann et ses collègues ont découvert la présence de [PSI⁺] dans certaines souches sauvages (Halfmann et al., 2012a). De façon remarquable, presque toutes les souches sauvages [PSI⁺] identifiées portent également le prion [PIN⁺] (Halfmann et al., 2012a). Ces données suggèrent que [PIN⁺] est nécessaire pour la formation *de novo* de [PSI⁺] dans la nature comme au laboratoire. En accord avec cela, une étude récente a montré que les souches de levures sauvages comportent des prions [PIN⁺]/[RNQ⁺] capables d'induire très efficacement la formation de [PSI⁺] conduisant la plupart du temps à l'acquisition de traits phénotypiques nouveaux (Westergard and True, 2014).

3.6.1.3 [PSI⁺] confère de nouveaux phénotypes

La plupart des souches de prions étudiés en laboratoire sont très stables et bien tolérées par les cellules. Une des raisons d'être des prions chez la levure serait de conférer une plasticité phénotypique permettant une adaptation rapide à des conditions environnementales particulières (Halfmann and Lindquist, 2010).

Il a ainsi été proposé que l'altération du protéome induite par [PSI⁺] permet l'adaptation des levures vis-à-vis de divers changements environnementaux en permettant l'expression de nouveaux phénotypes (Baudin-Baillieu et al., 2014; True and Lindquist, 2000; True et al., 2004). En effet, [PSI⁺] peut favoriser la croissance des souches domestiques ou sauvages sous certaines conditions de stress (Halfmann et al., 2012a; True and Lindquist, 2000; True et al., 2004). Ces effets sont dépendants du fond génétique des souches et aucun effet cohérent de [PSI⁺] sur l'adaptation à de nouveaux environnements n'a été détecté. [PSI⁺] module également un événement naturel de décalage du cadre de lecture au niveau du gène codant pour l'antizyme, un régulateur négatif de la biosynthèse des polyamines cellulaires (Namy et al., 2008). La fluctuation des niveaux de polyamines pourrait expliquer en partie les phénotypes médiés par [PSI⁺] (Namy et al., 2008).

3.6.1.4 Les prions de levure, une réponse adaptative aux changements environnementaux

Des changements phénotypiques rapides peuvent être déterminants lorsque les cellules font face à des stress environnementaux pouvant causer la mort cellulaire (Suzuki and Tanaka, 2013). $[MOD^+]$ est la forme prion de Mod5p (voir 3.5) chez la levure *S. cerevisiae*. Le prion $[MOD^+]$ illustre parfaitement comment un prion peut permettre une réponse rapide à un changement de l'environnement (Figure 29). Ce prion confère aux cellules de levure une résistance aux antifongiques comme le fluconazole (Suzuki et al., 2012). L'ajout de fluconazole à une population de cellules $[mod^-]$ augmente la fréquence de formation *de novo* de $[MOD^+]$, augmentant ainsi les chances de survie des cellules. Lorsque la pression sélective est levée, la population retourne progressivement à l'état $[mod^-]$ (Suzuki et al., 2012).

$[MOT3^+]$ est un autre prion chez la levure *S. cerevisiae* (voir 3.5) qui est issu de l'agrégation de Mot3p. Mot3p présente une fréquence élevée de conversion spontanée vers sa forme prion (Alberti et al., 2009). Le prion $[MOT3^+]$ est aussi retrouvé dans environ 6% des souches de levures sauvages testées (Halfmann et al., 2012a). La formation et l'élimination du prion $[MOT3^+]$ est une réponse adaptative aux conditions environnementales (Figure 29). Le stress lié à l'éthanol augmente la fréquence d'apparition du prion $[MOT3^+]$, alors que l'hypoxie élimine le prion $[MOT3^+]$ (Montañés et al., 2011; Sertil, 2003). Dans la nature, les levures subissent fréquemment des transitions entre le stress de l'éthanol produit par la fermentation du sucre (voir 2.1.2.3) et l'hypoxie. Par conséquent, la formation et l'élimination du prion $[MOT3^+]$ fonctionnent comme un adaptateur moléculaire en réponse aux changements environnementaux dans la nature.

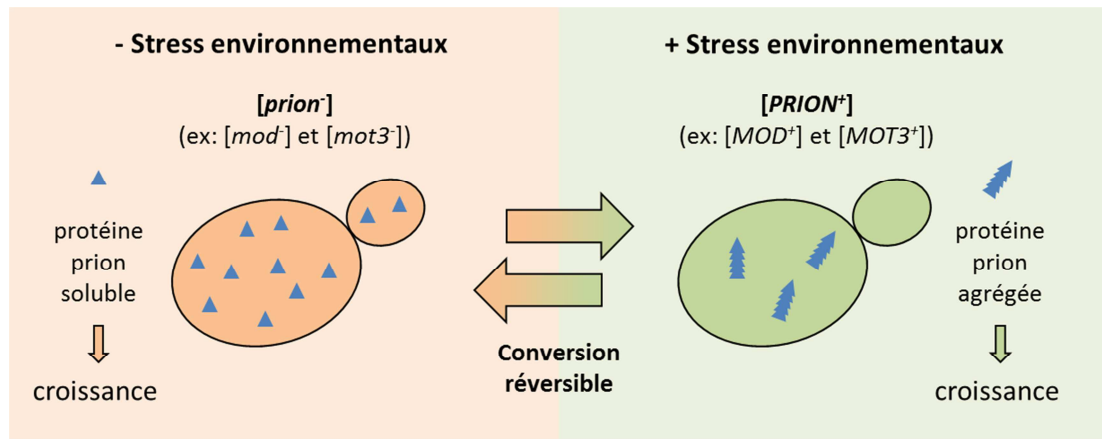


Figure 29 Conversion réversible des protéines prions lors de changements environnementaux. (Suzuki and Tanaka, 2013)

3.6.2 Arguments soutenant l'hypothèse que les prions de levure sont des entités délétères

3.6.2.1 Les prions de levures sont très peu présents dans la nature

Même si l'on retrouve des prions dans la nature, ils demeurent extrêmement rares. Deux études précoces ont identifié deux souches sauvages contenant $[PIN^+]$ mais pas $[PSI^+]$ (Chernoff et al., 2000; Resende et al., 2003). Une étude élargie à 70 souches sauvages n'avait toujours pas permis de retrouver les prions $[PSI^+]$ ou $[URE3]$, mais 11 souches (16%) portaient $[PIN^+]$ (Nakayashiki et al., 2005). Une étude plus récente sur 700 souches sauvages a finalement permis d'identifier 9 souches (1%) contenant $[PSI^+]$ et 43 (6%) contenant $[PIN^+]$ (Halfmann et al., 2012a). Les prions sont considérés comme des agents infectieux toxiques par certaines scientifiques parce qu'un agent infectieux bénéfique se propagerait certainement rapidement dans une population et serait plus fréquemment retrouvé. Ainsi, le prion $[HET-s]$ qui a un vrai rôle physiologique est retrouvé dans 95% des souches sauvages de *Podospora anserina* (Debets et al., 2012). De plus, il existe une barrière d'espèce, reposant en partie sur des différences de séquence et d'organisation des PrD, qui empêche (ou du moins limite) la transmission de prions entre espèces voisines ou éloignées (Bruce and Chernoff, 2011; Gonzalez Nelson and Ross, 2011).

3.6.2.2 La plupart des souches de $[PSI^+]$ seraient létales

Sup35p est une protéine essentielle. Des variants du prion $[PSI^+]$ qui entraînent la séquestration de toutes les formes solubles de Sup35p sont fortement délétères voire létaux pour la croissance cellulaire. En effet, McGlinchey et ses collègues ont montré que la majorité des variants structuraux à l'origine de différentes souches de $[PSI^+]$ est létale ou affecte fortement la croissance des levures (McGlinchey et al., 2011). De même, ils ont montré que de nombreuses souches du prion $[URE3]$ entraînent un ralentissement de croissance bien plus drastique que celui observé dans des cellules $ure2\Delta$, indiquant une cytotoxicité de $[URE3]$ indépendante de la perte de fonction de Ure2p (McGlinchey et al., 2011).

3.6.2.3 D'autres preuves de toxicité des prions de levure

Même si la plupart des prions étudiés au laboratoire n'affecte pas la survie cellulaire, la présence du prion s'accompagne souvent d'une perte de fonction de la protéine prion en question (Tableau 3). De plus, la formation ou la présence de $[PSI^+]$ ou $[URE3]$ peuvent induire une réponse cellulaire au stress (Schwimmer and Masison, 2002). Les prions eux même ne sont peut-être pas cytotoxiques, mais ils peuvent le devenir en combinaison avec d'autres facteurs. Par exemple, les prions $[PSI^+]$ et $[PIN^+]$ endogènes peuvent induire l'agrégation et la toxicité de protéines polyglutamines dans des modèles levure de la maladie de Huntington (Chernova et al., 2014; Gokhale et al., 2005; Liebman and Chernoff, 2012; Wickner et al., 2015). La surexpression de Sup35p ou de son PrD, est toxique pour les cellules $[PSI^+]$ (Chernoff et al. 1992; Derkatch et al., 1997). De même, la surexpression de Rnq1p est toxique pour les cellules $[PIN^+]$ (Douglas et al., 2008). La tolérance des cellules vis-à-vis de ces prions dépend donc d'un équilibre délicat entre le niveau d'expression de ces derniers, de la capacité de réponse du CQP et de l'UPS, et est fortement influencée par les facteurs environnementaux.

Objectifs :

Depuis une quinzaine d'années environ, notre laboratoire a contribué de façon importante à la compréhension des mécanismes moléculaires et structuraux en jeu lors de l'assemblage des protéines prions Sup35p et Ure2p (Bousset et al., 2001a, 2001a, 2001b, 2002, 2003, 2004, 2004, 2010; Fay et al., 2005; Habenstein et al., 2012; Kabani and Melki, 2011, 2015; Kabani et al., 2011, 2014; Krzewska and Melki, 2006; Krzewska et al., 2007; Loquet et al., 2009; Luckgei et al., 2013, 2014; Redeker et al., 2007; Schütz et al., 2014; Thual et al., 1999, 2001, 2001; Wang et al., 2015). L'effet de chaperons moléculaires (connus pour être des modulateurs de $[PSI^+]$ et $[URE3]$ *in vivo*) sur la polymérisation de Sup35p et Ure2p a notamment été décortiqué *in vitro* (Krzewska and Melki, 2006; Savistchenko et al., 2008). De plus, il a été montré que le protéasome 26S était capable de dégrader les formes soluble et fibrillaire de Sup35p *in vitro* et qu'il joue un rôle dans la propagation de $[PSI^+]$ *in vivo* (Kabani et al., 2014).

Dans la continuité de ces études, l'objectif de la première partie de ma thèse a été de répondre à deux questions principales : 1), Est-ce que d'autres prions tels que Ure2p, dont la structure est radicalement différente de celle de Sup35p, peuvent être substrats du protéasome 26S? 2), Est-ce que les chaperons moléculaires sont capables de favoriser ou au contraire d'inhiber la dégradation protéasomale des formes soluble et fibrillaire de Sup35p ?

Les prions de levure ont été considérés par certains comme des 'pathologies' potentiellement délétères pour les cellules. D'autres ont au contraire suggéré qu'ils pourraient jouer le rôle de modulateurs épigénétiques de l'expression génique permettant d'acquérir rapidement de nouveaux traits favorables à la survie dans certaines conditions environnementales (Halfmann et al., 2012a; Holmes et al., 2013; Kabani and Melki, 2016; True et al., 2004; Tuite, 2015; Wickner et al., 2011). Certains prions (e.g. $[PSI^+]$) ont ainsi été retrouvés dans des souches de levure sauvages. Ces dernières, comme la plupart des cellules, vivent le plus souvent à l'état quiescent et ne divisent pas ou peu. Nos connaissances sur les mécanismes de formation, de propagation et d'élimination des prions de levures sont en revanche essentiellement basées sur des études réalisées sur des cellules en division active.

L'objectif de la deuxième partie de ma thèse a consisté à répondre aux questions suivantes : 1), Quels sont les changements ultra-structuraux et fonctionnels subis par les agrégats de Sup35p au cours des différentes phases de croissance ? 2), Quelles sont les conséquences de la présence du prion [PSI^+] sur la croissance et la longévité des levures ?

RESULTATS

RESULTATS 1 :

La première partie de mon travail de thèse a consisté en une étude biochimique visant à documenter l'articulation entre les chaperons moléculaires et le protéasome dans la dégradation des protéines prions Sup35p et Ure2p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Ce travail a tout d'abord abouti à la publication d'un premier article publié dans PLoS One sur la dégradation protéasomale des formes soluble et fibrillaire de Ure2p (article 1). Ensuite, ce travail nous a montré les limites de l'approche biochimique pour décrire l'influence de divers chaperons moléculaires sur ces réactions de dégradation.

ARTICLE 1



RESEARCH ARTICLE

The 26S Proteasome Degrades the Soluble but Not the Fibrillar Form of the Yeast Prion Ure2p *In Vitro*

Kai Wang, Virginie Redeker, Karine Madiona, Ronald Melki*, Mehdi Kabani*

Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France

Résumé

Dans l'article 1, nous montrons que le turnover *in vivo* de la protéine prion Ure2p dépend de l'activité protéasomale. Nous évaluons ensuite si les formes solubles et fibrillaires de Ure2p sont des substrats du protéasome 26S *in vitro*. Nous montrons que la forme soluble de Ure2p est facilement dégradée par le protéasome de manière ubiquitine-indépendante. Comme observé précédemment pour Sup35p, la dégradation de la forme soluble de Ure2p est initiée par son domaine prion en N-terminal en générant une série de peptides amyloïdes. En outre, nous montrons que la suppression des résidus 3-25 abolit complètement la dégradation, ce qui suggère que cette région sert de motif de reconnaissance par le protéasome 26S pour initier la dégradation. Contrairement à ce que nous avons observé pour Sup35p, les fibres de Ure2p sont totalement résistantes à la dégradation protéasomale. Les différentes structures pouvant être adoptées par les prions (e.g. fibres amyloïdes pour Sup35p, structure quasi-native pour Ure2p, etc) pourraient donc dicter leurs capacités à être reconnus et dégradés par le protéasome ou d'autres machineries protéolytiques de la cellule.

RESEARCH ARTICLE

The 26S Proteasome Degrades the Soluble but Not the Fibrillar Form of the Yeast Prion Ure2p *In Vitro*

Kai Wang, Virginie Redeker, Karine Madiona, Ronald Melki*, Mehdi Kabani*

Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette, France

* Ronald.Melki@lebs.cnrs-gif.fr (RM); Mehdi.Kabani@lebs.cnrs-gif.fr (MK)



 OPEN ACCESS

Citation: Wang K, Redeker V, Madiona K, Melki R, Kabani M (2015) The 26S Proteasome Degrades the Soluble but Not the Fibrillar Form of the Yeast Prion Ure2p *In Vitro*. PLoS ONE 10(6): e0131789. doi:10.1371/journal.pone.0131789

Editor: Ina Maja Vorberg, Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen e.V., GERMANY

Received: May 4, 2015

Accepted: June 8, 2015

Published: June 26, 2015

Copyright: © 2015 Wang et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: M.K., V.R. and R.M. are supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BS08-0013-02). K.W. is the beneficiary of a doctoral grant from the French Ministry of National Education, Research and Technology. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Yeast prions are self-perpetuating protein aggregates that cause heritable and transmissible phenotypic traits. Among these, $[PSI^+]$ and $[URE3]$ stand out as the most studied yeast prions, and result from the self-assembly of the translation terminator Sup35p and the nitrogen catabolism regulator Ure2p, respectively, into insoluble fibrillar aggregates. Protein quality control systems are well known to govern the formation, propagation and transmission of these prions. However, little is known about the implication of the cellular proteolytic machineries in their turnover. We previously showed that the 26S proteasome degrades both the soluble and fibrillar forms of Sup35p and affects $[PSI^+]$ propagation. Here, we show that soluble native Ure2p is degraded by the proteasome in an ubiquitin-independent manner. Proteasomal degradation of Ure2p yields amyloidogenic N-terminal peptides and a C-terminal resistant fragment. In contrast to Sup35p, fibrillar Ure2p resists proteasomal degradation. Thus, structural variability within prions may dictate their ability to be degraded by the cellular proteolytic systems.

Introduction

Yeast prions are self-perpetuating protein aggregates that manifest as non-Mendelian and cytoplasmically inherited dominant phenotypic traits. $[PSI^+]$ and $[URE3]$ stand out as the best known and the most documented yeast prions, and result from the aggregation of the soluble forms of Sup35p, a translation termination factor, and Ure2p, a negative regulator of nitrogen catabolism, respectively, into infectious entities (reviewed in [1, 2]).

Purified Sup35p and Ure2p are both able to spontaneously assemble into protein fibrils under physiological conditions [3–6]. These fibrillar assemblies are infectious in that they efficiently induce the prion state when re-introduced into prion-free yeast cells [7–11]. Assembly of Sup35p and Ure2p into fibrils strictly depends on the presence of a glutamine and asparagine-rich domain, referred to as the prion domain (PrD), and located at the N-terminus of both proteins [1]. Furthermore, Sup35p and Ure2p can populate an ensemble of structurally different and heritable molecular conformations that lead to a wide range of phenotypically distinct $[PSI^+]$ and $[URE3]$ prion strains, respectively [7, 8, 11–18]. However, the fibrillar

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

assemblies formed by Sup35p and Ure2p in our comparable experimental conditions are structurally unrelated. Sup35p fibrils are believed to have an amyloid structure, with the PrD of individual Sup35p monomers stacked along the fibrils axis and the globular C-terminal domains protruding from the fibrils core [14, 19–23], while both the N- and C-terminal moieties are integral parts of Ure2p fibrils under our experimental conditions [8, 24–29]. As PrDs in isolation assemble into prion-inducing fibrils, they were often used as proxies to decipher the structure of the full-length prion assemblies ([1] and references therein). Nonetheless, we showed for both Sup35p and Ure2p that the latter assemblies are structurally and functionally different from those formed by the full-length proteins [8, 9, 19–21, 28–30].

De novo formation, propagation and elimination of [PSI⁺] and [URE3], as well as that of other yeast prions, is highly dependent on the interplay between actors of the cellular protein folding and quality control machineries, among which the Hsp70, Hsp40 and Hsp104 molecular chaperones [2, 31]. However, very little is known on the potential role of the major cellular proteolytic systems, the ubiquitin-proteasome system (UPS) and autophagy, on the turnover of the soluble, oligomeric or fibrillar intermediates populated by yeast prions [32]. Links between the UPS and [PSI⁺] were previously reported but did not directly address whether the proteasome degrades prion particles [33, 34]. We recently demonstrated that reducing intracellular proteasome pools caused Sup35p accumulation and defects in [PSI⁺] formation and propagation [32]. We showed that purified yeast 26S proteasome was able to degrade Sup35p *in vitro*, both in its soluble native form and in its highly ordered fibrillar form associated with [PSI⁺] [32]. These findings revealed a possible and overlooked role of the proteasome in the turnover of prion assemblies [32].

Here, we show that the turnover of Ure2p *in vivo* is dependent on proteasomal activity. We assess whether the soluble and fibrillar forms of Ure2p are substrates of the 26S proteasome *in vitro*. We show that soluble Ure2p is readily degraded by the 26S proteasome in an ubiquitin-independent manner. As observed previously for Sup35p, the degradation of soluble Ure2p proceeds from the N-terminal end yielding an array of amyloidogenic peptides. Furthermore, we show that a deletion of residues 3 to 25 completely abolishes degradation, suggesting this region bears an important degron required by the proteasome to engage Ure2p. Remarkably and contrary to what we observed for Sup35p amyloid fibrils, we show that native-like Ure2p fibrils resist proteasomal degradation.

Results

Soluble native Ure2p is a proteasome substrate *in vivo* and *in vitro*

To determine whether Ure2p is a proteasomal substrate *in vivo*, we assessed its stability in the presence or absence of proteasome inhibitors using cycloheximide-chase experiments [35]. In order to allow the detection of Ure2p in cell extracts by Western blot, these experiments were carried out in a prion-free [*ure-0*] wild-type yeast strain bearing a plasmid that drives *URE2* overexpression under the control of a tet-inducible promoter (see [Materials and Methods](#)) [36]. As described previously [37], we found that Ure2p is slowly degraded over time ([Fig 1A and 1B](#)). In contrast with what we observed with DMSO, Ure2p degradation was abolished for over 4h in the presence of the proteasome inhibitor MG132 ([Fig 1A and 1B](#)). This suggests that the proteasome contributes to soluble Ure2p degradation. We were not able to make similar observations in cells harboring the [URE3] phenotype. Nonetheless, the experiments depicted in [Fig 1A and 1B](#) prompted us to investigate the proteasomal degradation of Ure2p in well-defined *in vitro* assays.

We previously showed that purified yeast 26S proteasomes were able to degrade soluble native Sup35p *in vitro* [32]. Proteasomal degradation of Sup35p proceeded sequentially from

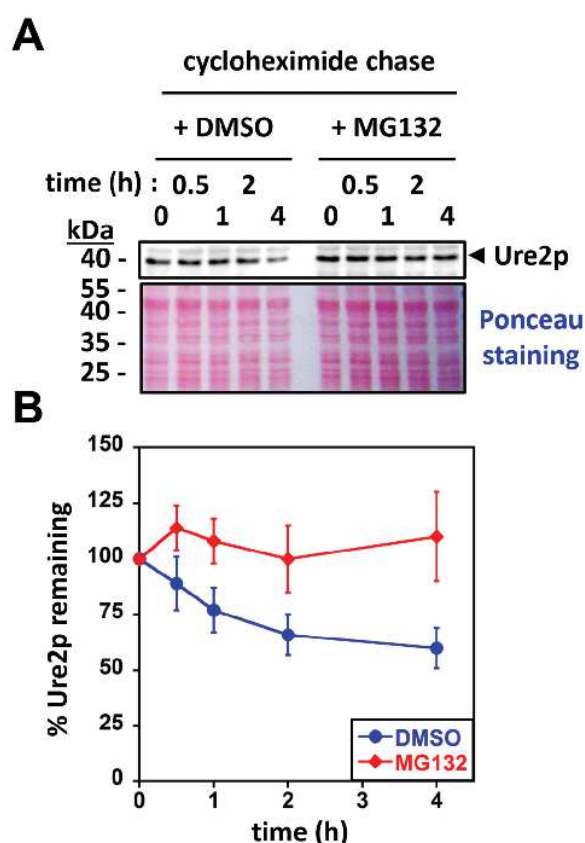


Fig 1. Soluble Ure2p is a proteasomal substrate *in vivo*. (A) Yeast cells overexpressing Ure2p (see Materials and Methods) were grown to mid-log phase and then treated with DMSO or MG132 (50 μM) for 30 min at 30°C. Protein expression was shut off by the addition of cycloheximide (100 μg.ml⁻¹), and aliquots were withdrawn at the times indicated (in hours). Cell extracts were prepared and analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-Ure2p antibodies (upper panel) or Ponceau staining (lower panel). (B) Quantification of western blots such as those shown in (A) was performed using ImageJ. The amount of Ure2p at time zero was set to 100% (data points represent the mean ± SE of independent experiments performed in triplicate).

doi:10.1371/journal.pone.0131789.g001

the N-terminal PrD, generating an array of overlapping amyloidogenic peptides and a C-terminal proteasome-resistant Sup35p fragment spanning residues 83–685 [32]. To determine whether Ure2p is degraded by yeast 26S proteasomes *in vitro* and compare its proteolytic processing to that of Sup35p, we incubated soluble Ure2p in the presence of purified yeast 26S proteasomes and ATP and in the presence or absence of the proteasome inhibitor MG132 at 30°C. Aliquots were withdrawn at time intervals and analyzed by SDS-PAGE and Western blot using anti-Ure2p antibodies. A control reaction where Sup35p was incubated under exactly the same conditions was run in parallel. Fig 2A (upper panel, left) shows that full-length Ure2p is degraded in a time-dependent manner by the 26S proteasome. The proteasome inhibitor MG132 abolished degradation (Fig 2A, upper panel, right). Beside a major proteolytic fragment, denoted Ure2p*, two lower molecular-weight Ure2p fragments persisted several hours after the onset of the reaction (Fig 2A, upper panel, left). Overall, Ure2p degradation is reminiscent of what we observe for Sup35p in the control reaction (Fig 2A, lower panels and as we previously reported, [32]).

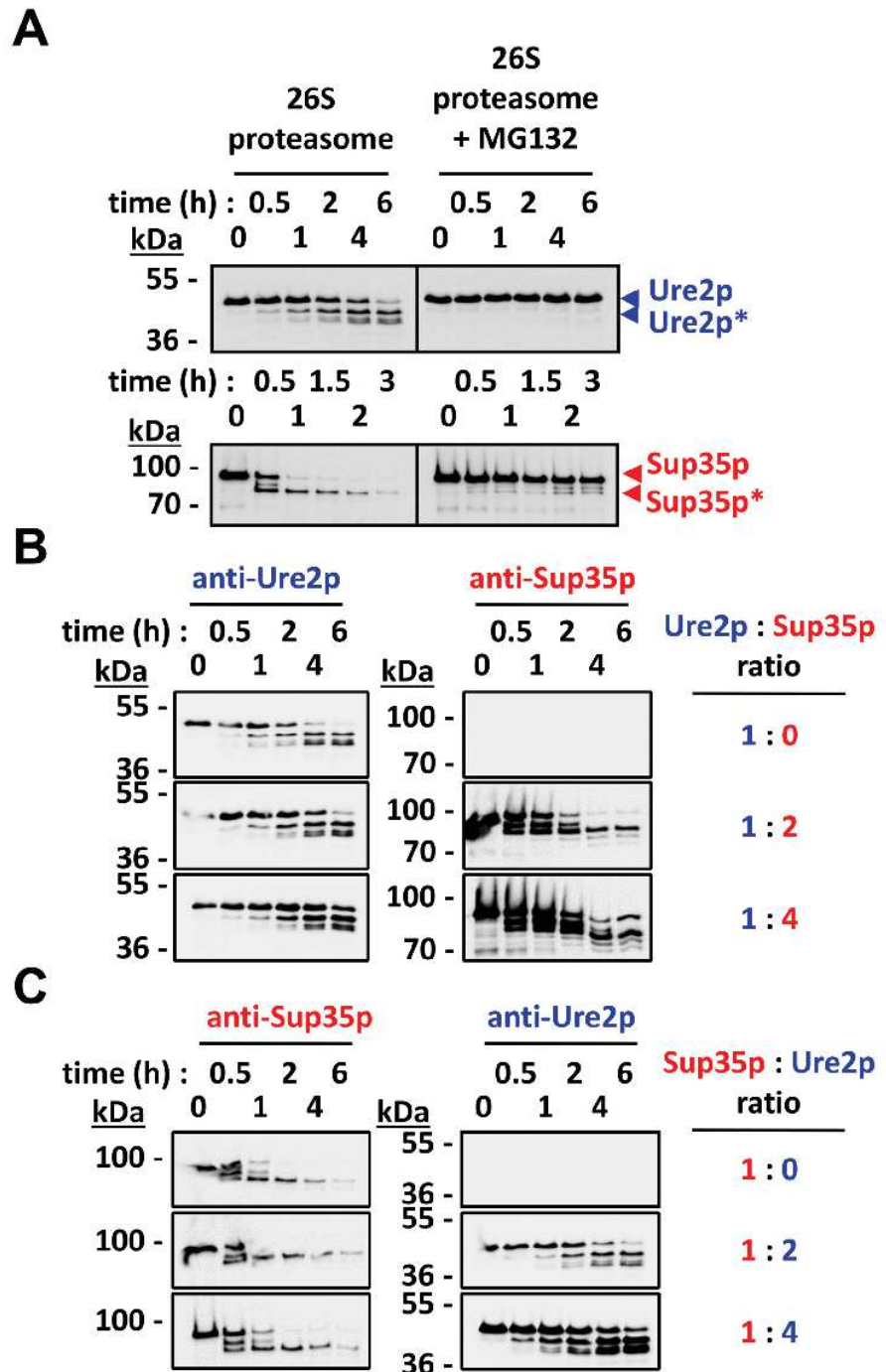


Fig 2. Soluble Ure2p is a proteasomal substrate *in vitro*. (A) Purified 26S proteasomes (2 nM) were mixed with purified soluble Ure2p (250 nM) (upper panel) or Sup35p (125 nM) (lower panel) in the presence of 2.5 mM ATP, with or without MG132 (100 μM), as indicated. The reaction mixes were incubated at 30°C under mild agitation (<300 rpm). At the indicated time points, aliquots were removed and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-Ure2p or anti-Sup35p antibodies. Ure2p* and Sup35p* indicate proteasome-resistant fragments. (B) Purified 26S proteasomes (2 nM) were mixed with purified Ure2p (250 nM) and

without or with increasing concentrations of purified Sup35p (250 nM to 1 μ M), in the presence of 2.5 mM ATP. Reaction mixes were incubated and analyzed as described in (A). (C) Purified 26S proteasomes (2 nM) were mixed with purified Sup35p (125 nM) and without or with increasing concentrations of purified Ure2p (250 nM to 500 nM), in the presence of 2.5 mM ATP. The reaction mixes were incubated at 30°C under mild agitation (<300 rpm). Reaction mixes were incubated and analyzed as described in (A).

doi:10.1371/journal.pone.0131789.g002

We next compared the binding and degradation efficiency of Ure2p and Sup35p by yeast 26S proteasomes. A constant amount of yeast 26S proteasomes and Ure2p was incubated in the absence or presence of increasing amounts of Sup35p. The reaction mixtures were incubated at 30°C and aliquots were withdrawn at the indicated time and analyzed by SDS-PAGE and western blot using anti-Ure2p and anti-Sup35p antibodies. Fig 2B shows that both Ure2p and Sup35p were degraded under all conditions. The degradation of Ure2p was progressively slowed, but not abolished, with the highest amounts of Sup35p in the reaction mixture (Fig 2B, bottom panels). Both Ure2p and Sup35p were degraded by the proteasome in the reciprocal experiment where a constant amount of yeast 26S proteasomes and Sup35p was incubated in the absence or presence of increasing amounts of Ure2p (Fig 2C). However, in this case, the degradation of Sup35p was not significantly slowed by the addition of up to a four-fold molar excess of Ure2p (Fig 2C, bottom panels). This suggests that soluble Sup35p is a preferred proteasome substrate compared to soluble Ure2p, at least in these experimental conditions.

Proteasomal degradation of Ure2p generates amyloidogenic peptides from the N-terminal moiety

We next identified the proteolytic products generated upon soluble Ure2p degradation by the 26S proteasome. Ure2p was incubated alone or in the presence of 26S proteasomes for up to 3 h at 30°C, and the reaction mixtures analyzed by western blot (Fig 3, inset) and nanoLC-LT-Q-Orbitrap mass spectrometry. The degradation of Ure2p by the 26S proteasome generated 94 different ~10- to 30-amino-acid-long peptides, spanning the first 103 residues of the protein (Fig 3, S1 Table). None of these peptides was identified in the control reactions without 26S proteasomes, indicating they correspond to specific products of proteasome-dependent Ure2p proteolysis. Most peptides were generated within 1 h of incubation, while others were detected after 2 h or 3 h of incubation (Fig 3, S1 Table). This time-dependent mass-spectrometry analysis suggests that Ure2p degradation by the proteasome proceeds sequentially from the N-terminal end of the protein towards the C-terminus (Fig 3, S1 Table). No peptides spanning residues 103 to 354 were identified in our mass spectrometry analysis within the time frame of the experiment. The proteasomal degradation pattern of Ure2p we observed (Fig 2A, upper panel left and Fig 3, inset) is thus due to processive cleavage of Ure2p N-terminal PrD. The compactly folded globular C-terminal domain of Ure2p [38] appeared to resist proteasomal degradation. Thus, the proteasomal degradation of soluble Ure2p *in vitro* resembles that of Sup35p [32]. Indeed, both proteins are sequentially degraded via their intrinsically disordered N-terminal PrDs, yielding amyloidogenic peptides and proteasome-resistant fragments encompassing their folded and functional C-terminal domains (Figs 2 and 3) [32].

Deletion of residues 3–25 prevents proteasomal degradation of soluble Ure2p

We previously showed that a truncated form of Sup35p lacking the N-terminal 82 amino acid residues (Sup35 Δ 1–82) resists proteasomal degradation suggesting a prominent role for Sup35p PrD in recognition and degradation by the 26S proteasome [32]. The results presented in Figs 2 and 3 suggest that Ure2p PrD behaves as a degron that is recognized and engaged by

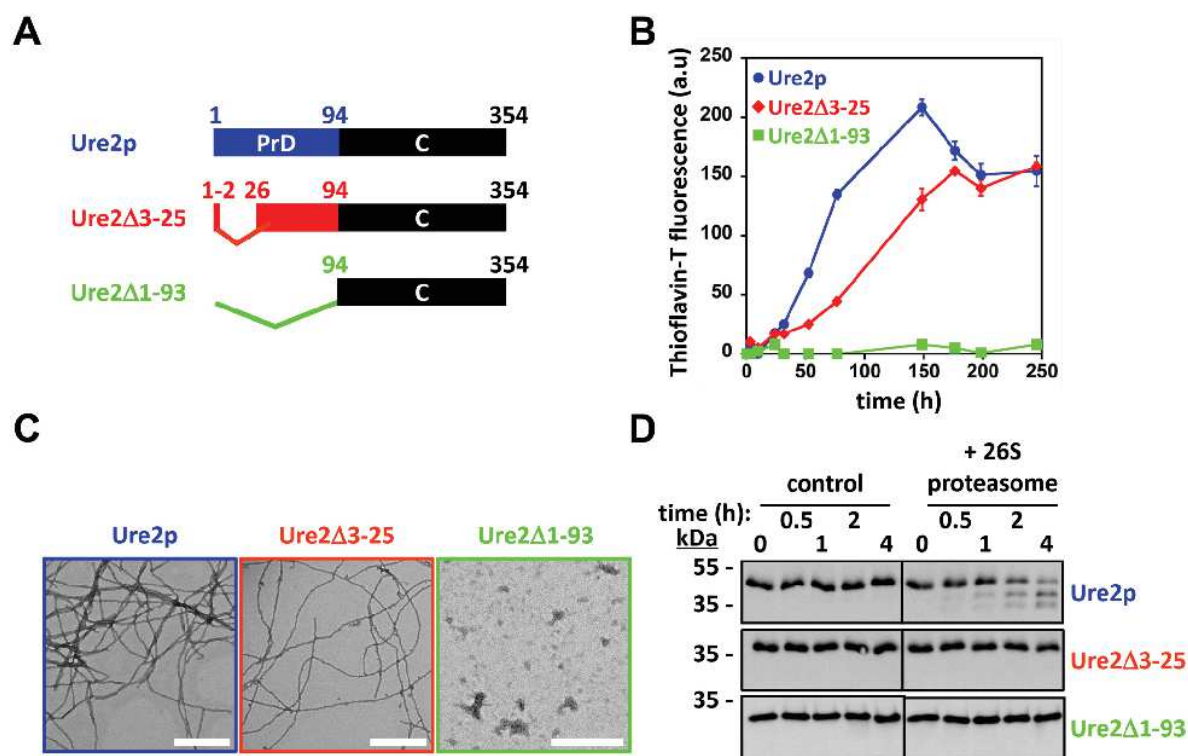


Fig 4. The deletion of residues 3–25 prevents the proteasomal degradation of Ure2p. (A) Cartoon representation of the Ure2p variants used in this study. (B) Time-courses of Ure2p, Ure2Δ3–25 and Ure2Δ1–93 (25 μM) assembly at 6°C, monitored by thioflavin T binding (a.u., arbitrary units). Data represent the mean of three independent experiments ± SE (C) Negative-stained electron micrographs of Ure2p, Ure2Δ3–25 and Ure2Δ1–93 (25 μM) assemblies after 30 days of incubation at 6°C (scale bar: 500 nm). Only amorphous aggregates were detected for Ure2Δ1–93. (D) Purified Ure2p, Ure2Δ3–25 or Ure2Δ1–93 (250 nM) were incubated with or without purified 26S proteasomes (2 nM), as indicated, and in the presence of 2.5 mM ATP. The reaction mixes were incubated at 30°C under mild agitation (<300 rpm). At the indicated time points, aliquots were removed from the reaction mix and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using anti-Ure2p antibodies.

doi:10.1371/journal.pone.0131789.g004

the 26S proteasome. This is supported by the finding that a truncated form of Ure2p lacking its N-terminal domain (Ure2Δ1–93, Fig 4A), used to solve the structure of the compactly folded domain of Ure2p [39], and that is unable to assemble into fibrils (Fig 4B and 4C), fully resists proteasomal degradation (Fig 4D). It should be noted here that a Ure2p variant lacking its prion domain (Ure2Δ2–94) was shown to be unstable *in vivo* [37]. Nor the reasons behind this instability, nor the protease(s) responsible for Ure2Δ2–94 degradation *in vivo* were identified [37]. Therefore, Ure2Δ1–93 (or Ure2Δ2–94) may very well be highly resistant to proteasomal degradation, as shown in Fig 4D, but not to other proteolytic machineries.

To further narrow down the stretch of Ure2p amino acid residues specifically recognized and engaged by the proteasome, we generated a number of deletions within the N-terminal domain of Ure2p and assessed the resistance of the truncated Ure2p to proteasomal degradation. The Ure2p variant bearing the shortest deletion, Ure2Δ3–25 (Fig 4A), that retains assembly propensity (Fig 4B and 4C) fully resisted proteasomal degradation (Fig 4D). This observation suggests that the degron within Ure2p spans at most residues 3–25. This is consistent with previous observations we made indicating that the first 25 residues of soluble Ure2p fall within a region of the PrD readily accessible to proteolytic cleavage and hydrogen/deuterium exchange [25, 40].

Fibrillar Ure2p is not degraded by the proteasome *in vitro*

We previously demonstrated that the 26S proteasome degrades Sup35p fibrils *in vitro*, thereby abolishing their infectivity in protein transformation experiments [32]. To determine whether Ure2p fibrils are degraded by the proteasome, Ure2p fibrils were incubated at 30°C with or without 26S proteasomes in the presence of ATP under mild agitation and aliquots, withdrawn at the indicated time, were immunoblotted using anti-Ure2p antibodies after SDS-PAGE or trapping on cellulose acetate membranes [41]. The results presented in Fig 5A and 5B, clearly indicate that Ure2p fibrils were not degraded by the 26S proteasomes under our experimental conditions as the intensity of Ure2p band on the SDS-PAGE and the filter trap remained unchanged upon incubation for 6h in the presence of 26S proteasomes. To strengthen this observation and rule out possible proteasome-mediated fibrils remodeling, the integrity of preformed fibrils incubated for up to 6h with the 26S proteasomes and ATP at 30°C was assessed by SDD-AGE [32, 42]. Fig 5C shows that the size distribution of Ure2p fibrils is unaffected by their incubation with the 26S proteasome, and that the intensity of the band remained unchanged. We conclude from these observations that the 26S proteasome neither remodels nor degrades preformed Ure2p fibrils. A control reaction ran in parallel, shows that preformed Sup35p fibrils are degraded by the 26S proteasome (Fig 5D), as described previously [32].

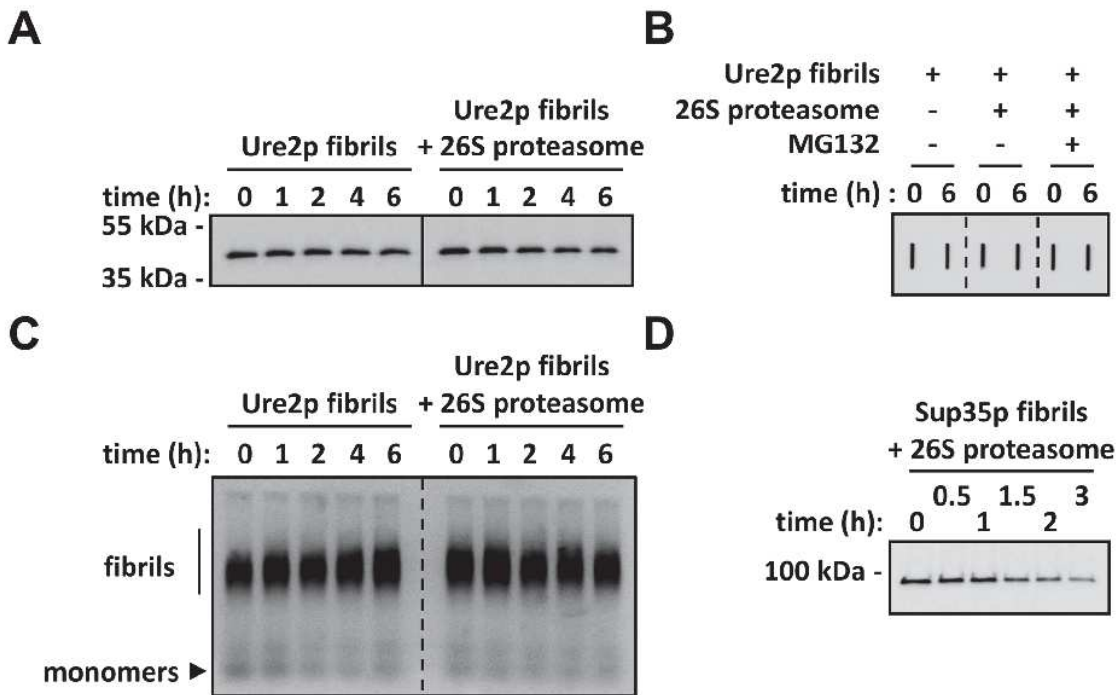


Fig 5. Fibrillar Ure2p is not degraded by the 26S proteasome. (A) Ure2p fibrils (2 µg) were incubated at 30°C under mild agitation (<300 rpm) in the presence of 2.5 mM ATP, with or without 26S proteasomes (1.6 µg), as indicated. Aliquots were removed at time intervals and analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-Ure2p antibodies. (B) Ure2p fibrils were incubated with or without 26S proteasomes and MG132 (100 µM), as indicated in (A). At the indicated time points, aliquots were diluted four-fold in proteasome assay buffer and then filtered through a cellulose acetate membrane (0.2 µm pore size) using a slot-blot vacuum manifold. Each well was then washed twice with 200 µL assay buffer and the membranes were immunostained with anti-Ure2p antibodies. (C) Ure2p fibrils were incubated with or without 26S proteasomes, as indicated in (A). Aliquots were withdrawn at time intervals and analyzed by SDD-AGE followed by immunoblotting with anti-Ure2p antibodies. (D) Sup35p fibrils (1 µg) were mixed with purified 26S proteasomes (0.4 µg) in the presence of 2.5 mM ATP. The reaction mixtures were incubated at 30°C under mild agitation (<300 rpm), and at the indicated time points, aliquots were removed and analyzed by SDS-PAGE followed by Western blotting using anti-Sup35p antibodies.

doi:10.1371/journal.pone.0131789.g005

Discussion

Yeast prions have been proposed to act as protein-only epigenetic elements which increase phenotypic diversity by altering gene expression, thus allowing yeasts to rapidly and transiently adapt to changes in the surrounding environment [1, 31]. Thus, when considering a population of yeast cells, harboring prions can be deemed beneficial as it allows the survival of a subset of individuals from that population in challenging growth conditions. Nonetheless, for individual yeast cells, prions constitute an abnormal situation-akin to degenerative conformational disorders- that needs to be dealt with [9, 31, 43–46]. An arsenal of molecular chaperones controls prion formation and faithful propagation, yet little is known about the proteolytic clearance of the soluble, oligomeric or fibrillar molecular species populated by these prions, specifically by the UPS or autophagy [1, 2, 31]. We previously uncovered a role for the proteasome in the life cycle of [PSI⁺] and demonstrated that the proteasome has the intrinsic ability to degrade the soluble and fibrillar forms of Sup35p [32].

Whether this is a generic property allowing the proteasome to modulate the propagation of other prions or not is an open question. Indeed, yeast cells host prion proteins with unrelated primary structures and cellular functions [1, 2, 31]. Therefore both similar and divergent features between different prions were described at the cellular (*e.g.* mechanisms of *de novo* formation and dependence on molecular chaperones) and molecular (*e.g.* biochemical and structural characteristics of prion high molecular weight assemblies) levels [1, 2, 31]. Thus, the turnover of the various molecular entities populated by different yeast prions may similarly depend upon different mechanisms and cellular factors.

The cellular turnover of Ure2p (Fig 1A and 1B) and Sup35p [32] both depend on the proteasome. As the similarities and differences between Sup35p and Ure2p are well documented, we compared their degradation by the 26S proteasome in a well-defined *in vitro* system. The proteasomal degradation of soluble Sup35p and Ure2p is similar (Fig 2): *i*) their unstructured N-terminal PrDs serve as a molecular tether allowing the proteasome to bind and to sequentially degrade both proteins, and deletion of the PrD results in complete protection against proteasomal action (compare Fig 4 to Fig 4 in [32]); *ii*) the degradation of Ure2p and Sup35p PrDs yields an array of overlapping ~10-30-amino-acid-long peptides with predicted amyloidogenic propensity (compare Fig 3 to Fig 5 in [32]); *iii*) their compactly folded functional domains resist proteasomal degradation (Figs 2 and 4). Interestingly, at least in our experimental conditions, the proteasomal degradation of Sup35p and Ure2p did not require ubiquitination [32]. It should be noted that while we and others could not detect ubiquitinated Sup35p species *in vivo* [32–34, 47], Ure2p was fished out in a proteomic screen for ubiquitinated proteins in yeast [48]. Thus, while ubiquitination may modulate proteasomal degradation of yeast prions *in vivo*, the presence of an unstructured domain, a common feature of most if not all prions, appears, necessary and sufficient to trigger proteasomal degradation [32, 49]. The minimal requirements needed for these unstructured domains to serve as proteasomal degrons remain to be determined, bearing in mind that the flexibility of the PrDs *in vitro* and *in vivo* following interaction with their cognate compactly folded functional domain and/or other cellular partners, may not compare.

Another important observation we made is that while Sup35p fibrils are degraded by the proteasome (Fig 5D) [32], Ure2p fibrils are not (Fig 5A, 5B and 5C). No fully proteasome-resistant fragment is formed upon degradation of Sup35p fibrils, contrary to that of soluble Sup35p [32]. We previously attributed this either to major conformational changes occurring in Sup35p upon assembly and that would be retained upon spontaneous dissociation of Sup35p monomers from the fibril ends, or to the exposure of Sup35p degron to the solvent in the fibrillar form [32]. The finding that Ure2p fully resists degradation in its fibrillar form implies that

its degron is inaccessible within the fibrils in agreement with the observation that Ure2p N-terminal domain has decreased solvent accessibility and susceptibility to protease cleavage [25, 40]. Alternatively, dissociation of monomers from fibril ends—which would render them accessible to the proteasome—may not occur for Ure2p, at least *in vitro*. In agreement with the latter hypothesis is the finding that Ure2p fibrils are more resistant to SDS treatment than Sup35p fibrils (unpublished observations).

The structural variability within prion assemblies in a cellular context is expected to dictate their interaction with proteolytic machineries in general and the proteasome in particular. It will be important for future studies to isolate these species directly from cells and document their biophysical and structural characteristics to gain better insight into the proteolysis of prions.

Materials and Methods

Proteins

Recombinant untagged Ure2p, Ure2 Δ 3–25, Ure2 Δ 1–93 and hexa-histidine tagged Sup35p were overexpressed in *E. coli* strain BL21-CodonPlus and purified according to previously published procedures [4, 5, 39]. The assembly of Sup35p and Ure2p into protein fibrils was performed at 6°C under very mild agitation (<100 rpm) in Assembly Buffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM β -mercaptoethanol, 10 mM MgCl₂, 2 mM EGTA) and Assembly Buffer 2 (20 mM Tris.HCl pH 7.5, 200 mM KCl, 1mM EGTA, 1 mM DTT), respectively, as described previously [4, 5, 32, 39]. Assembly reactions were monitored by thioflavin-T binding [4, 25]. Yeast 26S proteasomes were purified by affinity chromatography as described before [32, 50]. The integrity and activity of the 26S proteasome preparations was assessed as described previously [32].

Cycloheximide-chase experiments

The *URE2* gene was cloned in the pCM252 plasmid [36] to allow its overexpression under the control of a doxycyclin-inducible promoter. The resulting pCM252-*URE2* plasmid was then transformed into the BY251 [*ure-0*] wild-type yeast strain [7]. Cycloheximide-chase experiments were performed as described in [35]. Briefly, cells were grown to mid-log phase in minimal medium containing 0.1% proline as the sole nitrogen source. Cells were adjusted to an OD_{600nm}~0.5 into fresh medium containing 0.003% SDS and 10 μ g.ml⁻¹ doxycyclin. After 3h of incubation at 30°C under agitation, MG132 (50 μ M) or the control buffer DMSO were added. After 30 min of incubation, cycloheximide was added at a final concentration of 100 μ g.ml⁻¹. Aliquots were taken at time intervals, cells were harvested by centrifugation and snap-frozen in liquid nitrogen. Cell extracts were prepared as described previously [32] and analyzed by western blotting using anti-Ure2p antibodies.

Proteasome degradation assays *in vitro*

Proteasome degradation assays *in vitro* were performed in proteasome assay buffer (50 mM Tris.Cl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.1% Tween-20, 2.5 mM ATP, 10% glycerol) essentially as described before [32]. Briefly, the indicated amounts of purified 26S proteasomes and substrates (soluble or fibrillar Ure2p or Sup35p) were mixed in proteasome assay buffer and incubated at 30°C under mild agitation (<300 rpm). When indicated, MG132 was present at a final concentration of 100 μ M. Aliquots were removed at time intervals and analyzed by SDS-PAGE, semi-denaturing detergent gel electrophoresis (SDD-AGE) or filter-trap. For SDS-PAGE, aliquots were mixed with an equal volume of 2X urea sample buffer (125 mM

Tris-Cl pH 6.8, 8 M urea, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) [32] and heated at 90°C for 5 min. For SDD-AGE analysis, aliquots were mixed with an equal volume of 2X SDD-AGE sample buffer (1X Tris-Acetate-EDTA (TAE), 10% glycerol, 4% SDS, 0.025% bromophenol blue), incubated for 15 min at room temperature, and then separated on 1.5% agarose gels in 1X TAE buffer containing 0.1% SDS. Proteins were then blotted onto nitrocellulose membranes by capillary transfer in Tris-buffered saline (TBS). For filter-trap assays, reactions were diluted four-fold in proteasome assay buffer and then filtered through cellulose acetate membranes (0.2 μ m pore size) using a slot-blot vacuum manifold. Membrane wells were then washed twice with 200 μ L proteasome assay buffer. In all cases, membranes were analyzed by Western blot using anti-Sup35p or anti-Ure2p antibodies.

Electron microscopy

Samples were stained with 1% uranyl acetate on carbon-coated grids and imaged in a Jeol 1400 transmission electron microscope. Images were recorded with a Gatan Orius CCD camera (Gatan, Pleasanton, CA) and processed with the ImageJ software (NIH).

Identification of Ure2p degradation products by mass spectrometry

Purified Ure2p (1 μ g) was incubated with or without 26S proteasome (0.4 μ g) in proteasome assay buffer at 30°C under mild agitation (<300 rpm) for 1, 2 or 3 hours. To identify the peptides generated at each time point, 80 μ L of each reaction were cleared by centrifugation at 15000 x g for 10 min, desalted and concentrated on a ZIP-TIP C18 (Millipore), and then eluted in 5 μ L 20% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid. The final volume was brought to 20 μ L with 0.1% trifluoroacetic acid. Peptides (10 μ L) were separated and identified by nanoLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry as described previously [32].

Supporting Information

S1 Table. List of peptides generated upon soluble Ure2p degradation by the 26S proteasome and identified by nanoLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry. The position and sequence of each peptide within the primary sequence of Ure2p are indicated, as well as the mass to charge ratio of the peptide that has been fragmented during the nanoLC-MS/MS analysis, the experimental mass (M_{exp}), the theoretical mass (M_{theor}), the mass deviation between the experimental and the theoretical mass (ΔM in ppm) and the mascot ion score for the MS/MS match (score).
(PDF)

Acknowledgments

We thank Reed B. Wickner for providing the BY251 strain. We thank Luc Bousset for providing Ure2p expression plasmids and for helpful discussions. This work benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit, which is supported by the Conseil Général de l'Essonne, France-Bioimaging infrastructure, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR), and from the facility 'Identification and Characterization of Proteins by Mass Spectrometry' (SICaPS) of the Gif campus.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MK RM. Performed the experiments: KW VR MK. Analyzed the data: KW VR MK RM. Contributed reagents/materials/analysis tools: KM. Wrote the paper: MK RM.

References

1. Kabani M, Melki R. Yeast prions assembly and propagation: contributions of the prion and non-prion moieties and the nature of assemblies. *Prion*. 2011; 5(4):277–84. doi: [10.4161/pri.18070](https://doi.org/10.4161/pri.18070) PMID: [22052349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22052349/); PubMed Central PMCID: PMC4012403.
2. Liebman SW, Chernoff YO. Prions in yeast. *Genetics*. 2012; 191(4):1041–72. Epub 2012/08/11. doi: [10.1534/genetics.111.137760](https://doi.org/10.1534/genetics.111.137760) PMID: [22879407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22879407/); PubMed Central PMCID: PMC3415993.
3. Glover JR, Kowal AS, Schirmer EC, Patino MM, Liu JJ, Lindquist S. Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell*. 1997; 89(5):811–9. Epub 1997/05/30. S0092-8674(00)80264-0 [pii]. PMID: [9182769](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9182769/).
4. Krzewska J, Melki R. Molecular chaperones and the assembly of the prion Sup35p, an in vitro study. *EMBO J*. 2006; 25(4):822–33. doi: [10.1038/sj.emboj.7600985](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600985) PMID: [16467849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16467849/); PubMed Central PMCID: PMC1383566.
5. Thual C, Komar AA, Bousset L, Fernandez-Bellot E, Cullin C, Melki R. Structural characterization of *Saccharomyces cerevisiae* prion-like protein Ure2. *J Biol Chem*. 1999; 274(19):13666–74. Epub 1999/05/01. PMID: [10224139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10224139/).
6. Taylor KL, Cheng N, Williams RW, Steven AC, Wickner RB. Prion domain initiation of amyloid formation in vitro from native Ure2p. *Science*. 1999; 283(5406):1339–43. Epub 1999/02/26. PMID: [10037606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10037606/).
7. Brachmann A, Baxa U, Wickner RB. Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. *EMBO J*. 2005; 24(17):3082–92. Epub 2005/08/13. doi: [10.1038/sj.emboj.7600772](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600772) PMID: [16096644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16096644/); PubMed Central PMCID: PMC1201353.
8. Habenstein B, Bousset L, Sourigues Y, Kabani M, Loquet A, Meier BH, et al. A native-like conformation for the C-terminal domain of the prion Ure2p within its fibrillar form. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012; 51(32):7963–6. Epub 2012/07/05. doi: [10.1002/anie.201202093](https://doi.org/10.1002/anie.201202093) PMID: [22760922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22760922/).
9. Kabani M, Cosnier B, Bousset L, Rousset JP, Melki R, Fabret C. A mutation within the C-terminal domain of Sup35p that affects [PSI⁺] prion propagation. *Mol Microbiol*. 2011; 81(3):640–58. Epub 2011/06/03. doi: [10.1111/j.1365-2958.2011.07719.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07719.x) PMID: [21631606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21631606/).
10. King CY, Diaz-Avalos R. Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature*. 2004; 428(6980):319–23. doi: [10.1038/nature02391](https://doi.org/10.1038/nature02391) PMID: [15029195](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15029195/).
11. Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature*. 2004; 428(6980):323–8. doi: [10.1038/nature02392](https://doi.org/10.1038/nature02392) PMID: [15029196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15029196/).
12. Derkatch IL, Chernoff YO, Kushnirov VV, Inge-Vechtormov SG, Liebman SW. Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1996; 144(4):1375–86. Epub 1996/12/01. PMID: [8978027](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8978027/); PubMed Central PMCID: PMC1207691.
13. Frederick KK, Debelouchina GT, Kayatekin C, Dorminy T, Jacavone AC, Griffin RG, et al. Distinct prion strains are defined by amyloid core structure and chaperone binding site dynamics. *Chem Biol*. 2014; 21(2):295–305. doi: [10.1016/j.chembiol.2013.12.013](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.013) PMID: [24485763](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24485763/); PubMed Central PMCID: PMC4030713.
14. Krishnan R, Lindquist SL. Structural insights into a yeast prion illuminate nucleation and strain diversity. *Nature*. 2005; 435(7043):765–72. Epub 2005/06/10. doi: [10.1038/nature03679](https://doi.org/10.1038/nature03679) PMID: [15944694](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15944694/); PubMed Central PMCID: PMC1405905.
15. Schlumpberger M, Prusiner SB, Herskowitz I. Induction of distinct [URE3] yeast prion strains. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(20):7035–46. Epub 2001/09/21. doi: [10.1128/MCB.21.20.7035-7046.2001](https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.7035-7046.2001) PMID: [11564886](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11564886/); PubMed Central PMCID: PMC99879.
16. Tanaka M, Collins SR, Toyama BH, Weissman JS. The physical basis of how prion conformations determine strain phenotypes. *Nature*. 2006; 442(7102):585–9. Epub 2006/07/01. doi: [10.1038/nature04922](https://doi.org/10.1038/nature04922) PMID: [16810177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16810177/).
17. Toyama BH, Kelly MJ, Gross JD, Weissman JS. The structural basis of yeast prion strain variants. *Nature*. 2007; 449(7159):233–7. Epub 2007/09/04. doi: [10.1038/nature06108](https://doi.org/10.1038/nature06108) PMID: [17767153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17767153/).
18. Uptain SM, Sawicki GJ, Caughey B, Lindquist S. Strains of [PSI(+)] are distinguished by their efficiencies of prion-mediated conformational conversion. *EMBO J*. 2001; 20(22):6236–45. Epub 2001/11/15. doi: [10.1093/emboj/20.22.6236](https://doi.org/10.1093/emboj/20.22.6236) PMID: [11707395](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11707395/); PubMed Central PMCID: PMC125732.
19. Luckgei N, Schutz AK, Bousset L, Habenstein B, Sourigues Y, Gardiennet C, et al. The conformation of the prion domain of Sup35p in isolation and in the full-length protein. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2013; 52(48):12741–4. doi: [10.1002/anie.201304699](https://doi.org/10.1002/anie.201304699) PMID: [24123863](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24123863/).
20. Luckgei N, Schutz AK, Habenstein B, Bousset L, Sourigues Y, Melki R, et al. Solid-state NMR sequential assignments of the amyloid core of Sup35pNM. *Biomolecular NMR assignments*. 2014; 8(2):365–70. doi: [10.1007/s12104-013-9518-y](https://doi.org/10.1007/s12104-013-9518-y) PMID: [23934139](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23934139/).

21. Schutz AK, Habenstein B, Luckgei N, Bousset L, Sourigues Y, Nielsen AB, et al. Solid-state NMR sequential assignments of the amyloid core of full-length Sup35p. *Biomolecular NMR assignments*. 2014; 8(2):349–56. doi: [10.1007/s12104-013-9515-1](https://doi.org/10.1007/s12104-013-9515-1) PMID: [23943018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23943018/).
22. Baxa U, Keller PW, Cheng N, Wall JS, Steven AC. In Sup35p filaments (the [PSI⁺] prion), the globular C-terminal domains are widely offset from the amyloid fibril backbone. *Mol Microbiol*. 2011; 79(2):523–32. Epub 2011/01/12. doi: [10.1111/j.1365-2958.2010.07466.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07466.x) PMID: [21219467](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21219467/); PubMed Central PMCID: [PMC3079393](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3079393/).
23. Shewmaker F, Wickner RB, Tycko R. Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel beta-sheet structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(52):19754–9. Epub 2006/12/16. doi: [10.1073/pnas.0609638103](https://doi.org/10.1073/pnas.0609638103) PMID: [17170131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17170131/); PubMed Central PMCID: [PMC1750918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1750918/).
24. Bousset L, Thomson NH, Radford SE, Melki R. The yeast prion Ure2p retains its native alpha-helical conformation upon assembly into protein fibrils in vitro. *EMBO J*. 2002; 21(12):2903–11. Epub 2002/06/18. doi: [10.1093/emboj/cdf303](https://doi.org/10.1093/emboj/cdf303) PMID: [12065404](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12065404/); PubMed Central PMCID: [PMC126058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC126058/).
25. Bousset L, Redeker V, Decottignies P, Dubois S, Le Marechal P, Melki R. Structural characterization of the fibrillar form of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* prion Ure2p. *Biochemistry*. 2004; 43(17):5022–32. Epub 2004/04/28. doi: [10.1021/bi049828e](https://doi.org/10.1021/bi049828e) PMID: [15109261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15109261/).
26. Fay N, Redeker V, Savistchenko J, Dubois S, Bousset L, Melki R. Structure of the prion Ure2p in protein fibrils assembled in vitro. *J Biol Chem*. 2005; 280(44):37149–58. Epub 2005/09/01. doi: [10.1074/jbc.M506917200](https://doi.org/10.1074/jbc.M506917200) PMID: [16131495](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16131495/).
27. Ranson N, Stromer T, Bousset L, Melki R, Serpell LC. Insights into the architecture of the Ure2p yeast protein assemblies from helical twisted fibrils. *Protein Sci*. 2006; 15(11):2481–7. Epub 2006/09/27. doi: [10.1110/ps.062215206](https://doi.org/10.1110/ps.062215206) PMID: [17001037](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17001037/); PubMed Central PMCID: [PMC2242408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2242408/).
28. Bousset L, Bonnefoy J, Sourigues Y, Wien F, Melki R. Structure and assembly properties of the N-terminal domain of the prion Ure2p in isolation and in its natural context. *PLoS One*. 2010; 5(3):e9760. Epub 2010/03/27. doi: [10.1371/journal.pone.0009760](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009760) PMID: [20339590](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20339590/); PubMed Central PMCID: [PMC2842292](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2842292/).
29. Loquet A, Bousset L, Gardiennet C, Sourigues Y, Wasmer C, Habenstein B, et al. Prion fibrils of Ure2p assembled under physiological conditions contain highly ordered, natively folded modules. *J Mol Biol*. 2009; 394(1):108–18. Epub 2009/09/15. doi: [10.1016/j.jmb.2009.09.016](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.016) PMID: [19748512](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19748512/).
30. Krzewska J, Tanaka M, Burston SG, Melki R. Biochemical and functional analysis of the assembly of full-length Sup35p and its prion-forming domain. *J Biol Chem*. 2007; 282(3):1679–86. Epub 2006/11/24. doi: [10.1074/jbc.M608110200](https://doi.org/10.1074/jbc.M608110200) PMID: [17121860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17121860/).
31. Chernova TA, Wilkinson KD, Chernoff YO. Physiological and environmental control of yeast prions. *FEMS microbiology reviews*. 2014; 38(2):326–44. doi: [10.1111/1574-6976.12053](https://doi.org/10.1111/1574-6976.12053) PMID: [24236638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24236638/); PubMed Central PMCID: [PMC3951574](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3951574/).
32. Kabani M, Redeker V, Melki R. A role for the proteasome in the turnover of Sup35p and in [PSI⁺] prion propagation. *Mol Microbiol*. 2014; 92(3):507–28. doi: [10.1111/mmi.12572](https://doi.org/10.1111/mmi.12572) PMID: [24589377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24589377/).
33. Allen KD, Chernova TA, Tennant EP, Wilkinson KD, Chernoff YO. Effects of ubiquitin system alterations on the formation and loss of a yeast prion. *J Biol Chem*. 2007; 282(5):3004–13. Epub 2006/12/05. doi: [10.1074/jbc.M609597200](https://doi.org/10.1074/jbc.M609597200) PMID: [17142456](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17142456/).
34. Chernova TA, Allen KD, Wesoloski LM, Shanks JR, Chernoff YO, Wilkinson KD. Pleiotropic effects of Ubp6 loss on drug sensitivities and yeast prion are due to depletion of the free ubiquitin pool. *J Biol Chem*. 2003; 278(52):52102–15. Epub 2003/10/16. doi: [10.1074/jbc.M310283200](https://doi.org/10.1074/jbc.M310283200) PMID: [14559899](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14559899/).
35. Liu C, Apodaca J, Davis LE, Rao H. Proteasome inhibition in wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechniques*. 2007; 42(2):158, 60, 62. Epub 2007/03/22. 000112389 [pii]. PMID: [17373478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17373478/).
36. Belli G, Gari E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E. An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(4):942–7. PMID: [9461451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9461451/); PubMed Central PMCID: [PMC147371](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC147371/).
37. Shewmaker F, Mull L, Nakayashiki T, Masison DC, Wickner RB. Ure2p function is enhanced by its prion domain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2007; 176(3):1557–65. Epub 2007/05/18. genetics.107.074153 [pii] doi: [10.1534/genetics.107.074153](https://doi.org/10.1534/genetics.107.074153) PMID: [17507672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17507672/); PubMed Central PMCID: [PMC1931552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1931552/).
38. Bousset L, Belrhali H, Janin J, Melki R, Morera S. Structure of the globular region of the prion protein Ure2 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Structure*. 2001; 9(1):39–46. Epub 2001/05/09. S0969212600005530 [pii]. PMID: [11342133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11342133/).
39. Thual C, Bousset L, Komar AA, Walter S, Buchner J, Cullin C, et al. Stability, folding, dimerization, and assembly properties of the yeast prion Ure2p. *Biochemistry*. 2001; 40(6):1764–73. Epub 2001/05/01. bi001916l [pii]. PMID: [11327838](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11327838/).

40. Redeker V, Halgand F, Le Caer JP, Bousset L, Laprevote O, Melki R. Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometric analysis of conformational changes accompanying the assembly of the yeast prion Ure2p into protein fibrils. *J Mol Biol.* 2007; 369(4):1113–25. Epub 2007/05/08. doi: [10.1016/j.jmb.2007.04.018](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.04.018) PMID: [17482207](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17482207/).
41. Wanker EE, Scherzinger E, Heiser V, Sittler A, Eickhoff H, Lehrach H. Membrane filter assay for detection of amyloid-like polyglutamine-containing protein aggregates. *Methods Enzymol.* 1999; 309:375–86. PMID: [10507036](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10507036/).
42. Kryndushkin DS, Alexandrov IM, Ter-Avanesyan MD, Kushnirov VV. Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *J Biol Chem.* 2003; 278(49):49636–43. doi: [10.1074/jbc.M307996200](https://doi.org/10.1074/jbc.M307996200) PMID: [14507919](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14507919/).
43. McGlinchey RP, Kryndushkin D, Wickner RB. Suicidal [PSI⁺] is a lethal yeast prion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(13):5337–41. Epub 2011/03/16. doi: [10.1073/pnas.1102762108](https://doi.org/10.1073/pnas.1102762108) PMID: [21402947](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21402947/); PubMed Central PMCID: [PMC3069153](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3069153/).
44. Pezza JA, Villali J, Sindi SS, Serio TR. Amyloid-associated activity contributes to the severity and toxicity of a prion phenotype. *Nat Commun.* 2014; 5:4384. doi: [10.1038/ncomms5384](https://doi.org/10.1038/ncomms5384) PMID: [25023996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25023996/); PubMed Central PMCID: [PMC4156856](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4156856/).
45. Vishveshwara N, Bradley ME, Liebman SW. Sequestration of essential proteins causes prion associated toxicity in yeast. *Mol Microbiol.* 2009; 73(6):1101–14. Epub 2009/08/18. doi: [10.1111/j.1365-2958.2009.06836.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06836.x) PMID: [19682262](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19682262/); PubMed Central PMCID: [PMC2757070](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2757070/).
46. Wickner RB, Edskes HK, Bateman D, Kelly AC, Gorkovskiy A. The yeast prions [PSI⁺] and [URE3] are molecular degenerative diseases. *Prion.* 2011; 5(4):258–62. Epub 2011/11/05. doi: [10.4161/pri.17748](https://doi.org/10.4161/pri.17748) PMID: [22052353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22052353/); PubMed Central PMCID: [PMC4012404](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4012404/).
47. Tank EM, True HL. Disease-associated mutant ubiquitin causes proteasomal impairment and enhances the toxicity of protein aggregates. *PLoS Genet.* 2009; 5(2):e1000382. Epub 2009/02/14. doi: [10.1371/journal.pgen.1000382](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000382) PMID: [19214209](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19214209/); PubMed Central PMCID: [PMC2633047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2633047/).
48. Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, et al. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol.* 2003; 21(8):921–6. doi: [10.1038/nbt849](https://doi.org/10.1038/nbt849) PMID: [12872131](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12872131/).
49. Baugh JM, Viktorova EG, Pilipenko EV. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol.* 2009; 386(3):814–27. Epub 2009/01/24. doi: [10.1016/j.jmb.2008.12.081](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.081) PMID: [19162040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19162040/); PubMed Central PMCID: [PMC2649715](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2649715/).
50. Leggett DS, Glickman MH, Finley D. Purification of proteasomes, proteasome subcomplexes, and proteasome-associated proteins from budding yeast. *Methods Mol Biol.* 2005; 301:57–70. Epub 2005/05/27. doi: [10.1385/1-59259-895-1-057](https://doi.org/10.1385/1-59259-895-1-057) PMID: [15917626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15917626/).

S1 Table: List of peptides generated upon soluble Ure2p degradation by the 26S proteasome after 1, 2 or 3 hours of incubation and identified by nanoLC-LTQ-Orbitrap mass spectrometry.

The position and sequence of each peptide within the primary sequence of Ure2p are indicated, as well as the mass to charge ratio of the peptide that has been fragmented during the nanoLC-MS/MS analysis, the experimental mass (M_{exp}), the theoretical mass (M_{theor}), the mass deviation between the experimental and the theoretical mass (ΔM in ppm) and the mascot ion score for the MS/MS match (score).

soluble Ure2p + 26S / t 1 h							
Start	End	Peptide sequence	m/z	M exp	M theor	ΔM (ppm)	score
1	12	MMNNNGNQVSNL	668,2929	1334,5713	1334,5707	0,43	57
1	13	MMNNNGNQVSNLS	711,8073	1421,6001	1421,6027	-1,87	51
1	14	MMNNNGNQVSNLSN	768,83	1535,6454	1535,6456	-0,18	52
1	15	MMNNNGNQVSNLSNA	804,3486	1606,6827	1606,6828	-0,029	48
1	16	MMNNNGNQVSNLSNAL	860,8917	1719,7689	1719,7668	1,21	43
1	17	MMNNNGNQVSNLSNALR	946,9383	1891,862	1891,8628	-0,43	50
2	12	MNNNGNQVSNL	610,7698	1219,525	1219,5251	-0,1	53
2	14	MNNNGNQVSNLSN	703,3101	1404,6056	1404,6052	0,29	65
2	15	MNNNGNQVSNLSNA	738,8284	1475,6422	1475,6423	-0,058	42
3	12	NNNGNQVSNL	537,2521	1072,4896	1072,4897	-0,13	32
3	16	NNNGNQVSNLSNAL	729,8504	1457,6862	1457,6859	0,27	50
3	17	NNNGNQVSNLSNALR	807,9005	1613,7865	1613,787	-0,3	63
4	16	NNGNQVSNLSNAL	672,8285	1343,6425	1343,6429	-0,28	30
5	16	NGNQVSNLSNAL	615,807	1229,5995	1229,6	-0,44	35
5	17	NGNQVSNLSNALR	693,8576	1385,7006	1385,7011	-0,33	47
6	16	GNQVSNLSNAL	558,7854	1115,5562	1115,5571	-0,75	43
6	17	GNQVSNLSNALR	636,8367	1271,6589	1271,6582	0,57	26
10	17	SNLSNALR	437,7406	873,4666	873,4668	-0,17	49
10	18	SNLSNALRQ	501,77	1001,5254	1001,5254	0,053	41
10	19	SNLSNALRQV	551,3039	1100,5933	1100,5938	-0,41	70
11	19	NLSNALRQV	507,788	1013,5615	1013,5618	-0,28	38
12	19	LSNALRQV	450,7667	899,5188	899,5188	-0,086	48
13	21	SNALRQVNI	507,7881	1013,5616	1013,5618	-0,2	40
13	23	SNALRQVNIGN	593,3202	1184,6259	1184,6262	-0,18	39
13	24	SNALRQVNIGNR	447,9163	1340,7271	1340,7273	-0,098	36
13	25	SNALRQVNIGNRNR	728,3918	1454,769	1454,7702	-0,81	54
13	26	SNALRQVNIGNRNS	514,9415	1541,8026	1541,8022	0,24	28
13	27	SNALRQVNIGNRNSN	552,9555	1655,8447	1655,8451	-0,28	41
13	29	SNALRQVNIGNRNSNTT	620,32	1857,9382	1857,9405	-1,24	31
13	31	SNALRQVNIGNRNSNTTDD	692,3455	2074,0147	2074,0151	-0,2	27
13	32	SNALRQVNIGNRNSNTTDDQ	735,0314	2202,0723	2202,0737	-0,65	29

15	21	ALRQVNI	407,2501	812,4857	812,4868	-1,39	27
18	31	QVNIGNRNSNTTDD	767,3661	1532,7177	1532,7179	-0,11	37
18	32	QVNIGNRNSNTTDDQ	831,3951	1660,7756	1660,7765	-0,53	61
18	33	QVNIGNRNSNTTDDQS	874,9111	1747,8077	1747,8085	-0,46	56
20	31	NIGNRNSNTTDD	653,8024	1305,5902	1305,5909	-0,55	31
20	32	NIGNRNSNTTDDQ	717,8319	1433,6491	1433,6495	-0,24	57
20	35	NIGNRNSNTTDDQSN	874,9111	1747,8076	1747,8085	-0,52	58
22	37	GNRNSNTTDDQSNINF	891,9037	1781,7929	1781,7929	0,048	62
25	37	NSNTTDDQSNINF	728,3208	1454,627	1454,6274	-0,22	38
25	38	NSNTTDDQSNINFE	792,8422	1583,6698	1583,67	-0,12	36
26	37	SNTTDDQSNINF	671,2994	1340,5843	1340,5844	-0,085	52
26	38	SNTTDDQSNINFE	735,8206	1469,6267	1469,627	-0,23	42
27	38	NTTDDQSNINFE	692,3048	1382,5949	1382,595	-0,038	37
28	37	TTTDDQSNINF	570,7619	1139,5092	1139,5095	-0,21	44
28	38	TTTDDQSNINFE	635,2832	1268,5518	1268,5521	-0,18	35
38	50	EFSTGVNNNNNNN	719,3023	1436,5901	1436,5916	-1,09	29
38	54	EFSTGVNNNNNNNSSN	906,8721	1811,7296	1811,7306	-0,58	43
38	61	EFSTGVNNNNNNNSSNNNNVQNN	870,6981	2609,0724	2609,0723	0,039	32
38	62	EFSTGVNNNNNNNSSNNNNVQNNN	908,7117	2723,1132	2723,1152	-0,73	26
39	61	FSTGVNNNNNNNSSNNNNVQNN	827,6832	2480,0277	2480,0297	-0,8	38
71	81	NDNENNIKNTL	644,8104	1287,6063	1287,6055	0,64	32
73	81	NENNIKNTL	530,2749	1058,5352	1058,5356	-0,33	39
73	82	NENNIKNTLE	594,7961	1187,5777	1187,5782	-0,39	51
73	83	NENNIKNTLEQ	658,8254	1315,6363	1315,6368	-0,33	47
73	84	NENNIKNTLEQH	485,2395	1452,6966	1452,6957	0,62	41
95	103	SHVEYSRIT	546,2776	1090,5406	1090,5407	-0,075	25
97	103	VEYSRIT	434,2321	866,4496	866,4498	-0,23	26
soluble Ure2p + 26S / t 2 h							
Start	End	Peptide sequence	m/z	M exp	M theor	ΔM (ppm)	score
1	12	MMNNNGNQVSNL	668,2926	1334,5706	1334,5707	-0,034	61
1	13	MMNNNGNQVSNLS	711,8084	1421,6023	1421,6027	-0,32	57
1	14	MMNNNGNQVSNLSN	768,8299	1535,6452	1535,6456	-0,27	42
1	15	MMNNNGNQVSNLSNA	804,3484	1606,6823	1606,6828	-0,25	43
1	15	MMNNNGNQVSNLSNA	812,3463	1622,6779	1622,6777	0,17	57
1	16	MMNNNGNQVSNLSNAL	868,8879	1735,7612	1735,7617	-0,3	65
1	17	MMNNNGNQVSNLSNALR	946,9382	1891,8619	1891,8628	-0,49	77
2	12	MNNNGNQVSNL	602,7724	1203,5302	1203,5302	0,03	58
2	14	MNNNGNQVSNLSN	703,3093	1404,604	1404,6052	-0,85	43
2	15	MNNNGNQVSNLSNA	738,8283	1475,6421	1475,6423	-0,14	59
2	16	MNNNGNQVSNLSNAL	795,3697	1588,7248	1588,7263	-0,95	53
2	17	MNNNGNQVSNLSNALR	881,4187	1760,8228	1760,8224	0,28	75
3	12	NNNGNQVSNL	537,2521	1072,4897	1072,4897	-0,0028	30
3	15	NNNGNQVSNLSNA	673,3079	1344,6013	1344,6018	-0,37	39
3	16	NNNGNQVSNLSNAL	729,8499	1457,6853	1457,6859	-0,4	50

3	17	NNNGNQVSNLSNALR	807,9003	1613,786	1613,787	-0,6	94
4	16	NNGNQVSNLSNAL	672,8292	1343,6439	1343,6429	0,71	44
4	17	NNGNQVSNLSNALR	750,8787	1499,7429	1499,744	-0,76	75
6	16	GNQVSNLSNAL	558,7857	1115,5569	1115,5571	-0,19	54
6	17	GNQVSNLSNALR	636,8365	1271,6584	1271,6582	0,19	52
8	17	QVSNLSNALR	551,3045	1100,5944	1100,5938	0,59	43
10	17	SNLSNALR	437,7406	873,4666	873,4668	-0,24	56
10	18	SNLSNALRQ	501,77	1001,5254	1001,5254	0,053	41
10	19	SNLSNALRQV	551,3041	1100,5936	1100,5938	-0,17	64
11	19	NLSNALRQV	507,7879	1013,5612	1013,5618	-0,57	43
12	19	LSNALRQV	450,7665	899,5185	899,5188	-0,35	46
13	21	SNALRQVNI	507,7881	1013,5617	1013,5618	-0,079	40
13	23	SNALRQVNIGN	593,3204	1184,6263	1184,6262	0,12	45
13	24	SNALRQVNIGNR	671,3707	1340,7268	1340,7273	-0,36	44
13	25	SNALRQVNIGNRNR	728,392	1454,7695	1454,7702	-0,47	48
13	27	SNALRQVNIGNRNSN	552,9556	1655,8449	1655,8451	-0,16	58
13	28	SNALRQVNIGNRNSNT	586,6379	1756,892	1756,8928	-0,47	28
13	29	SNALRQVNIGNRNSNTT	929,9778	1857,941	1857,9405	0,27	32
13	31	SNALRQVNIGNRNSNTTTD	692,3459	2074,0158	2074,0151	0,34	43
13	32	SNALRQVNIGNRNSNTTTDQ	735,0313	2202,0721	2202,0737	-0,73	45
15	21	ALRQVNI	407,2505	812,4865	812,4868	-0,33	27
16	31	LRQVNIGNRNSNTTTD	601,6416	1801,903	1801,9031	-0,058	33
16	32	LRQVNIGNRNSNTTTDQ	644,3274	1929,9603	1929,9617	-0,68	40
18	31	QVNIGNRNSNTTTD	767,3658	1532,7171	1532,7179	-0,51	47
18	32	QVNIGNRNSNTTTDQ	831,3949	1660,7752	1660,7765	-0,75	64
18	33	QVNIGNRNSNTTTDQS	874,9111	1747,8076	1747,8085	-0,53	54
20	31	NIGNRNSNTTTD	653,8029	1305,5912	1305,5909	0,2	28
20	32	NIGNRNSNTTTDQ	717,8319	1433,6493	1433,6495	-0,15	27
20	35	NIGNRNSNTTTDQSN	874,9109	1747,8072	1747,8085	-0,73	49
20	36	NIGNRNSNTTTDQSNIN	931,9327	1861,8509	1861,8514	-0,27	35
20	37	NIGNRNSNTTTDQSNINF	1005,4679	2008,9212	2008,9198	0,7	56
20	38	NIGNRNSNTTTDQSNINFE	1069,9877	2137,9608	2137,9624	-0,77	30
22	37	GNRNSNTTTDQSNINF	891,9037	1781,7928	1781,7929	-0,019	69
24	37	RNSNTTTDQSNINF	806,3713	1610,7281	1610,7285	-0,21	47
25	37	NSNTTTDQSNINF	728,3209	1454,6273	1454,6274	-0,053	46
25	38	NSNTTTDQSNINFE	792,842	1583,6695	1583,67	-0,27	66
26	37	SNTTTDQSNINF	671,2994	1340,5842	1340,5844	-0,17	55
26	38	SNTTTDQSNINFE	735,8206	1469,6267	1469,627	-0,23	55
27	37	NTTTDQSNINF	627,7833	1253,5521	1253,5524	-0,26	34
27	38	NTTTDQSNINFE	692,3044	1382,5942	1382,595	-0,57	38
28	37	TTTDQSNINF	570,7617	1139,5089	1139,5095	-0,53	41
28	38	TTTDQSNINFE	635,2835	1268,5525	1268,5521	0,31	32
29	37	TTDQSNINF	520,238	1038,4615	1038,4618	-0,27	36

30	38	TDQSNINFE	534,236	1066,4574	1066,4567	0,62	26
32	39	QSNINFEF	499,7326	997,4506	997,4505	0,15	29
38	52	EFSTGVNNNNNNSS	806,3348	1610,655	1610,6557	-0,42	27
38	54	EFSTGVNNNNNNSSSN	906,8724	1811,7302	1811,7306	-0,24	60
38	61	EFSTGVNNNNNNSSSNNNNVQNN	870,6977	2609,0712	2609,0723	-0,39	33
38	62	EFSTGVNNNNNNSSSNNNNVQNNN	908,7125	2723,1156	2723,1152	0,14	30
39	61	FSTGVNNNNNNSSSNNNNVQNN	827,6826	2480,0259	2480,0297	-1,54	42
43	78	VNNNNNNSSSNNNNVQNNNSGRNGSQNNNDNENNIK	1315,566	3943,6763	3943,6758	0,14	30
62	81	NSGRNGSQNNNDNENNIKNTL	735,0074	2202,0003	2202,0009	-0,27	27
71	82	NDNENNIKNTLE	709,3321	1416,6496	1416,6481	1,11	26
73	81	NENNIKNTL	530,2751	1058,5356	1058,5356	0,027	32
73	82	NENNIKNTLE	594,7961	1187,5777	1187,5782	-0,39	44
73	83	NENNIKNTLEQ	658,8257	1315,6369	1315,6368	0,12	58
73	84	NENNIKNTLEQH	727,355	1452,6954	1452,6957	-0,19	57
73	87	NENNIKNTLEQHRQQ	622,6446	1864,9121	1864,9139	-0,97	47
73	89	NENNIKNTLEQHRQQQQ	708,0168	2121,0287	2121,0311	-1,12	30
95	103	SHVEYSRIT	546,2774	1090,5402	1090,5407	-0,42	31
soluble Ure2p + 26S / t 3 h							
Start	End	Peptide sequence	m/z	M exp	M theor	ΔM (ppm)	score
1	12	MMNNGNQVSNL	668,2924	1334,5703	1334,5707	-0,3	65
1	13	MMNNGNQVSNLS	711,8083	1421,602	1421,6027	-0,49	54
1	14	MMNNGNQVSNLSN	768,8297	1535,6447	1535,6456	-0,58	55
1	15	MMNNGNQVSNLSNA	804,3483	1606,6821	1606,6828	-0,4	59
1	16	MMNNGNQVSNLSNAL	860,891	1719,7674	1719,7668	0,36	68
1	17	MMNNGNQVSNLSNALR	946,9387	1891,8628	1891,8628	-0,038	72
2	12	MNNGNQVSNL	610,7697	1219,5249	1219,5251	-0,22	52
2	13	MNNGNQVSNLS	646,2884	1290,5622	1290,5622	-0,01	41
2	14	MNNGNQVSNLSN	703,3098	1404,6051	1404,6052	-0,068	41
2	15	MNNGNQVSNLSNA	738,8287	1475,6429	1475,6423	0,44	45
2	16	MNNGNQVSNLSNAL	795,3709	1588,7273	1588,7263	0,59	33
2	17	MNNGNQVSNLSNALR	881,4177	1760,8208	1760,8224	-0,9	53
3	12	NNNGNQVSNL	537,252	1072,4895	1072,4897	-0,25	34
3	15	NNNGNQVSNLSNA	673,3075	1344,6004	1344,6018	-1,01	62
3	16	NNNGNQVSNLSNAL	729,8502	1457,6858	1457,6859	-0,058	49
3	17	NNNGNQVSNLSNALR	807,9006	1613,7867	1613,787	-0,15	104
4	12	NNGNQVSNL	480,2306	958,4466	958,4468	-0,25	32
4	16	NNGNQVSNLSNAL	672,8286	1343,6427	1343,6429	-0,19	34
4	17	NNGNQVSNLSNALR	750,8794	1499,7442	1499,744	0,13	88
5	16	NGNQVSNLSNAL	615,807	1229,5995	1229,6	-0,44	45
5	17	NGNQVSNLSNALR	693,8575	1385,7005	1385,7011	-0,42	64
6	16	GNQVSNLSNAL	558,7856	1115,5567	1115,5571	-0,32	59
6	17	GNQVSNLSNALR	636,8359	1271,6573	1271,6582	-0,68	48
8	17	QVSNLSNALR	551,304	1100,5935	1100,5938	-0,28	44
10	17	SNLSNALR	437,7405	873,4665	873,4668	-0,38	46

10	18	SNLSNALRQ	501,77	1001,5255	1001,5254	0,11	45
10	19	SNLSNALRQV	551,304	1100,5935	1100,5938	-0,28	76
11	19	NLSNALRQV	507,7881	1013,5616	1013,5618	-0,2	46
12	19	LSNALRQV	450,7668	899,519	899,5188	0,18	45
13	21	SNALRQVNI	507,7881	1013,5617	1013,5618	-0,02	40
13	22	SNALRQVNIG	536,2988	1070,5831	1070,5832	-0,12	30
13	23	SNALRQVNIGN	593,3204	1184,6262	1184,6262	0,024	45
13	24	SNALRQVNIGNR	671,3709	1340,7273	1340,7273	0,003	70
13	25	SNALRQVNIGNRN	485,9304	1454,7694	1454,7702	-0,52	47
13	26	SNALRQVNIGNRNS	514,9413	1541,8022	1541,8022	-0,016	35
13	27	SNALRQVNIGNRNSN	552,9556	1655,8451	1655,8451	-0,047	57
13	28	SNALRQVNIGNRNSNT	586,6379	1756,8918	1756,8928	-0,57	28
13	29	SNALRQVNIGNRNSNTT	620,3203	1857,9391	1857,9405	-0,76	53
13	31	SNALRQVNIGNRNSNTTDD	692,3453	2074,0142	2074,0151	-0,46	45
13	32	SNALRQVNIGNRNSNTTDDQ	735,0314	2202,0723	2202,0737	-0,65	44
13	33	SNALRQVNIGNRNSNTTDDQS	764,0419	2289,1038	2289,1057	-0,86	29
15	25	ALRQVNIGNRN	418,9056	1253,695	1253,6952	-0,19	29
15	27	ALRQVNIGNRNSN	485,9307	1454,7702	1454,7702	-0,024	38
16	32	LRQVNIGNRNSNTTDDQ	644,3272	1929,9598	1929,9617	-0,96	33
18	31	QVNIGNRNSNTTDD	767,3658	1532,717	1532,7179	-0,59	48
18	32	QVNIGNRNSNTTDDQ	831,3951	1660,7757	1660,7765	-0,46	81
18	33	QVNIGNRNSNTTDDQS	874,9112	1747,8078	1747,8085	-0,39	58
19	32	VNIGNRNSNTTDDQ	767,3676	1532,7205	1532,7179	1,72	42
20	31	NIGNRNSNTTDD	653,8025	1305,5905	1305,5909	-0,28	34
20	32	NIGNRNSNTTDDQ	717,8317	1433,6488	1433,6495	-0,5	66
20	35	NIGNRNSNTTDDQSN	874,9112	1747,8079	1747,8085	-0,32	49
20	36	NIGNRNSNTTDDQSNIN	931,9321	1861,8496	1861,8514	-0,99	44
20	37	NIGNRNSNTTDDQSNINF	1005,467	2008,9195	2008,9198	-0,16	56
20	38	NIGNRNSNTTDDQSNINFE	1069,9877	2137,9608	2137,9624	-0,77	44
22	37	GNRNSNTTDDQSNINF	891,9024	1781,7902	1781,7929	-1,47	68
23	37	NRNSNTTDDQSNINF	863,392	1724,7695	1724,7714	-1,09	32
24	37	RNSNTTDDQSNINF	806,3709	1610,7273	1610,7285	-0,75	33
25	37	NSNTTDDQSNINF	728,321	1454,6274	1454,6274	0,03	47
25	38	NSNTTDDQSNINFE	792,8422	1583,6698	1583,67	-0,12	50
26	37	SNTTDDQSNINF	671,2992	1340,5838	1340,5844	-0,46	50
26	38	SNTTDDQSNINFE	735,8211	1469,6277	1469,627	0,43	59
27	38	NTTDDQSNINFE	692,3049	1382,5953	1382,595	0,22	30
28	37	TTDDQSNINF	570,7619	1139,5092	1139,5095	-0,21	38
28	38	TTDDQSNINFE	635,2835	1268,5525	1268,5521	0,31	38
29	37	TTDDQSNINF	520,238	1038,4615	1038,4618	-0,27	28
30	37	TDQSNINF	469,7144	937,4142	937,4141	0,047	30
30	39	TDQSNINFEF	607,7696	1213,5246	1213,5251	-0,41	25
32	39	QSNINFEF	499,7327	997,4508	997,4505	0,29	26
38	49	EFSTGVNNNNNN	662,282	1322,5494	1322,5487	0,53	52
38	50	EFSTGVNNNNNNN	719,3024	1436,5902	1436,5916	-1	45

38	52	EFSTGVNNNNNNNSS	806,3352	1610,6558	1610,6557	0,1	28
38	54	EFSTGVNNNNNNNSSSN	906,8721	1811,7296	1811,7306	-0,58	69
38	56	EFSTGVNNNNNNNSSSNNN	1020,9155	2039,8165	2039,8165	0,012	28
38	62	EFSTGVNNNNNNNSSSNNNNVQNNN	908,712	2723,1141	2723,1152	-0,4	51
39	61	FSTGVNNNNNNNSSSNNNNVQNN	827,6838	2480,0295	2480,0297	-0,061	36
55	77	NNNVQNNNSGRNGSQNNDNENNI	848,6982	2543,0729	2543,0729	-0,0055	25
62	81	NSGRNGSQNNDNENNIKNTL	735,0077	2202,0012	2202,0009	0,15	34
71	81	NDNENNIKNTL	644,8101	1287,6057	1287,6055	0,17	36
71	82	NDNENNIKNTLE	709,331	1416,6474	1416,6481	-0,44	35
73	81	NENNIKNTL	530,275	1058,5355	1058,5356	-0,1	34
73	82	NENNIKNTLE	594,7961	1187,5776	1187,5782	-0,49	44
73	83	NENNIKNTLEQ	658,8256	1315,6366	1315,6368	-0,15	52
73	84	NENNIKNTLEQH	727,3548	1452,695	1452,6957	-0,43	51
73	89	NENNIKNTLEQHRQQQQ	708,0173	2121,0302	2121,0311	-0,44	28
94	103	RSHVEYSRIT	416,5544	1246,6414	1246,6418	-0,33	25
95	103	SHVEYSRIT	546,2776	1090,5406	1090,5407	-0,075	42
97	103	VEYSRIT	434,2321	866,4496	866,4498	-0,23	33

Effets des chaperons moléculaires sur la dégradation protéasomale de la protéine prion Sup35p

Un système *in vitro* à base de protéines purifiées nous a permis d'étudier la dégradation des formes solubles et fibrillaires des protéines prions par le protéasome. Dans la continuité des travaux précédents du laboratoire (Kabani et al., 2014; Krzewska and Melki, 2006) et de ceux présentés dans l'article 1 (Wang et al., 2015), nous avons voulu documenter les effets de plusieurs chaperons moléculaires sur la dégradation protéasomale des protéines prions Sup35p et Ure2p *in vitro*.

Les interprétations des études *in vivo* sont compliquées car la délétion ou la surexpression d'une ou plusieurs protéines peuvent affecter plusieurs processus biologiques. L'utilisation d'un système *in vitro* utilisant des composants purifiés permet en théorie un meilleur contrôle des conditions expérimentales et dans notre cas devait permettre d'étudier les effets de combinaisons de chaperons moléculaires sur la réaction de dégradation. Cette approche n'a cependant pas été concluante, notamment parce que le système de dégradation protéasomale est très sensible et facilement pollué par des contaminants ou par le fait que certains chaperons moléculaires purifiés se sont révélés être des substrats du protéasome 26S. Quelques exemples illustrant cette approche et ses limites sont présentés ci-après.

I Les réactions de dégradation protéasomale *in vitro* sont sensibles aux contaminants présents dans les protéines purifiées

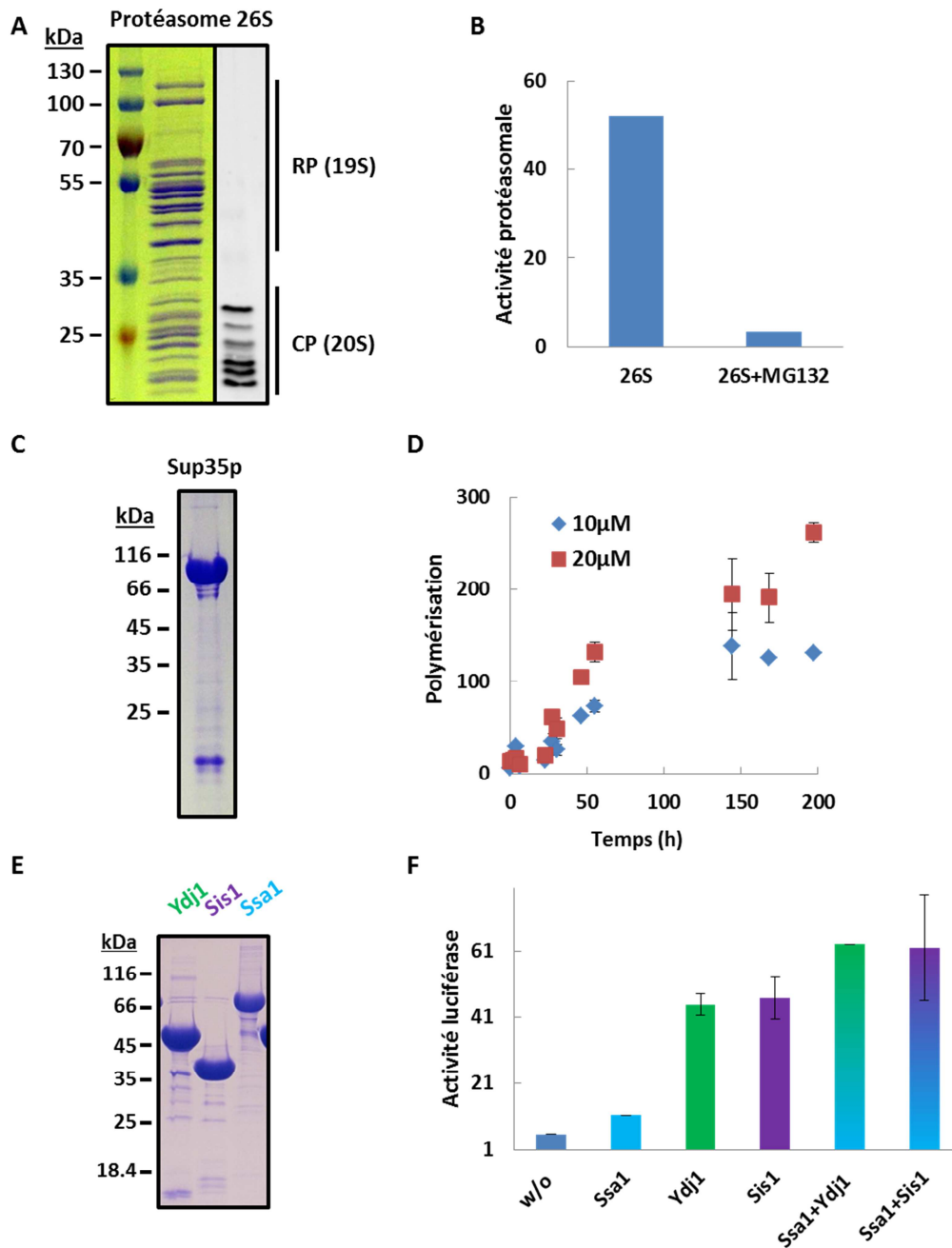


Figure 30 Validation des protéines utilisées dans cette étude

Le protéasome 26S (A et B), Sup35p (C et D) et les chaperons moléculaires Ssa1, Ydj1 et Sis1 (E et F) ont été purifiés par chromatographie (gauche) et leurs activités testées (droite).

B) Le protéasome 26S purifié est actif et son activité peut être inhibée par le MG132.

D) Polymérisation concentration-dépendante de Sup35p suivie par l'intensité de fluorescence de la thioflavine-T.

F) Activité de renaturation de la luciférase par les chaperons moléculaires purifiés.

Nos études précédentes ont montré que le protéasome 26S est capable de dégrader la forme native de Sup35p et Ure2p, aussi bien *in vivo* que *in vitro*, et de façon ubiquitine-indépendante (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). Nous avons voulu déterminer les effets de divers chaperons moléculaires sur les réactions de dégradation protéasomale en tubes à essais de ces protéines prions. Nous avons donc purifié différents chaperons moléculaires par chromatographie d'affinité et systématiquement testé leur activité (Figure 30). Des tests préliminaires encourageants ont été effectués avec ces préparations de chaperons : les différentes combinaisons de chaperons ont toutes eu un effet plus ou moins fort de ralentissement de la dégradation protéasomale de Sup35p soluble (Figure 31, B et C, et résultats non montrés). Cependant les effets d'un même chaperon se sont révélés variables selon les préparations de protéines (Figure 31, B et C, et résultats non montrés). Comme le protéasome 26S peut dégrader une portion significative de protéines dans la cellule (Baugh et al., 2009), les impuretés présentes dans les chaperons purifiés pourraient être des substrats du protéasome entrant en compétition avec notre substrat d'intérêt. Nous avons donc tenté d'augmenter le degré de pureté de nos préparations. Un exemple est donné dans la Figure 31A pour Ssa1. L'élimination des impuretés dans les préparations Ssa1 II et Ssa1 III supprime également l'effet de ralentissement observé avec Ssa1 I sur la dégradation protéasomale de Sup35p soluble (Figure 31, B et C).

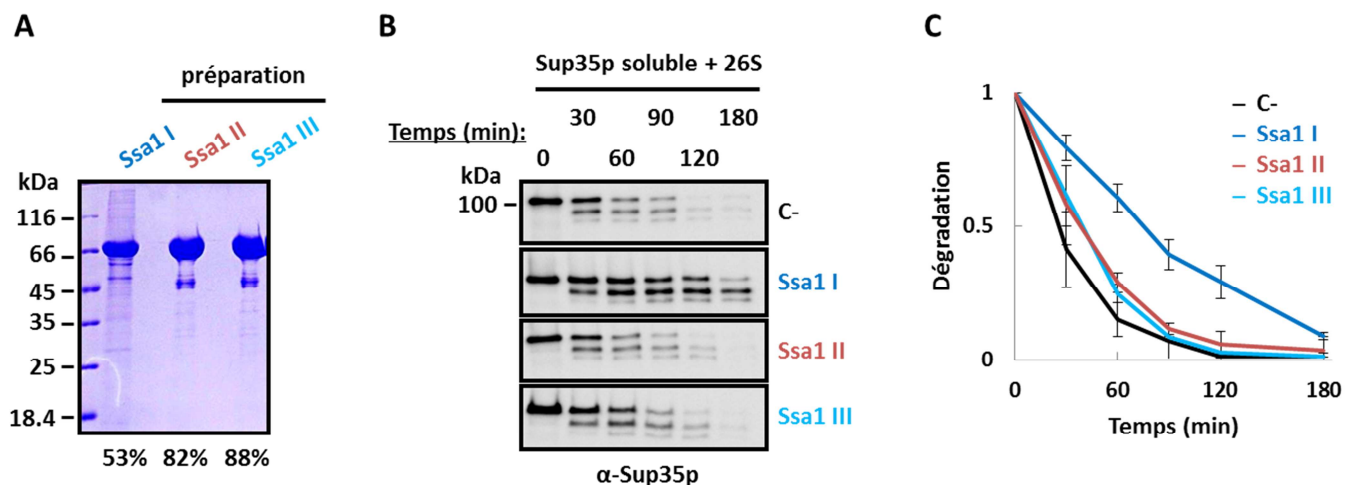


Figure 31 Le système de dégradation protéasomale est sensible aux contaminations.

A) Analyse par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie de la protéine Ssa1 obtenue après une (Ssa1 I, bleu), deux (Ssa1 II, rouge) ou trois étapes (Ssa1 III, cyan) de purification. Les pourcentages de pureté relative de chacune des préparations de Ssa1 ont été estimés par le logiciel d'analyse d'image ImageJ.

B) Cinétique de dégradation protéasomale de Sup35p soluble en présence des différentes préparations de Ssa1. Le protéasome 26S purifié (2 nM) a été mélangé avec Sup35p soluble (130 nM) en présence de 2.5 mM d'ATP, en absence (C-) ou en présence des différentes préparations de Ssa1 (I, II, III ; 1.3 μ M). Les réactions ont été incubées à 30°C sous faible agitation (300 rpm). Des aliquotes ont été prélevés aux temps indiqués puis analysés par SDS-PAGE et Western blot avec des anticorps anti-Sup35p.

C) Quantification des cinétiques de dégradation présentées en B par ImageJ (l'intensité de la bande de Sup35p au temps 0 a été arbitrairement fixée à 1). Les données représentent la moyenne de deux expériences indépendantes, et les barres d'erreur l'écart par rapport à cette moyenne.

II Certains chaperons moléculaires sont substrats du protéasome 26S *in vitro*

Le chaperon Ssa1 fonctionne en synergie avec ses co-chaperons de la famille Hsp40 tels que Ydj1 et Sis1 (Liebman and Chernoff, 2012; Wickner et al., 2015). Même si Ssa1 (préparation III) seul n'a pas d'effet notable sur la dégradation protéasomale de Sup35p soluble, l'ajout de chaperons Hsp40 dans la réaction pourrait stimuler son action à des niveaux détectables. C'est pourquoi nous avons réalisé une cinétique de dégradation de Sup35p soluble en présence des combinaisons de Ssa1/Ydj1 ou Ssa1/Sis1 (Figure 32 et résultats non montrés). En accord avec ce que nous avons observé précédemment, Ssa1 seul n'a pas d'effet sur la dégradation de Sup35p (Figure 32, A et B). Sis1 seul et la combinaison de Ssa1/Sis1 ralentissent de façon significative la dégradation de Sup35p soluble (Figure 32, A et B). Le taux de ralentissement est cependant le même en présence ou en absence de Ssa1, suggérant un effet de Sis1 seul. Cependant, alors que la quantité de Ssa1 reste constante tout au long de la cinétique de dégradation, la quantité de Sis1 diminue progressivement au cours du temps (Figure 32A). Cette diminution de la quantité de Sis1 est due à sa dégradation par le protéasome car elle abolie par l'ajout de MG132, un inhibiteur du protéasome, dans la réaction (Figure 32C). Sis1 entre donc tout simplement en compétition avec Sup35p pour le protéasome.

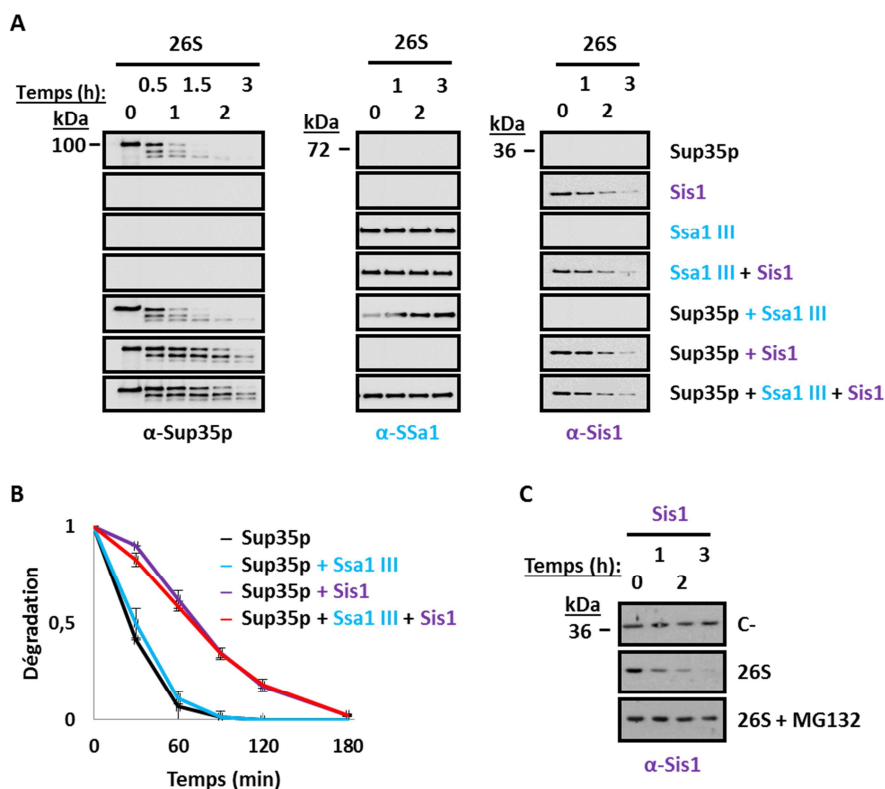


Figure 32 Le chaperon moléculaire Sis 1 est substrat du protéasome 26S *in vitro*

A) Cinétique de dégradation protéasomale de Sup35p soluble en présence de chaperons moléculaires. Le protéasome 26S purifié (2 nM) a été mélangé avec ou sans Sup35p soluble (130 nM), en présence de 2.5 mM ATP, et en absence (C-) ou en présence de Ssa1 III (1.3 μM) et/ou Sis1 (1.3 μM). Les réactions ont été incubées à 30°C sous faible agitation (300 rpm). Des aliquotes ont été prélevés aux temps indiqués puis analysés par SDS-PAGE et Western blot avec des anticorps dirigés contre Sup35p, Ssa1 et Sis1.

B) Quantification des cinétiques de dégradation présentées en A par ImageJ (l'intensité de la bande de Sup35p au temps 0 a été arbitrairement fixée à 1). Les données représentent la moyenne de deux expériences indépendantes, et les barres d'erreur représentent l'écart par rapport à cette moyenne.

C) Cinétique de dégradation protéasomale de Sis1p. Sis1p (1.3 μM) a été mélangé avec ou sans protéasome 26S (2 nM) en présence de 2.5 mM ATP, et en présence ou en absence de MG132 (100 μM). Les réactions ont été incubées à 30°C sous faible agitation (300 rpm). Des aliquotes ont été prélevés aux temps indiqués puis analysés par SDS-PAGE et Western blot avec des anticorps dirigés contre Sis1p.

III Ssa1 n'a aucun effet sur la dégradation protéasomale des fibres de Sup35p

Des études ont montré que Ssa1 interagit physiquement avec les agrégats de Sup35p dans les cellules [*PSI⁺*] (Bagriantsev et al., 2008; Sharma and Masison, 2009; Winkler et al., 2012). Nous avons obtenu des fibres de Sup35p après polymérisation spontanée de la protéine

soluble à 4°C (Figure 33A). Des cinétiques de dégradation de ces fibres par le protéasome ont été réalisées en absence ou en présence de Ssa1 III (Figure 33, B et C). Comme observé auparavant (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015), le protéasome 26S peut dégrader les fibres de Sup35p produites *in vitro*. Et cette dégradation est inhibée par le MG132. Cependant, aucun effet de Ssa1p sur la dégradation protéasomale des fibres de Sup35p n'a été observé dans nos conditions expérimentales.

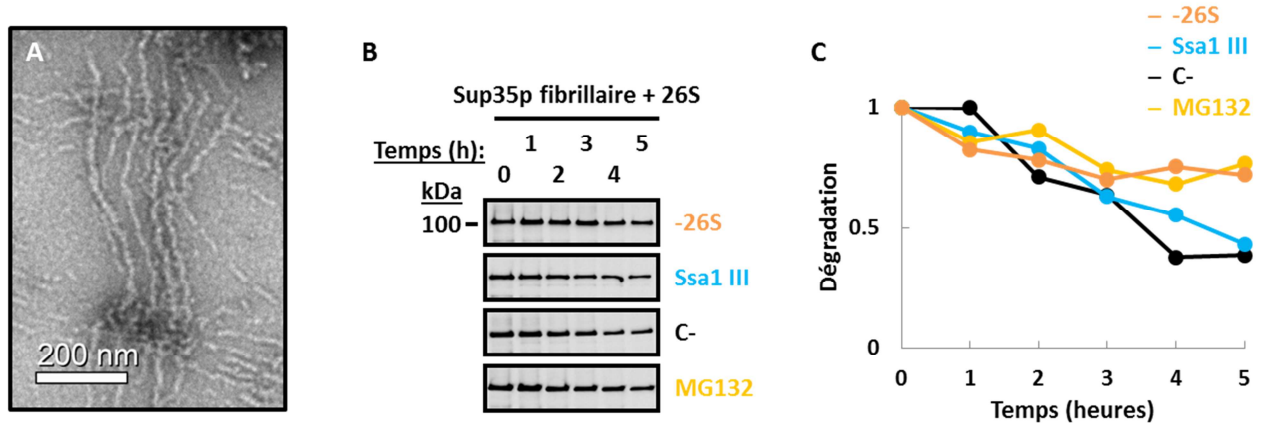


Figure 33 Le chaperon moléculaire Ssa1 n'a pas d'effet sur la dégradation des fibres de Sup35p *in vitro*

A) Image de microscopie électronique en coloration négative de fibres de Sup35p.

B) Cinétiques de dégradation par le protéasome (2 nM) de fibres de Sup35p (130 nM) en présence ou en absence de Ssa1 III (1.3 μM) en présence de 2.5 mM d'ATP, et en présence ou en absence de MG132 (100 μM). Les réactions ont été incubées à 30°C sous faible agitation (300 rpm). Des aliquotes ont été prélevés aux temps indiqués puis analysés par SDS-PAGE et Western blot avec des anticorps anti-Sup35p.

C) Quantification des cinétiques de dégradation présentées en B par ImageJ. L'intensité des bandes au temps 0 a été fixée à 1.

RESULTATS 2:

La plupart de nos connaissances sur la formation, la propagation et l'élimination des prions de levure est issue de levures en division active, cultivées dans des conditions optimales en laboratoire. Cependant, dans la nature, les levures sont fréquemment retrouvées dans un état quiescent, notamment lorsque les sources nutritives se font rares. C'est pourquoi la deuxième partie de mon travail de thèse a consisté à caractériser le prion [*PSI*⁺] au cours des différentes phases de croissance de la levure.

Des résultats portant sur les changements de propriétés de [*PSI*⁺] au cours de la croissance cellulaire, et les conséquences physiologiques inattendues de ce prion sur le vieillissement chronologique sont présentés sous forme d'article (article 2). Des résultats complémentaires concernant les limites liées à l'utilisation de souches Sup35GFP sont ensuite présentés.

ARTICLE 2

A prolonged chronological lifespan is an unexpected benefit of the $[PSI^+]$ prion in yeast

Kai Wang, Ronald Melki and Mehdi Kabani

Résumé

Dans l'article 2, nous montrons tout d'abord que les particules de prion [PSI^+] subissent des changements ultra-structuraux et fonctionnels notables au cours des différentes phases de croissance. L'atténuation traductionnelle intervenant lors de la transition diauxique pourrait être responsable de ces changements, en modifiant l'équilibre délicat entre des acteurs clés du CQP (chaperons moléculaires, protéasome) et les différentes formes solubles et agrégées de Sup35p. Ensuite, nous montrons que le taux de survie des cellules [PSI^+] en phase stationnaire est nettement plus élevé que celui des cellules [psi^-]. De façon remarquable, cet avantage sélectif est maintenu après élimination du prion [PSI^+]. Ce travail renforce l'idée que la plasticité phénotypique médiée par les prions fongiques permet l'acquisition et la fixation génétique de nouveaux traits.

A prolonged chronological lifespan is an unexpected benefit of the $[PSI^+]$ prion in yeast

Kai Wang, Ronald Melki* and Mehdi Kabani*

Paris-Saclay Institute of Neuroscience, Centre National de la Recherche Scientifique,
Université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette, France

Running title: $[PSI^+]$ cells live longer

* Corresponding authors: Mehdi.Kabani@cnrs.fr and Ronald.Melki@cnrs.fr

Abstract

Self-replicating conformations of ‘proteinaceous infectious particles’ or prions are responsible for complex heritable traits in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Our current understanding of the biology of yeast prions stems from studies that were mostly done in the context of actively dividing cells in optimal growth conditions. In nature however, most cells are generally in a non-dividing quiescent state, resulting for instance from the scarcity of nutrients. Yet little is known about the fate and properties of prion particles as yeast cells enter the stationary phase. Similarly, the physiological consequences of harboring these prions throughout the lifespan of yeast cells are poorly documented. We addressed this issue using the $[PSI^+]$ prion as a model. $[PSI^+]$ results from the self-assembly of the translation release factor Sup35p into insoluble fibrillar aggregates, leading to increased nonsense suppression. By altering gene expression, $[PSI^+]$ has been proposed to confer phenotypic plasticity in response to environmental fluctuations. We found that Sup35p prion particles undergo profound growth phase-dependent ultrastructural and functional changes. Importantly, we show that while $[PSI^+]$ had little to no effect on growth *per se*, it dramatically improved the survival of yeast cells in stationary phase. Prolonged chronological lifespan persisted even after $[PSI^+]$ was cured from the cells, providing yet another example of how prions may facilitate the acquisition and genetic fixation of complex new traits. Long-term survival under nutrient deprivation conditions is an important selective advantage that may explain the evolutionary conservation of the prion-forming ability of Sup35p orthologues in distantly related yeast species.

Importance

Yeast prions are self-replicating alternate conformations of proteins responsible for heritable epigenetic traits. The formation, propagation and elimination of yeast prions were mostly studied in the context of actively dividing cells. In nature however, most cells are generally found in a post-mitotic state. Yet, little is known about the properties and physiological consequences of yeast prions in non-dividing quiescent cells. Here we addressed this issue using $[PSI^+]$, the prion form of the translation termination factor Sup35p, as a model. We found that Sup35p prion particles undergo profound ultrastructural and functional changes in a growth-phase dependent manner. A major finding of our study is that $[PSI^+]$ cells survive longer in stationary conditions after the exhaustion of nutrients. This selective advantage persists even after $[PSI^+]$ is cured from the cells, providing yet another example of how prions may facilitate the acquisition and genetic fixation of complex new traits.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* hosts many ‘infectious proteins’, or prions, with a striking enrichment in proteins involved in gene regulation at the transcriptional or translational levels (1). Among these, the discovery and characterization of $[PSI^+]$ allowed tremendous progress on our current understanding of the formation, propagation and possible biological consequences of prions (2, 3). $[PSI^+]$ results from the assembly of the translation termination factor Sup35p into insoluble self-replicating fibrillar protein aggregates (2, 3). $[PSI^+]$ cells exhibit an increased level of translational readthrough due to reduced translation termination efficacy (4, 5). Furthermore, structurally different Sup35p assemblies lead to different $[PSI^+]$ strains which are referred to as ‘weak’ or ‘strong’ with respect to the nonsense suppression phenotypes they confer (3). As a consequence of both altered translation termination and the cellular response to prion aggregates, $[PSI^+]$ and prion-free $[psi^-]$ cells most certainly have different proteomes (6). $[PSI^+]$ was proposed to function as a transient evolutionary capacitor allowing the acquisition and genetic fixation of new traits, particularly in stressful environmental conditions (7-10). However, whether $[PSI^+]$ strains are beneficial or mostly detrimental for yeast is still a debated issue (3, 11-17).

Most of the knowledge acquired on yeast prions in general and $[PSI^+]$ in particular, results from studies on actively dividing yeast cells grown in optimal laboratory conditions. In nature however, cells are frequently found in a non-proliferating quiescent state, for example when nutrient sources are scarce or when environmental conditions (e.g. temperature) are not favorable to growth (18). The ability of yeasts to enter into quiescence, a physiological state characterized by specific cell structures such as actin bodies or proteasome storage granules as well as an increased resistance to stress and external aggressions, is undoubtedly linked

to the chronological lifespan of this organism (19, 20).

Here, we show that $[PSI^+]$ -associated Sup35p prion particles are remodeled during the transition from exponential to stationary phases of growth and that this is accompanied with changes in their infectious potential. Importantly, we show in two different genetic backgrounds that $[PSI^+]$ cells have a much longer chronological lifespan compared to $[psi^-]$ cells. Curing cells from $[PSI^+]$ did not alleviate this beneficial effect providing yet another example of the genetic fixation of prion-induced epigenetic traits. The ability of cells to survive much longer in starvation conditions certainly confers a selective advantage that could explain the presence of $[PSI^+]$ among wild yeasts and the evolutionary conservation of the prion-forming ability of Sup35p in distantly related yeast species.

The size and infectious properties of Sup35p prion particles changes during growth

We first compared the growth rates of $[psi^-]$ and $[PSI^+]$ derivatives of the 74-D694 yeast strain in rich YPDA medium. Cell growth was assessed by measuring the optical density at 600nm (OD_{600nm}) and the number of colony-forming units (cfu) (see Text S1 in the supplemental material). To enable a proper comparison of different strains, we made sure that all cultures were started with exponentially growing cells (see Text S1 in the supplemental material). As a result, no lag phase of growth was observed upon diluting cells in fresh medium (Fig. 1A). The growth curves of $[psi^-]$ and $[PSI^+]$ strains were indistinguishable and yielded the same number of cfu (see below) which correlated linearly with optical density measurements during exponential phase (until $OD_{600nm} \sim 10$) (Fig. S1). Thus, propagation of Sup35p prion aggregates is neither detrimental nor beneficial for growth in the 74-D694 yeast strain (9).

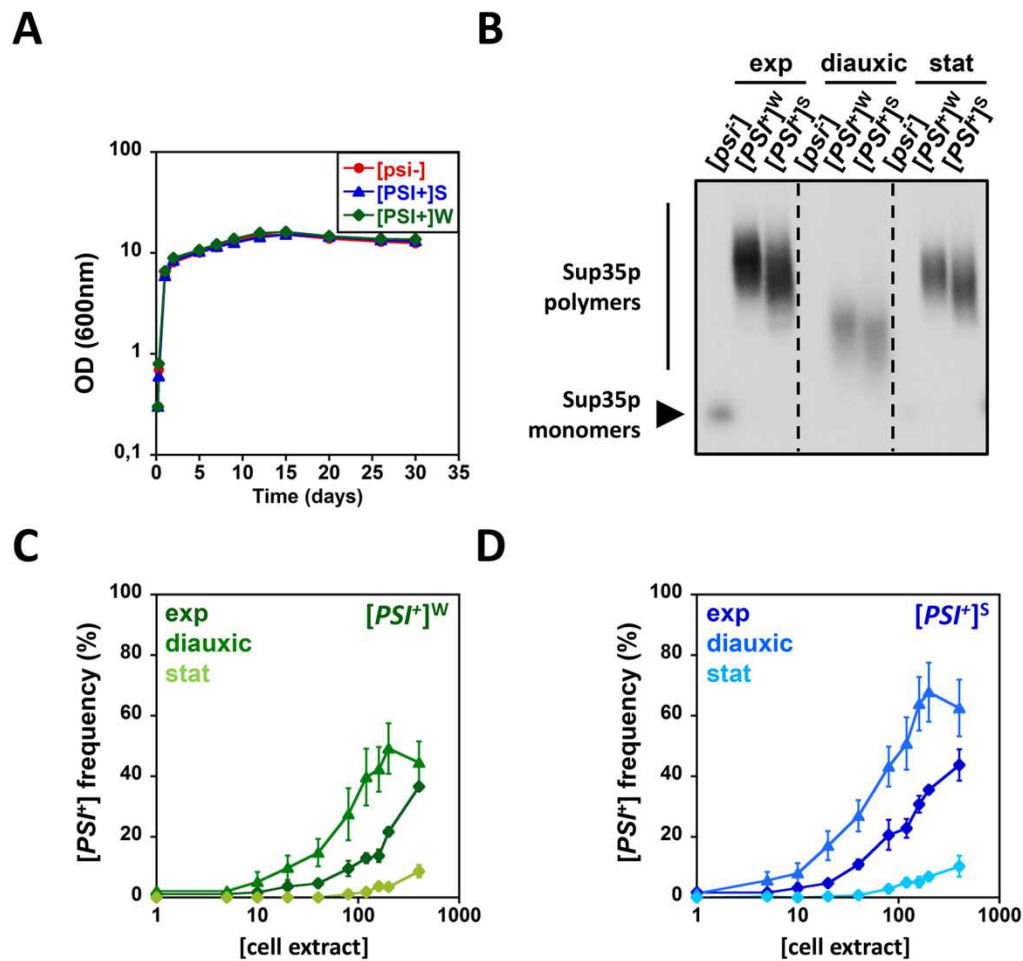


Figure 1. Growth phase-dependent changes in the ultrastructural and infectious properties of $[PSI^+]$ -associated Sup35p aggregates. (A) Exponentially growing $[psi^-]$, $[PSI^+]^S$ or $[PSI^+]^W$ 74-D694 cells were inoculated in fresh YPDA medium in large baffled bottom flasks and allowed to grow for up to 30 days at 30°C under agitation. Aliquots were periodically removed and the optical density at 600 nm measured. Data are the mean \pm SE of five independent cultures (error bars are within the variables symbols). (B) Equal numbers of cells were harvested during the exponential, diauxic (day 2) or stationary (day 7) growth phases. Cell extracts were prepared by liquid nitrogen grinding (see Text S1 in the supplemental material) and analyzed by SDD-AGE and immunoblotting with anti-Sup35p antibodies. (C, D) Increasing amounts of the cell extracts prepared in (B) were transformed into $[psi^-]$ 75-D694 spheroplasts. Random clones from each transformation reaction were then patched onto 1/4-YPD plates to assess their prion phenotype and to determine the $[PSI^+]$ conversion efficiency (data are the mean \pm SE of three transformations performed with three independent cell extract preparations).

The extraction and immuno-detection of both soluble and aggregated Sup35p is highly dependent upon growth conditions and cell lysate preparation methods ((21, 22) and our unpublished observations). We previously noted that the size of the SDS-resistant core Sup35p prion particles that

are detectable by SDD-AGE in $[PSI^+]$ cells is smaller in post-diauxic shift phase cells than in log phase cells (21). To confirm these observations, we used liquid nitrogen grinding -a method of choice for preserving the integrity of protein complexes- to prepare cell lysates from

equal numbers of $[psi^-]$, $[PSI^+]^S$ and $[PSI^+]^W$ cells harvested in the exponential (~6 h), diauxic (day 2) or stationary phases (day 7) of growth (see Text S1 in the supplemental material). No significant differences in biomass yields and protein concentration were observed among strains at each growth phase (Fig. S2A and Fig. S2B). However and as expected, the protein concentration of cell lysates markedly decreased for all strains after the transition to diauxic growth and entry into stationary phase (Fig. S2B and Fig. S2C). Both the size and amounts of SDS-resistant Sup35p polymers, assessed by SDD-AGE, decreased markedly in post-diauxic shift cells compared to exponentially growing cells (Fig. 1B). Surprisingly, the Sup35p polymers detected in lysates prepared from stationary phase cells were larger than those observed during diauxic growth and almost comparable to those observed in exponentially growing cells (Fig. 1B). It should be noted here that slight differences were observed when lysates were prepared by glass beads-beating (see Text S1 in the supplemental material) using cells that were grown in small flat bottom flasks instead of the large baffled bottom flasks used for the experiments depicted in Fig. 1. In these conditions, remodeling of Sup35p aggregates coincided with the transition from exponential to diauxic growth phases in both weak and strong $[PSI^+]$ strains (Fig. S3A and S3B). After a sharp transition from larger to smaller polymers after ~12h of growth, the amounts of Sup35p polymers slowly decreased for the next days to almost undetectable levels (Fig. S3B). The amount of soluble Sup35p in $[psi^-]$ cells also shows a sharp decrease after ~12h of growth (Fig. S3B) which could be due to proteasomal degradation (21).

How this remodeling of Sup35p prion particles occurs continues to elude us but may result from a change in equilibrium between Sup35p assemblies and molecular chaperones, the levels of which drop during the diauxic shift transition (Fig. S4).

It is also important to note that a decrease of the size of detergent-resistant Sup35p polymers on agarose gels does not necessarily mean that actual prion aggregates in the cell are getting smaller during growth. Indeed, using GFP-tagged Sup35p as a proxy, we and others observed that after a few days of growth the speckled fluorescent pattern characteristic of $[PSI^+]$ cells coalesce into fewer but larger foci which persisted during stationary phase (data not shown) (23).

Next, we used protein transformation experiments (24) to assess whether the ultrastructural changes in Sup35p prion particles we observed during growth affect their infectious potential. A sharp increase in infectivity was observed after ~12h of growth, followed by a slow decline, nicely correlating with changes in both the size distribution and the amount of Sup35p polymers (Fig. S3C). This is expected as both the size and amount of Sup35p prion particles will impact their ability to recruit and convert Sup35p monomers to a prion conformation. To quantify these changes in the infectious potential of Sup35p particles at different growth phases, increasing amounts of cell extracts obtained by liquid nitrogen grinding of cells (see Text S1 in the supplemental material) were transformed into $[psi^-]$ spheroplasts and the $[PSI^+]$ conversion efficiency determined (Fig. 1C and 1D). Infectivity of cell extracts from post-diauxic shift cells was twice as higher than that of exponentially growing cells (Fig. 1C and 1D). The infectivity of Sup35p prion particles from stationary phase cells was tenfold and twofold lower than those observed in cell extracts from exponentially growing and post-diauxic shift cells, respectively (Fig. 1C and 1D). Sup35p prion particles retained the ability to transmit their ‘weak’ or ‘strong’ identities regardless of the growth phase from which they originate (Fig. S5). As expected, no $[PSI^+]$ cells were obtained when cell extracts prepared from a $[psi^-]$ strain were used at the highest

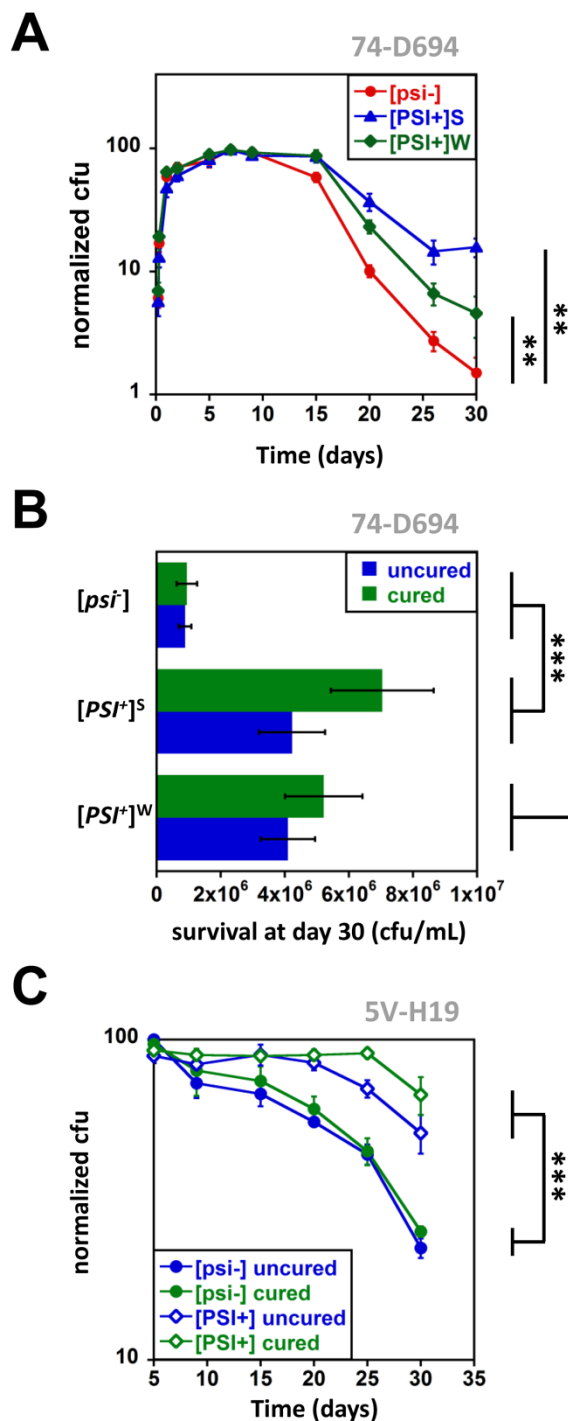


Figure 2. [PSI⁺] confers a prolonged chronological lifespan in the 74-D694 and 5V-H19 genetic backgrounds.

(A) Exponentially growing [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^S or [*PSI*⁺]^W 74-D694 cells were inoculated in fresh YPDA medium and allowed to grow for up to 30 days at 30°C under agitation. Aliquots were periodically removed and the number of cfu determined by serial dilutions and plating. Growth and survival curves were normalized with respect to the maximal number of cfu set to 100% (raw data can be found in Fig. S7). Data points are the mean ±SE of five independent cultures. Statistical comparison of the growth curves was performed using a permutation test (see Text S1 in the supplemental material; ** indicate p-values < 0.01). (B) Exponentially growing [*psi*⁻], [*PSI*⁺]^S or [*PSI*⁺]^W 74-D694 cells, that were previously cured with guanidine hydrochloride or not, as indicated, were inoculated in YPDA medium and incubated at 30°C under agitation for 30 days. The number of cfu was then determined by serial dilutions and plating. Data represent the mean ±SE of three independent cultures (***) indicate p-values < 0.001, ** indicate p-values < 0.01, unpaired two-tailed Student's t-test). (C) Exponentially growing [*psi*⁻] or [*PSI*⁺] 5V-H19 cells were inoculated in fresh YPDA medium and allowed to grow for up to 30 days at 30°C under agitation. Aliquots were periodically removed and the number of cfu determined by serial dilutions and plating. Growth and survival curves were normalized with respect to the maximal number of cfu set to 100% (raw data can be found in Fig. S8B). Data points are the mean ±SE of four to six independent cultures. Statistical comparison of the growth curves was performed using a permutation test (see Text S1 in the supplemental material; *** indicate p-values < 0.001).

concentration in protein transformation experiments (data not shown).

Taken together, these observations indicate that Sup35p prion particles can be constantly remodeled even in the absence of active cell division. The changes in infectivity we report here may reflect an adjustment of the number of propagons according to the physiological and metabolic state of the cells to ensure the proper transmission and stability of the prion and/or a need to adjust the prion-associated phenotypes to cell growth conditions (25).

[PSI⁺] cells have a prolonged chronological lifespan

Cell growth was not affected by the presence of [PSI⁺]-associated aggregates (Fig. 1A). The changes in the ultrastructural and infectious properties of Sup35p prion particles we report here (Fig. 1 and Fig. S3) may be of importance for the high stability of [PSI⁺] when nutrients are scarce or absent (Fig. S6). However, these modifications did not result in an increased toxicity of Sup35p aggregates as both [*psi*⁻] and [PSI⁺] cultures reached similar maximal numbers of cfu after 7 days of growth (Fig. 2A and Fig. S7A). Furthermore, [*psi*⁻] and [PSI⁺] stationary phase cells remained perfectly viable after an additional 7 days of growth (Fig. 2A). A gradual decay in cfu numbers, which could be due to cell death, senescence and/or an inability of aged cells to exit the quiescent state, was observed for all cultures after 15 days of growth (Fig. 2A). Remarkably, the loss of viability was much greater for [*psi*⁻] cells than for [PSI⁺]^S or [PSI⁺]^W cells (Fig. 2A and Fig. S7A). From day 7 to day 30, cfu numbers dropped from 100% (~5x10⁷ cfu/mL) to ~15% (~7x10⁶ cfu/mL) for [PSI⁺]^S cultures, to ~5% (~2x10⁶ cfu/mL) for [PSI⁺]^W cultures and to ~1% (~7x10⁵ cfu/mL) for [*psi*⁻] cultures (Fig. 2A and Fig. S7A). Thus, the [PSI⁺] prion appears to

have a positive impact effect on yeast chronological lifespan. Microscopic analysis of the cultures at the different stages of growth did not reveal significant qualitative or quantitative morphological differences between [*psi*⁻] and [PSI⁺] cells that could point to the mechanisms by which this beneficial effect occurs (data not shown). Treating cells with guanidine hydrochloride effectively cured them from the [PSI⁺] prion (Fig. S8A and S8B). This treatment neither affected the growth properties nor the chronological lifespan of [*psi*⁻] cells (Fig. 2A and data not shown). Importantly however, the chronological lifespan of uncured and cured [PSI⁺] cells was similar and significantly higher than that of [*psi*⁻] cells (Fig. 2A). This indicates that the beneficial effect of [PSI⁺] on yeast chronological lifespan can be permanently and efficiently fixed in the cells even when [PSI⁺] is subsequently lost (7, 10).

The biological consequences and phenotypic manifestations of genetic and epigenetic polymorphisms (e.g. mutations, prions) can vary greatly depending on the genetic background of the yeast strains in which they are studied. To address whether the beneficial effect conferred by [PSI⁺] on chronological lifespan is specific to the 74-D694 strain context or not, we compared the growth properties and chronological lifespan of [*psi*⁻] and freshly obtained [PSI⁺] strains in the 5V-H19 background (see Text S1 in the supplemental material). [PSI⁺] 5V-H19 cells grew slightly faster and generated a greater number of cfu (~1x10⁸ cfu/mL vs ~8x10⁷ cfu/mL) than their [*psi*⁻] counterparts, in agreement with previous data (9) (Fig. S7B and S7C). Survival rates of 5V-H19 [PSI⁺] cells (~55%; ~6x10⁷ cfu/mL) in stationary phase conditions were twice as higher than those of 5V-H19 [*psi*⁻] cells (~25%; ~2x10⁷ cfu/mL) (Fig. 2C and Fig. S7C). Treating cells with guanidine hydrochloride cured cells from the [PSI⁺] prion (Fig. S8C and S8D). However survival rates of cured 5V-H19 [PSI⁺] cells (~67%; 8.5x10⁷ cfu/mL) remained higher than those of both

uncured and cured 5V-H19 [*psi*⁻] strains, which behaved similarly in these assays (~25%; ~2x10⁷ cfu/mL) (Fig. 2C and Fig. S7C). Furthermore, cured 5V-H19 [*PSI*⁺] cells retained higher growth rates than uncured and cured 5V-H19 [*psi*⁻] cells (Fig. S7B). Thus, [*PSI*⁺] confers a selective advantage to 5V-H19 cells by improving both their growth rate and chronological lifespan. This selective advantage is subsequently permanently fixed in cells and becomes [*PSI*⁺]-independent, in both the 74-D694 and 5V-H19 genetic backgrounds. Genetic fixation of [*PSI*⁺]-induced epigenetic characteristics were previously observed and suggested [*PSI*⁺] (and possibly other prions) can act as transient evolutionary capacitors (7-10).

Discussion

Most weak or strong [*PSI*⁺] variants obtained and studied in laboratory conditions are well tolerated by yeast cells and stably maintained during cell divisions without impairing growth (e.g. Fig. 1A, Fig. 2A, Fig. S3A and Fig. S7). Sup35p aggregates associated with [*PSI*⁺] undergo ultrastructural and functional changes as cells shift from active growth on glucose to slow growth on ethanol, and also when cells enter stationary phase (Fig. 1). Several hypotheses can be made to explain the decrease in size of Sup35p SDS-resistant polymers we observe upon cells entry in diauxic growth (Fig. 1B and Fig. S3B). Because of both a general slowing of translation and proteolysis (21), Sup35p levels drop upon entry into stationary phase (Fig. S3B and S4). As a consequence, the equilibrium between soluble and aggregated Sup35p species could be shifted towards smaller polymers. In addition, the concomitant decrease in molecular chaperones levels (Fig. S4) may also contribute to the remodeling of these Sup35p polymers. Finally, we cannot exclude that an unknown proteolytic activity may process Sup35p aggregates (21). It is unlikely that such a proteolytic

activity occurs during lysate preparation as these observations were made repeatedly using several lysate preparation methods, including glass beads and liquid nitrogen grinding (Fig. 1B and Fig. S3B) as well as spheroplasts lysis (21), and in the presence of wide spectrum protease inhibitors (Text S1 in the supplemental material). Similarly, the increase in size of detergent-resistant Sup35p polymers when cells enter the stationary phase (Fig. 1B) could reflect changes in the equilibrium between Sup35p species and molecular chaperones. These results indicate that Sup35p prion particles are dynamically remodeled according to the metabolic and physiological status of the cell even in the absence of active cell division. The infectious potential in protein transformation assays of cell lysates prepared from cells in the diauxic phase was markedly higher than those prepared from cells in the exponential or stationary phases of growth, despite much lower Sup35p amounts in the former than in the latter (Fig. 1C and 1D, and Fig. S3C). The smaller size of Sup35p polymers might facilitate their uptake by the cells but can only partly explain the peak of infectivity we observe during diauxic growth (Fig. 1C and 1D, and Fig. S3C). Sup35p polymers may form different complexes with molecular chaperones and other cellular components, which are not disrupted in lysates (26) and that may impact their ability to act as prions or to be cleared by the recipient cells.

[*PSI*⁺] formation is associated with reduced translational fidelity which lead to genome-wide nonsense suppression events (6). [*PSI*⁺]-induced changes in gene expression facilitate the phenotypic expression of cryptic genetic polymorphisms, leading to a variety of acquired traits which are often beneficial under challenging growth conditions (7-10). Here we find that one of such [*PSI*⁺]-induced traits is the ability to survive longer when nutrients are exhausted (Fig. 2 and Fig. S7). Remarkably, [*PSI*⁺]-mediated

long-term survival was robustly observed using two different prion variants in two very different genetic backgrounds (Fig. 2, Fig. S7 and data not shown). It is important to highlight that we used [*PSI*⁺] strains of different origins as well as [*PSI*⁺] cells that were freshly obtained by transforming [*psi*⁻] cells with infectious prions (Fig.2, Fig. S7 and data not shown). In all cases, the effects we observe on survival rates are consistent and only differ in amplitude depending on the genetic background of the strains and the prion variants they carry (Fig.2, Fig. S7 and data not shown). Therefore, it is unlikely that they are due to genetic mutations present in our strains, unless such mutations arise or manifest as a consequence of [*PSI*⁺]-induced changes in gene expression (6). Nutrient scarcity is probably one of the most frequent stressful conditions faced by yeasts in nature. A prolonged chronological lifespan allowing cells to survive longer under such conditions would be a major selective advantage for wild yeasts, which could explain the extraordinary conservation of the prion-forming ability of Sup35p over one billion years of fungal evolution (27). The permanent genetic fixation of [*PSI*⁺] dependent traits was previously described and thought to occur mainly by the re-assortment of genetic variation during meiosis (7, 10). Here we find that haploid 74-D694 and 5V-H19 cells cured from [*PSI*⁺] with guanidine hydrochloride retained a prolonged chronological lifespan in stationary phase conditions (Fig. 2 and Fig. S7). Curing had no effect on the survival rates of [*psi*⁻] cells, indicating that neither the guanidine hydrochloride treatment nor other prions that may have been initially present in the cells are responsible for these observations (Fig. 2 and Fig. S7). Thus, the prolonged chronological lifespan elicited by [*PSI*⁺] can be permanently and efficiently fixed in the cells. In the absence of meiotic re-assortment of polymorphisms and alleles in haploid cells, we can only speculate that the fixation mechanism may rely on

specific secondary mutations that may be favored in [*PSI*⁺] cells (6).

What could be the link (if any) between the growth phase-dependent remodeling of Sup35p prion aggregates and the protective effect of [*PSI*⁺] on long-term survival in stationary phase?

Sup35p levels drop to almost undetectable levels when [*psi*⁻] cells enter stationary phase (Fig. 1B, Fig. S3B, and data not shown). In [*PSI*⁺] cells however, Sup35p is still detected for several days in high molecular weight prion aggregates (Fig. 1B and Fig. S3B). Sup35p polymers could resist proteolytic or extracellular vesicles clearance (21, 28) and constitute a ‘supply’ of functional Sup35p molecules that help cells exit from the quiescent state when growth resumes. However, this hypothesis cannot be the sole explanation as cells that were cured from [*PSI*⁺] and that no longer have Sup35p prion aggregates still exhibited a prolonged chronological lifespan (Fig. 2 and Fig. S7). Thus, secondary events must take place to fix this trait permanently. If the selective advantage conferred by [*PSI*⁺] for long-term survival was a rare stochastic event arising in only a few cells within the population, it might have been undetected in our experiments. Because of the consistently high survival rates we reported for [*PSI*⁺] cells after up to 30 days of culture (Fig. 2 and Fig. S7), we believe [*PSI*⁺] induces a specific genetic and/or metabolic reprogramming in these cells. Whether the remodeling of Sup35p aggregates occurring upon cells entry into diauxic and stationary growth conditions acts as a signal for this switch mechanism or not remains to be determined.

Acknowledgements

We thank Chih-Yen King for the generous gift of yeast strains. M.K. and R.M. are supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BS08-0013-02). K.W. is the beneficiary of a doctoral grant from the French

Ministry of National Education, Research and Technology.

References

1. **Tuite MF, Serio TR.** 2010. The prion hypothesis: from biological anomaly to basic regulatory mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:823-833.
2. **Kabani M, Melki R.** 2011. Yeast prions assembly and propagation: contributions of the prion and non-prion moieties and the nature of assemblies. *Prion* **5**:277-284.
3. **Liebman SW, Chernoff YO.** 2012. Prions in yeast. *Genetics* **191**:1041-1072.
4. **Patino MM, Liu JJ, Glover JR, Lindquist S.** 1996. Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science* **273**:622-626.
5. **Paushkin SV, Kushnirov VV, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD.** 1996. Propagation of the yeast prion-like [psi+] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. *EMBO J* **15**:3127-3134.
6. **Baudin-Baillieu A, Legendre R, Kuchly C, Hatin I, Demais S, Mestdagh C, Gautheret D, Namy O.** 2014. Genome-wide translational changes induced by the prion [PSI+]. *Cell Rep* **8**:439-448.
7. **Halfmann R, Jarosz DF, Jones SK, Chang A, Lancaster AK, Lindquist S.** 2012. Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature* **482**:363-368.
8. **True HL, Berlin I, Lindquist SL.** 2004. Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* **431**:184-187.
9. **True HL, Lindquist SL.** 2000. A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* **407**:477-483.
10. **Tyedmers J, Madariaga ML, Lindquist S.** 2008. Prion switching in response to environmental stress. *PLoS Biol* **6**:e294.
11. **Tuite MF.** 2015. Yeast prions: Paramutation at the protein level? *Semin Cell Dev Biol* doi:10.1016/j.semcdb.2015.08.016.
12. **Wickner RB, Edskes HK, Bateman D, Kelly AC, Gorkovskiy A.** 2011. The yeast prions [PSI+] and [URE3] are molecular degenerative diseases. *Prion* **5**:258-262.
13. **Wickner RB, Shewmaker FP, Bateman DA, Edskes HK, Gorkovskiy A, Dayani Y, Bezsonov EE.** 2015. Yeast prions: structure, biology, and prion-handling systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **79**:1-17.
14. **Garcia DM, Jarosz DF.** 2014. Rebels with a cause: molecular features and physiological consequences of yeast prions. *FEMS Yeast Res* **14**:136-147.
15. **Halfmann R, Alberti S, Lindquist S.** 2010. Prions, protein homeostasis, and phenotypic diversity. *Trends Cell Biol* **20**:125-133.
16. **Newby GA, Lindquist S.** 2013. Blessings in disguise: biological benefits of prion-like mechanisms. *Trends Cell Biol* **23**:251-259.
17. **Shorter J, Lindquist S.** 2005. Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat Rev Genet* **6**:435-450.
18. **O'Farrell PH.** 2011. Quiescence: early evolutionary origins and universality do not imply uniformity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **366**:3498-3507.

19. **Daignan-Fornier B, Sagot I.** 2011. Proliferation/Quiescence: When to start? Where to stop? What to stock? *Cell Div* **6**:20.
 20. **De Virgilio C.** 2012. The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiol Rev* **36**:306-339.
 21. **Kabani M, Redeker V, Melki R.** 2014. A role for the proteasome in the turnover of Sup35p and in [PSI(+)] prion propagation. *Mol Microbiol* **92**:507-528.
 22. **von der Haar T.** 2007. Optimized protein extraction for quantitative proteomics of yeasts. *PLoS One* **2**:e1078.
 23. **Song Y, Wu YX, Jung G, Tutar Y, Eisenberg E, Greene LE, Masison DC.** 2005. Role for Hsp70 chaperone in *Saccharomyces cerevisiae* prion seed replication. *Eukaryot Cell* **4**:289-297.
 24. **Tanaka M, Chien P, Naber N, Cooke R, Weissman JS.** 2004. Conformational variations in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* **428**:323-328.
 25. **Derdowski A, Sindi SS, Klaips CL, DiSalvo S, Serio TR.** 2010. A size threshold limits prion transmission and establishes phenotypic diversity. *Science* **330**:680-683.
 26. **Redeker V, Hughes C, Savistchenko J, Vissers JP, Melki R.** 2011. Qualitative and quantitative multiplexed proteomic analysis of complex yeast protein fractions that modulate the assembly of the yeast prion Sup35p. *PLoS One* **6**:e23659.
 27. **Harrison LB, Yu Z, Stajich JE, Dietrich FS, Harrison PM.** 2007. Evolution of budding yeast prion-determinant sequences across diverse fungi. *J Mol Biol* **368**:273-282.
 28. **Kabani M, Melki R.** 2015. Sup35p in Its Soluble and Prion States Is Packaged inside Extracellular Vesicles. *MBio* **6**.
-

Text S1: Materials and Methods

Yeast strains, growth media and monitoring of prion phenotypes

The *S. cerevisiae* strains used in this study were derived from 74-D694 [MATa *ade1-14* (UGA) *trp1-289 leu2-3,112 his3Δ-200 ura3-52*] and 5V-H19 [MAT \square *SUQ5 ade2-1*(UAA) *can1-100, leu2-3,112, ura3-52*]. When indicated, these strains carried strong ($[PSI^+]^S$) or weak ($[PSI^+]^W$) $[PSI^+]$ prion variants, or no prion ($[psi^-]$). Yeast cells were grown in YPDA medium (1% yeast extract, 2% peptones, 2% glucose, 0.002% adenine). Solid media contained 2% bacto-agar. Prion phenotypes were monitored on ¼-YPD medium (0.25% yeast extract, 2% peptones, 2% glucose) via a standard color-based phenotype assay, as described before (1-3). To cure them from prions, cells were passaged twice on YPD plates containing 3 mM guanidine hydrochloride as described before (1, 2).

Induction of $[PSI^+]$ by transformation of yeast spheroplasts

Yeast 74-D694 $[psi^-]$ cells were converted to spheroplasts by lyticase treatment and then transformed with the indicated cell extracts (from ~0.1 to ~300 μg protein) in the presence of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ salmon sperm DNA and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of the *URA3*-based pRS316 plasmid, as described before (1, 2). Mock transformation reactions lacking spheroplasts and/or pRS316 ensured that no viable cells remained in the cell extracts and the absence of spontaneous $[ura^+]$ revertants.

Chronological lifespan assays

The indicated strains were grown overnight at 30°C under agitation in YPDA medium. The following day, these cultures were diluted into fresh medium and cells were allowed to divide 3-4 times at 30°C under agitation before being diluted in fresh medium again. This procedure was repeated again and ensured that all analyzed cultures were started with cells in the exponential phase of growth. Cultures (typically 1 L in large baffled bottom flasks) were then incubated at 30°C under agitation for up to 30 days and 100 μL to 1 mL aliquots were removed at the indicated time points. Tenfold serial dilutions of these aliquots were then plated in duplicate on ¼-YPD plates to count the colony-forming units (cfu) and assess the prion phenotypes of the cells. The $\text{OD}_{600\text{nm}}$ was also measured at each time point. When indicated, survival curves were normalized according to the maximal number of cfu reached by each culture which was set to 100%.

The statistical permutation tests used to perform the pairwise comparison of groups of survival curves from different strains were performed on both non-normalized and normalized data using the *Compare Groups of Growth Curves* web interface

(<http://bioinf.wehi.edu.au/software/compareCurves>), which uses the *growthcurve* function from the *statmod* software package for *R*, and according to the author's instructions (4, 5).

Preparation of cell extracts,

Total protein extracts for Western blot analysis were prepared as described previously (1, 2). Cell extracts for SDD-AGE and protein transformation assays were prepared using glass beads-beating or liquid nitrogen-grinding. For the first method, yeast cells (~20 OD_{600nm} units) were harvested by centrifugation at 4000 g for 2 min and resuspended in 500 µl of lysis buffer (100 mM Tris-Cl pH 7.5, 50 mM KCl, 10 mM β-mercaptoethanol, 1 mM PMSF and protease inhibitor cocktail, Roche Diagnostics). Glass beads were added to half the cell suspension volume and cells were broken by six cycles of vortexing for 30 s with 1 min incubation on ice between each vortexing. Debris and unbroken cells were removed by centrifugation for 2 min at 4000 x g and at 4°C. For the second method, equal numbers of cells (1-6 L of culture, depending on the growth phase) were harvested by centrifugation at 4000 x g, washed once in 1 L of ice-cold water and resuspended in one pellet volume of lysis buffer. The concentration of these cell suspensions was then adjusted to the same optical density at 600 nm. The cell slurry was then dripped into liquid nitrogen and ground to a fine powder using a liquid nitrogen-cooled Waring blender. The cell powder was then directly thawed in warm water to obtain a crude extract which was cleared from debris by two centrifugation steps at 4000 x g for 2 min and at 4°C. The lysates were then aliquoted, flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until use.

Western blots and semi-denaturant detergent agarose gel electrophoresis (SDD-AGE) analyses

These assays were performed as described previously (1, 2).

References

1. **Kabani M, Cosnier B, Bousset L, Rousset JP, Melki R, Fabret C.** 2011. A mutation within the C-terminal domain of Sup35p that affects [PSI⁺] prion propagation. *Mol Microbiol* **81**:640-658.
2. **Kabani M, Redeker V, Melki R.** 2014. A role for the proteasome in the turnover of Sup35p and in [PSI⁽⁺⁾] prion propagation. *Mol Microbiol* **92**:507-528.
3. **Chernoff YO, Lindquist SL, Ono B, Inge-Vechtsov SG, Liebman SW.** 1995. Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science* **268**:880-884.
4. **Baldwin T, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Kumar B, Smyth GK, Foote SJ, Handman E.** 2007. Wound healing response is a major contributor to the severity of cutaneous leishmaniasis in the ear model of infection. *Parasite Immunol* **29**:501-513.

5. **Elso CM, Roberts LJ, Smyth GK, Thomson RJ, Baldwin TM, Foote SJ, Handman E.** 2004. Leishmaniasis host response loci (lmr1-3) modify disease severity through a Th1/Th2-independent pathway. *Genes Immun* **5**:93-100.

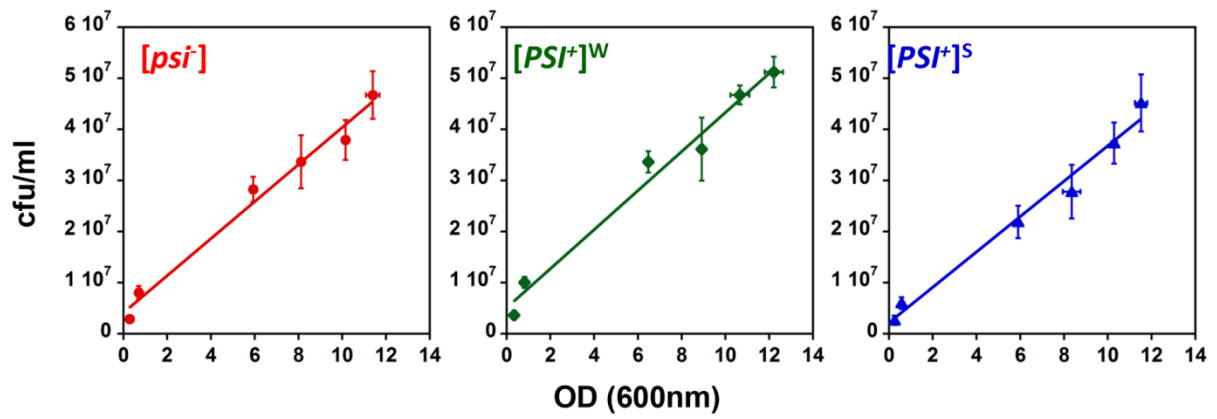


Figure S1. OD_{600nm} measurements correlate with cfu numbers in [psi⁻] and [PSI⁺] 74-D694 cells. Same as Fig. 1. A linear correlation between optical density measurements and cfu numbers was observed at OD_{600nm} < 10.

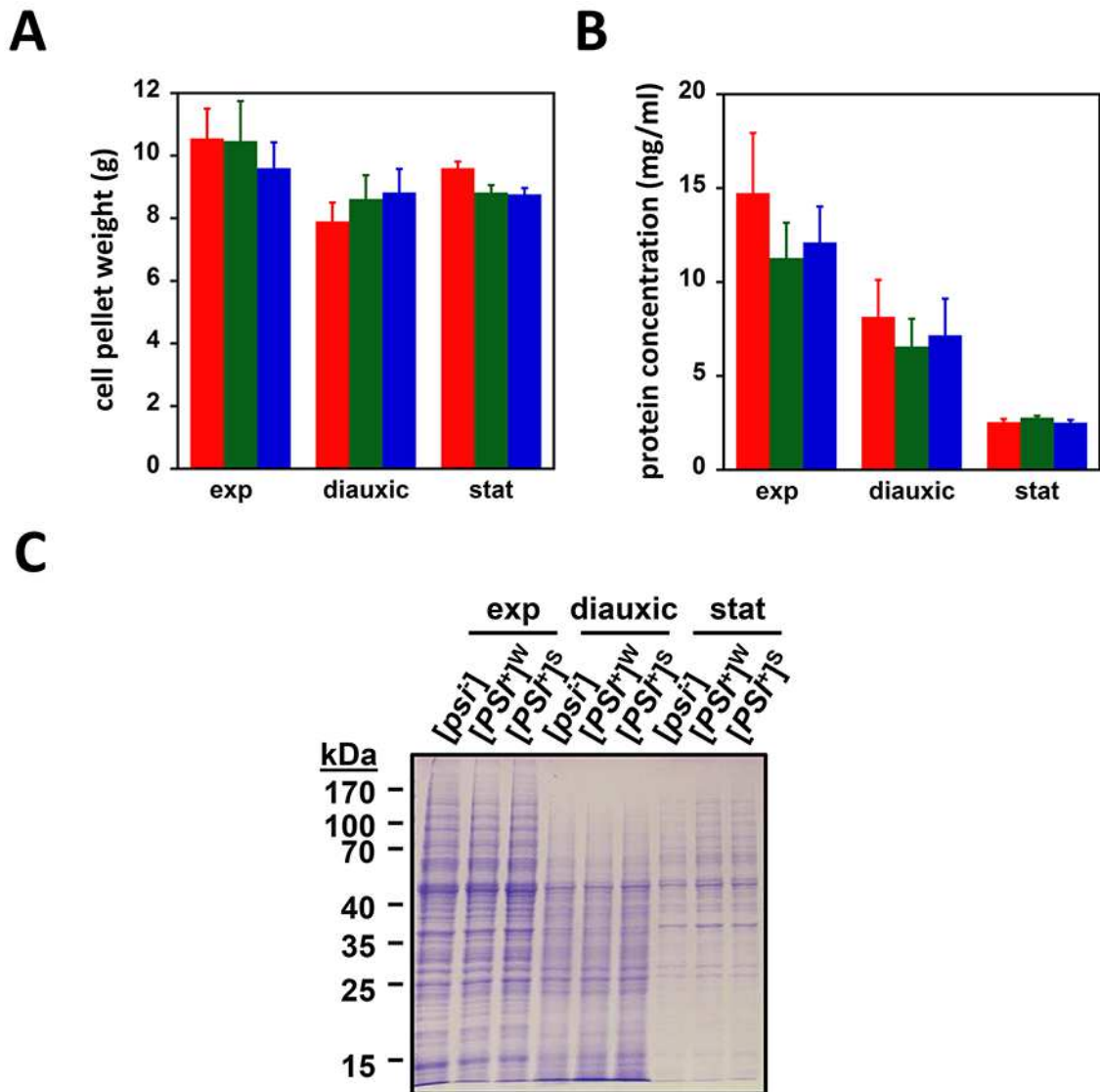


Figure S2. Characterization of the cell extracts used in this study. Exponentially growing [*psi*⁻] (red bars), [*PSI*⁺]^W (green bars) or [*PSI*⁺]^S (blue bars) 74-D694 cells were inoculated in fresh YPDA medium and incubated at 30°C under agitation. Equal numbers of cells (as determined by the OD_{600nm} and (A) the weight of the cell pellets) were harvested at the exponential, post-diauxic (48h) and stationary (7 days) phases of growth. Cell extracts were prepared by liquid nitrogen grinding and (B) their protein concentration determined (see Text S1). Data represent the mean ±SE of three independent cell extract preparations. (C) Representative cell extracts were analyzed by SDS-PAGE and coomassie blue staining.

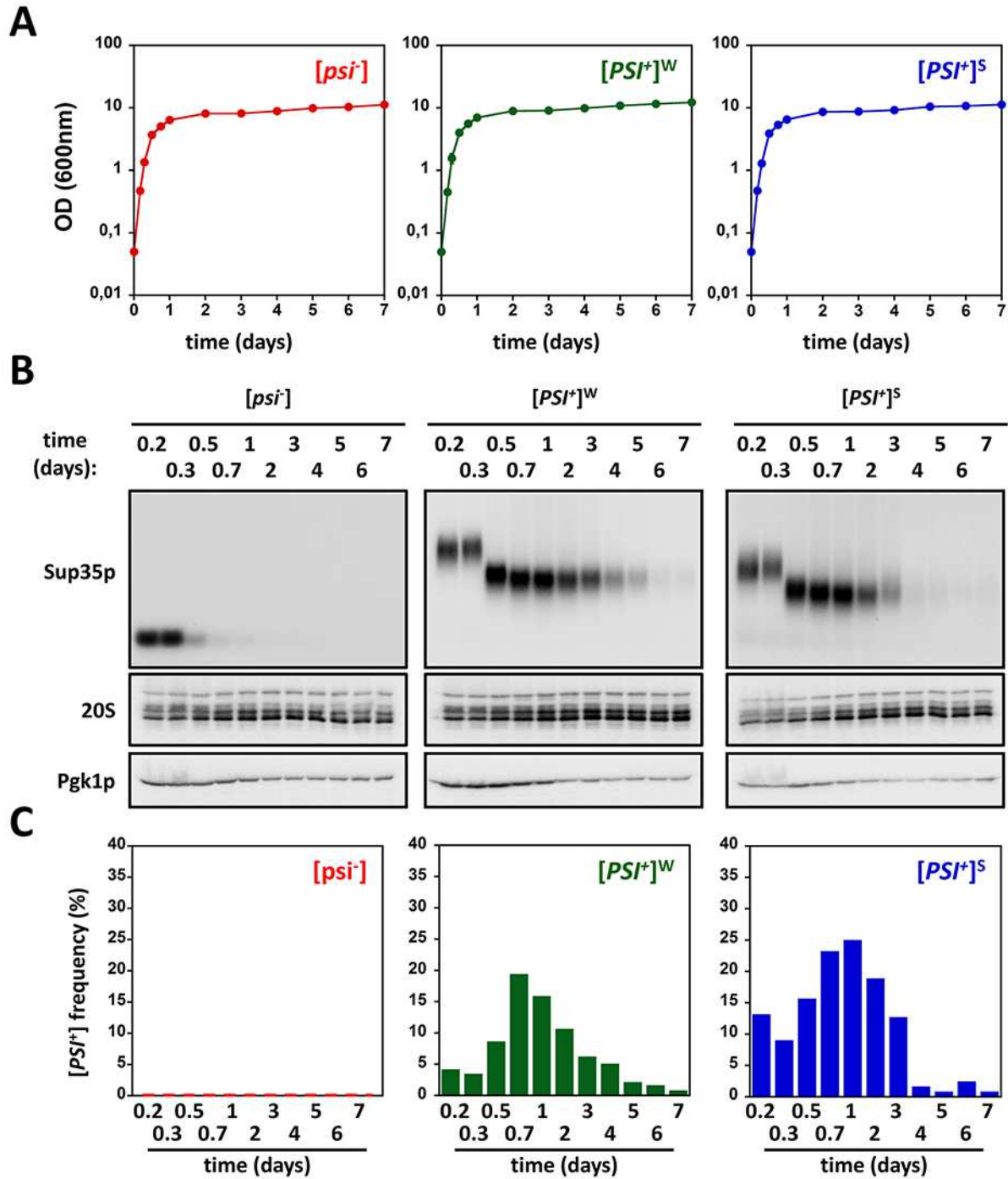


Figure S3. Figure S3. $[PSI^+]$ -associated Sup35p aggregates display a sharp decrease in size distribution and a peak of infectivity during the shift to diauxic growth. (A) Exponentially growing $[psi^-]$, $[PSI^+]^S$ or $[PSI^+]^W$ 74-D694 cells were inoculated in fresh YPDA medium in a small flat bottom flask and allowed to grow at 30°C under agitation. Aliquots were periodically removed and the optical density at 600 nm measured. Data points are the mean of two independent cultures. **(B)** At the indicated time points, equal numbers of cells were removed and cell extracts were then prepared by glass-bead beating (see Text S1). Cell extracts were analyzed by SDD-AGE (upper panels) or SDS-PAGE (middle and lower panels) and Western blotting using antibodies against the indicated proteins. **(C)** Cell extracts

prepared in (B) were transformed into [*psi*⁻] 74-D694 spheroplasts and the [*PSI*⁺] induction frequency determined (see Text S1). Bars represent the mean of two transformations with independent extract preparations.

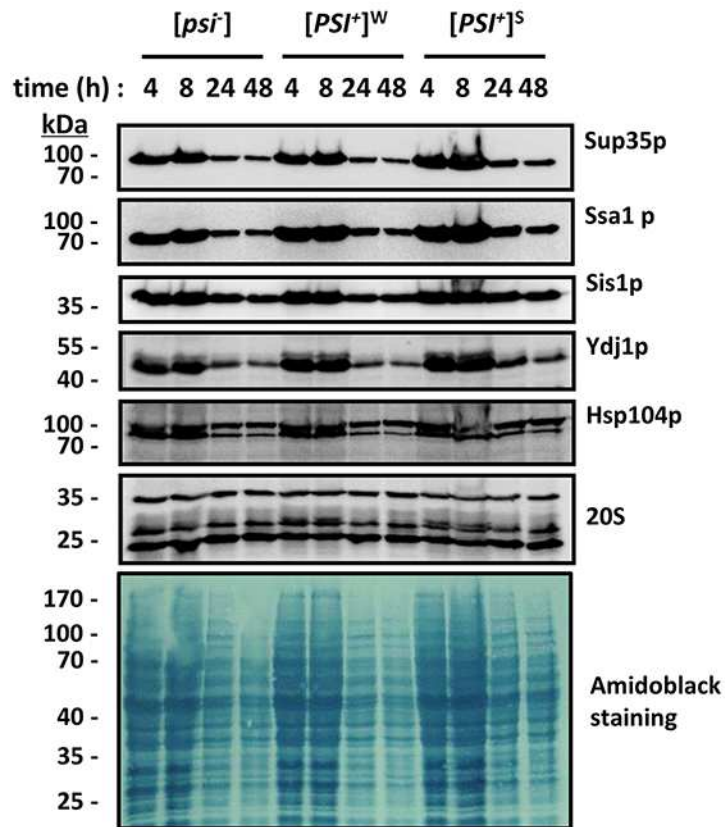


Figure S4. The intracellular levels of Sup35p and several molecular chaperones are decreased after the diauxic shift. Exponentially growing *[psi⁻]*, *[PSI⁺]^S* or *[PSI⁺]^W* 74-D694 cells were inoculated in fresh YPDA medium and incubated at 30°C under agitation. At the indicated time points, cell lysates were prepared from equal number of cells. Lysates were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies against the indicated proteins.

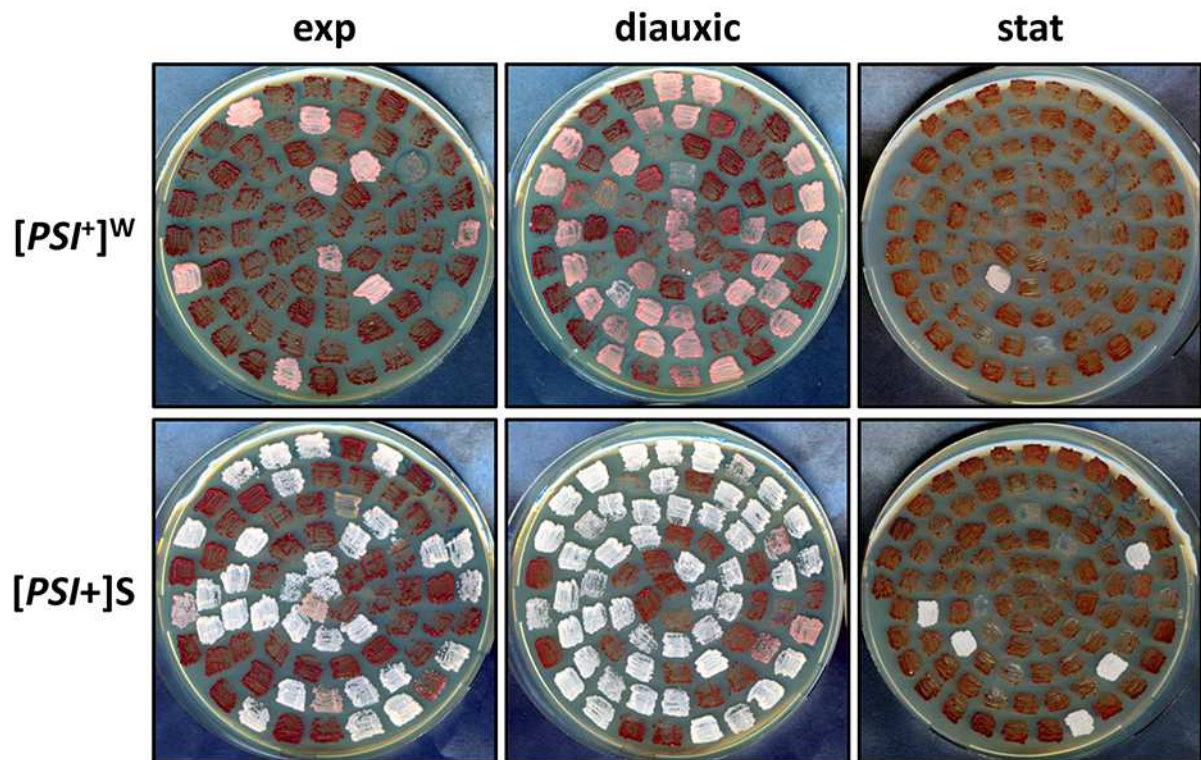


Figure S5. Infectious Sup35p prion particles retain their weak or strong identities during growth. Cells extracts representing equal numbers of cells grown to the exponential, diauxic or stationary phases of growth were transformed into *[psi⁻]* spheroplasts (see Fig. 1 legend and Text S1). Random clones from each transformation reactions were then patched on 1/4-YPD plates to assess their prion phenotype.

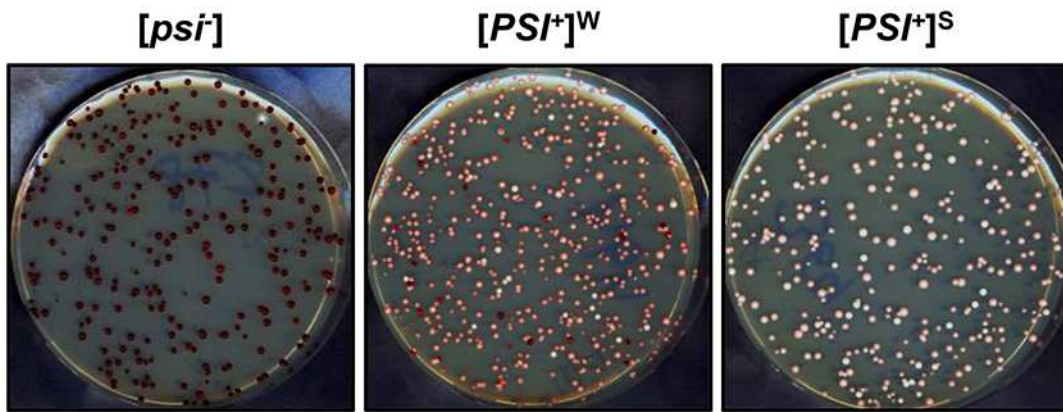


Fig. S6. The $[PSI^+]$ prion is stably maintained during stationary phase. $[psi^-]$, $[PSI^+]^S$ or $[PSI^+]^W$ 74-D694 cells incubated at 30°C under agitation for 15 days were plated on ¼-YPD plates to assess their prion phenotypes (see also Fig. 2 legend). As expected, no spontaneous formation of $[PSI^+]$ colonies occurred in the $[psi^-]$ cultures. The $[PSI^+]^S$ variant was stably maintained in all cells while the $[PSI^+]^W$ variant was lost in less than 5% of the cells.

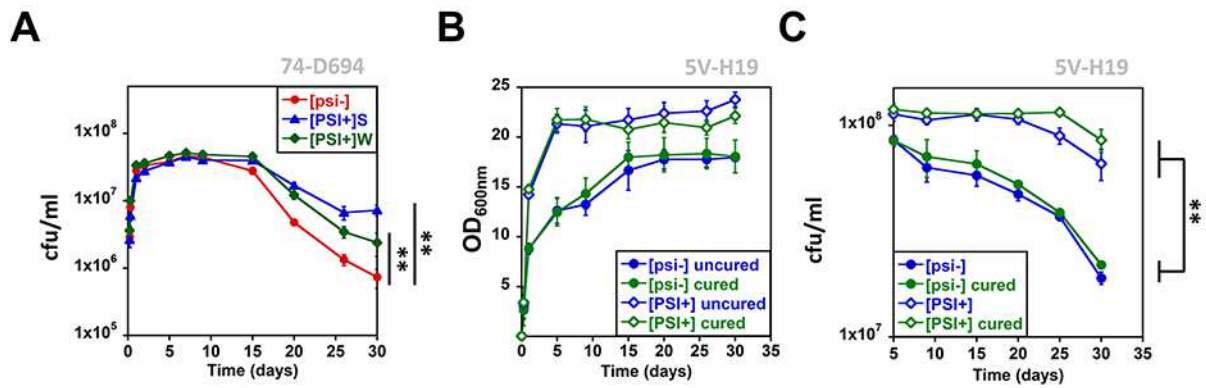


Fig. S7. $[PSI^+]$ confers a prolonged chronological lifespan in the 74-D694 and 5V-H19 backgrounds. (A) Same as Fig. 2A. Data points are the mean cfu numbers \pm SE of five independent cultures. Statistical comparison of the growth curves was performed using a permutation test (see Text S1; ** indicate p-values < 0.01). (B) Same as Fig. 2C. Optical density at 600 nm was measured over the course of the experiment. (C) Same as Fig. 2C. Data points are the mean cfu numbers \pm SE of four to six independent cultures. Statistical comparison of the growth curves was performed using a permutation test (see Text S1; ** indicate p-values < 0.01).

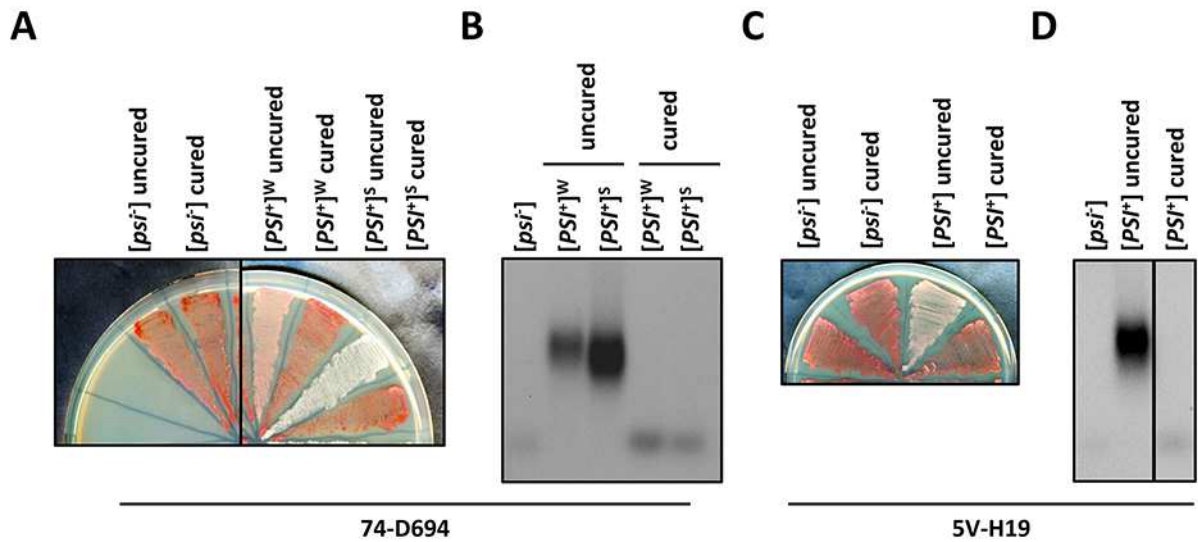


Fig. S8. Guanidium hydrochloride-treated cells are cured from the $[PSI^+]$ prion. Representative (A) 74-D694 or (C) 5V-H19 $[psi^-]$ and $[PSI^+]$ clones, either left untreated or treated with guanidium hydrochloride (see Text S1), were streaked on $\frac{1}{4}$ -YPD plates to assess their prion phenotypes. (B, D) Cell lysates from these clones were analyzed by SDD-AGE followed by immunoblotting using anti-Sup35p antibodies.

Les limites de l'utilisation de fusions GFP pour l'étude de [*PSI*⁺]

Afin de visualiser au niveau cellulaire les changements subis par les particules de prion [*PSI*⁺] au cours des différentes phases de croissance (article 2), nous avons voulu tirer profit de l'existence de versions de Sup35p portant une étiquette GFP et facilement observable par microscopie à fluorescence.

Les différentes constructions de Sup35-GFP décrites dans la littérature sont présentées dans la Figure 34. Le gène codant pour Sup35^{NM}-GFP est porté par un plasmide et placé sous le contrôle du promoteur *GALI-10* (pH317/NMG), inductible par le galactose (Patino et al., 1996). Deux constructions similaires basées sur l'expression de la protéine Sup35p entière sous contrôle de son propre promoteur ont été décrites (Satpute-Krishnan and Serio, 2005; Song et al., 2005). La fusion de Sup35p à la GFP est problématique car l'insertion de la GFP en N-terminal ou en C-terminal de Sup35p est létale pour les cellules en l'absence d'un gène *SUP35* sauvage. Seule l'insertion de la GFP entre les domaines N et M est capable d'assurer la viabilité d'un mutant *sup35* (Song et al., 2005). La construction Sup35-GFP issue du laboratoire de Daniel Masison est portée par un plasmide alors que celle issue du laboratoire de Tricia Serio est intégrée dans le chromosome de levure au locus *SUP35* (et remplace donc le gène sauvage). Pour notre étude, nous avons privilégié cette dernière construction car elle se rapproche le plus de la situation rencontrée dans une souche sauvage et parce qu'elle a été réalisée dans le même fond génétique (74-D694) que celui de la majorité des souches utilisées dans notre laboratoire (article 2).

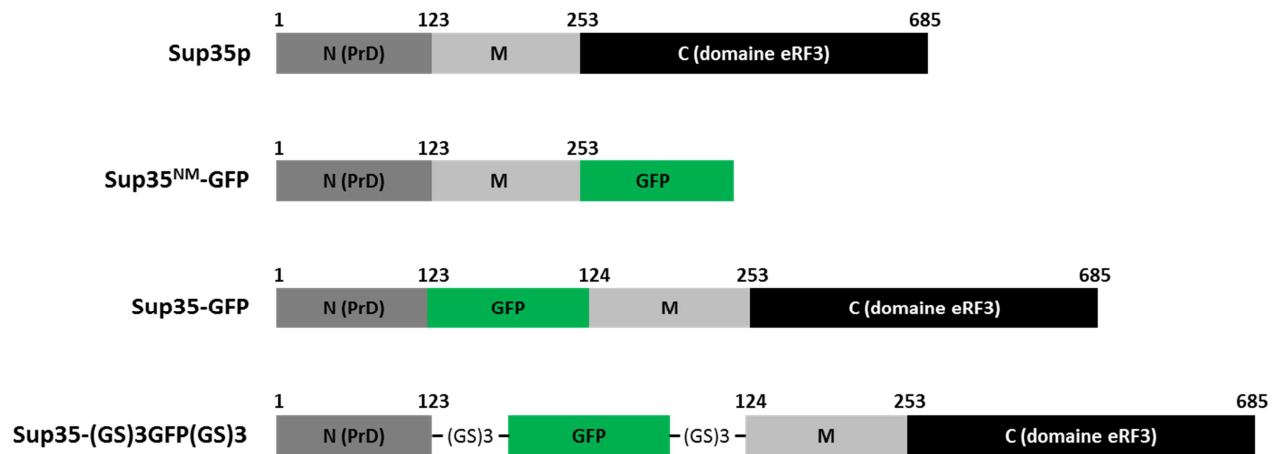


Figure 34 Les différentes constructions de Sup35-GFP.

L'organisation en domaines de Sup35p (Glover et al., 1997), Sup35^{NM}-GFP (Patino et al., 1996), Sup35-GFP (Song et al., 2005) et Sup35-(GS)3GFP(GS)3 (Satpute-Krishnan and Serio, 2005) sont respectivement présentées de haut en bas. Les domaines PrD, M, C de Sup35p et la GFP sont représentés respectivement en gris foncé, gris clair, noir et vert. Les deux linkers de trois répétitions de glycine-sérine de part et d'autre de la GFP dans Sup35-(GS)3GFP(GS)3 sont indiqués.

Afin de visualiser les agrégats de Sup35p dans les cellules, nous avons obtenu une souche *sup35GFP* [*PSI*⁺] en transformant des sphéroplastes [*psi*⁻] par des lysats cellulaires issus de la souche 74-D694 [*PSI*⁺]^S. Le phénotype prion et l'état d'agrégation de Sup35p dans la souche *sup35GFP* ont été vérifiés respectivement sur milieu ¼ YPD et par SDD-AGE (Figure 35).

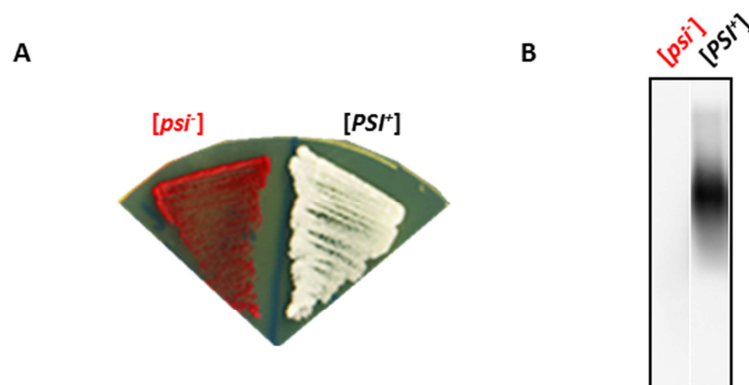


Figure 35 [*PSI*⁺] est toxique dans la souche Sup35-GFP

A) Phénotypes des souches *sup35GFP* [*psi*⁻] et [*PSI*⁺] sur milieu ¼ YPD.

B) SDD-AGE des extraits des cellules *sup35GFP* [*psi*⁻] et [*PSI*⁺] suivi par un western blot avec des anticorps anti-Sup35p.

Comme rapporté par d'autres études (Satpute-Krishnan and Serio, 2005; Song et al., 2005), les cellules [*psi*⁻] présentent une fluorescence uniforme et diffuse (Figure 36), alors que dans les cellules [*PSI*⁺], les agrégats de Sup35GFP se manifestent par de nombreux foci de

fluorescence (Figure 36). Lors de la transition diauxique et de l'entrée en phase stationnaire, la fluorescence détectable s'atténue progressivement, conformément à la baisse de la quantité de Sup35p dans ces conditions (voir article 2). Cependant, dans de nombreuses cellules une forte fluorescence persiste et semble localisée dans les vacuoles (Figure 36, phase stationnaire). Nous n'avons pas poussé la caractérisation de ces cellules, mais nous supposons que dans celles-ci la dégradation de Sup35GFP (par le protéasome ou par autophagie dans la vacuole) libère la protéine GFP qui s'accumule alors dans la vacuole. Dans les cellules [*PSI*⁺], les agrégats de Sup35GFP persistent lors de la transition diauxique et en phase stationnaire mais les foci de fluorescence sont plus gros et moins nombreux (Song et al., 2005). Ainsi, les changements ultra-structuraux subis par les polymères de Sup35p (article 2) sont associés à des changements macroscopiques dans la distribution des agrégats au cours de la croissance (Song et al., 2005). Là encore, des cellules présentant une fluorescence vacuolaire sont fréquemment détectées, suggérant que dans certaines cellules les agrégats formés par Sup35GFP sont dégradés par le protéasome (Kabani et al., 2014) ou par autophagie.

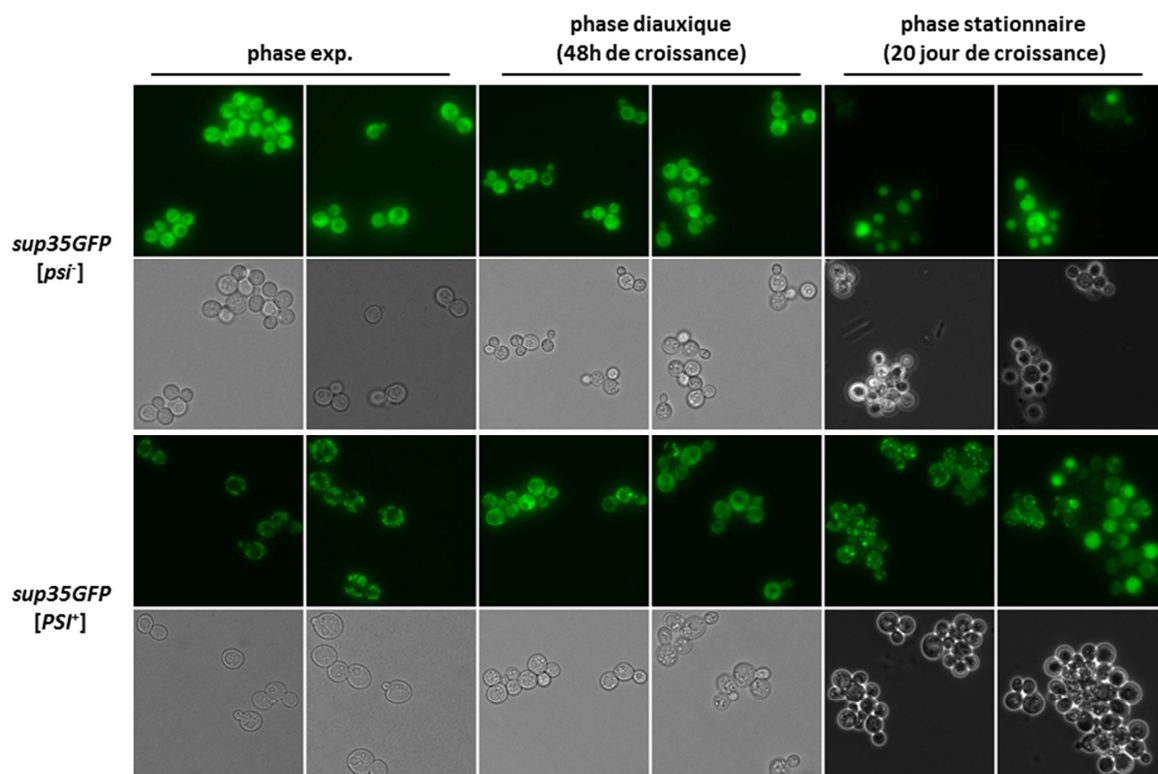


Figure 36 Analyse en microscopie à fluorescence de la distribution intracellulaire de Sup35GFP dans des cellules [*psi*⁻] et [*PSI*⁺] au cours de la croissance.

Le bleu trypan permet de discriminer les cellules vivantes, qui vont rejeter le colorant, des cellules mortes qui vont l'accumuler (Kucsera et al., 2000). Pour évaluer l'effet de la présence

du prion $[PSI^+]$ sur la survie cellulaire à long terme, nous avons coloré des cellules *sup35GFP* $[psi^-]$ et $[PSI^+]$ après 30 jours de culture au bleu trypan (Kucsera et al., 2000). Nous avons constaté que la proportion de cellules mortes était bien plus élevée dans les cultures *sup35GFP* $[PSI^+]$ que $[psi^-]$ (Figure 37).

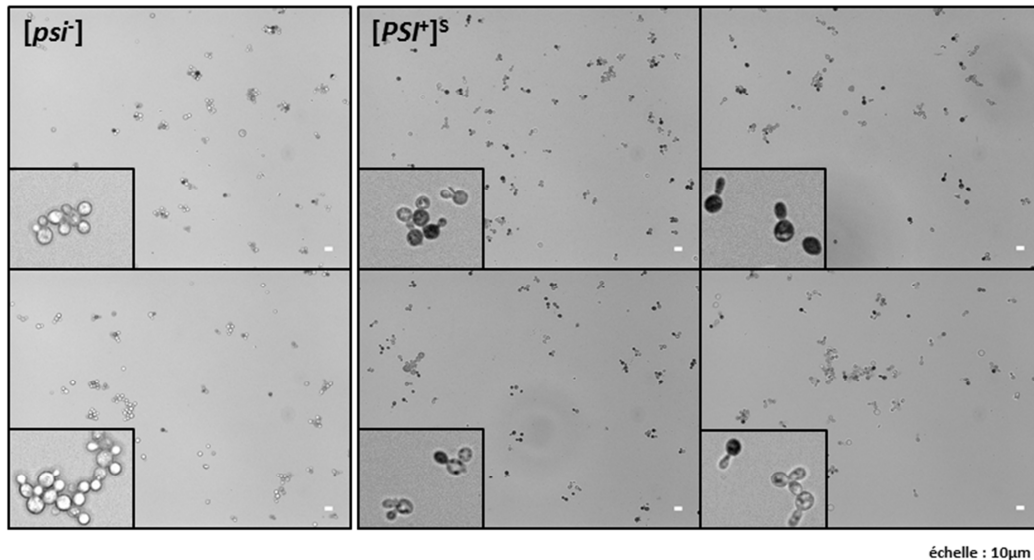


Figure 37 Test au bleu trypan sur des cellules *Sup35GFP* $[psi^-]$ et $[PSI^+]$ cultivées pendant 30j en milieu YPDA

Des analyses ultérieures ont montré une mortalité non négligeable des cellules *sup35GFP* $[PSI^+]$, quelle que soit la phase de croissance étudiée, y compris dans des colonies isolées prélevées sur boîtes de Petri (résultats non montrés). La complémentation de la souche *sup35GFP* $[PSI^+]$ par un plasmide permettant l'expression constitutive du domaine C-terminal de Sup35p supprime fortement cette mortalité des cellules (résultats non montrés). Cette mortalité semble donc être due à une moins bonne fonctionnalité de la protéine de fusion *Sup35GFP* par rapport à la protéine sauvage. Dans les cellules $[psi^-]$, ce défaut passe inaperçu car toute la protéine *Sup35GFP* demeure disponible pour assurer ses fonctions dans la fidélité de la terminaison de la traduction. Par contre, dans les cellules $[PSI^+]$, la majorité de *Sup35GFP* est associée aux agrégats, et les molécules solubles disponibles ne semblent pas capables d'assurer la viabilité de façon efficace.

La fonction de *Sup35GFP* étant compromise dans des cellules $[PSI^+]$, nous n'avons pas pu utiliser ces souches dans des expériences de survie à long terme. Ces observations montrent que les conclusions tirées de l'utilisation de l'allèle *sup35GFP* doivent être prises avec précaution malgré le fait qu'il permet d'assurer la viabilité de cellules *sup35Δ* et de propager $[PSI^+]$.

**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

Les prions de levure sont des agrégats protéiques qui se propagent de cellule en cellule lors de la division cellulaire, lors d'un croisement sexuel, et peut-être par transfert horizontal médié par des vésicules extracellulaires (Kabani and Melki, 2016).

Au niveau d'une cellule de levure individuelle, ces agrégats sont reconnus comme des structures anormales devant être prises en charge et éventuellement éliminées, afin de prévenir des interactions délétères avec des constituants cellulaires. Il n'est donc pas étonnant que plusieurs mécanismes de contrôle-qualité soient impliqués dans le contrôle de la formation, de la propagation et de l'élimination de ces prions, notamment les chaperons moléculaire Hsp70/40/104 ou le système UPS (Chernova et al., 2014; Kim et al., 2013; Liebman and Chernoff, 2012).

Les prions de levure seraient également des modulateurs épigénétiques de l'expression génique permettant une adaptation rapide aux changements environnementaux (Chernova et al., 2014; March et al., 2016). Ainsi, lorsque l'on considère les levures comme une population de cellules, certains prions peuvent induire l'apparition de traits bénéfiques permettant la survie de certains individus de cette population face à des conditions environnementales critiques (stress, carence nutritive prolongée, etc.).

Ainsi les prions fongiques pourraient constituer « un mal pour un bien » pouvant expliquer leur conservation au cours de l'évolution.

Mes projets de thèse m'ont amené à m'intéresser à ces deux visions apparemment opposées des prions de levure. D'une part, nous avons cherché à documenter l'articulation entre chaperons moléculaires et système UPS dans la dégradation des prions de levure. D'autre part, nous avons documenté l'évolution des propriétés et les conséquences physiologiques des agrégats de $[PSI^+]$ au cours de la croissance et du vieillissement d'une population.

I Principaux résultats et conclusions

Dans une première partie, nous avons comparé la dégradation protéasomale de Sup35p et Ure2p, deux protéines prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 38) (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). Nous avons montré que le turnover *in vivo* de la protéine prion Ure2p dépend de l'activité du protéasome. Nous avons évalué ensuite si les formes solubles et fibrillaires d'Ure2p sont des substrats du protéasome 26S *in vitro*. Nous avons pu montrer que

la forme soluble de Ure2p est dégradée par le protéasome de manière ubiquitine-indépendante. Comme observé précédemment pour Sup35p, la dégradation de la forme soluble d'Ure2p est initiée par son domaine PrD et entraîne la libération de peptides amyloïdes (Wang et al., 2015). En outre, nous avons montré que la suppression des résidus 3-25 du PrD abolit complètement la dégradation, ce qui suggère que cette région sert de motif de reconnaissance par le protéasome 26S pour sa dégradation (Wang et al., 2015). Alors que les fibres amyloïdes formées par Sup35p peuvent être dégradées par le protéasome (Kabani et al., 2014), ce n'est pas le cas des fibres d'Ure2p dans lesquelles la protéine prion est dans un état quasi-natif (Habenstein et al., 2012). Les différences structurales entre les assemblages de haut poids moléculaires formés par les prions de levure pourraient donc dicter leurs capacités à être reconnues et dégradées par le protéasome (ou d'autres mécanismes protéolytiques) (Figure 38).

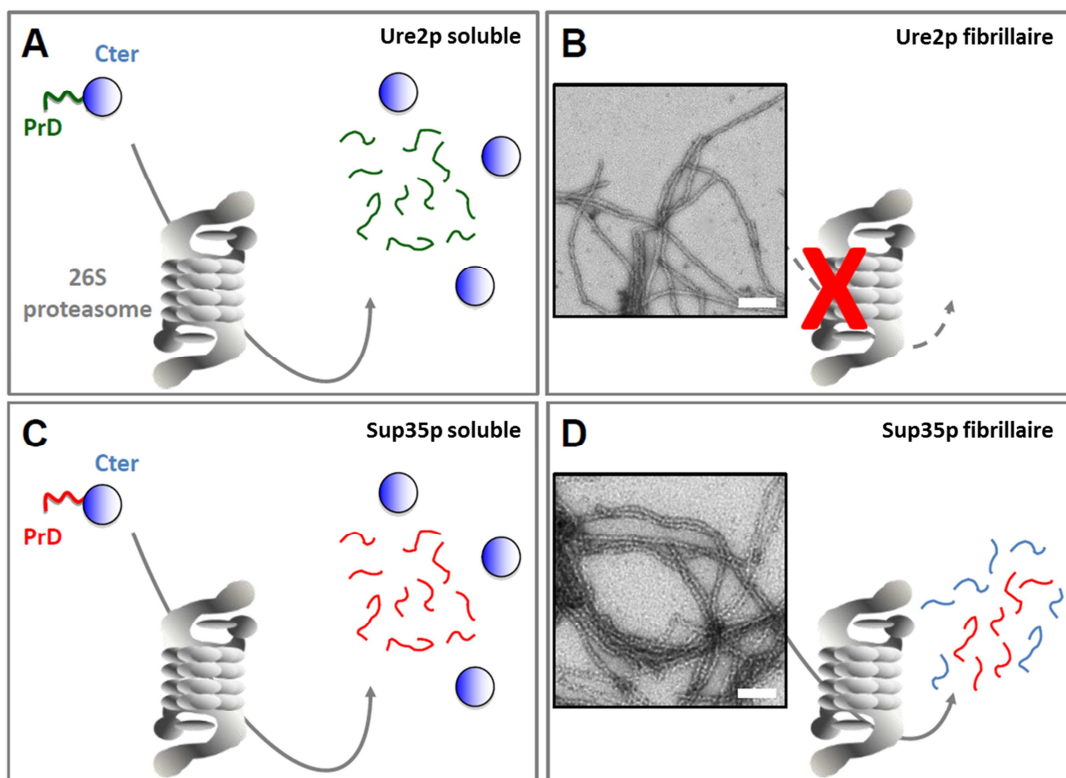


Figure 38 Représentation schématique de la dégradation protéasomale des formes soluble et fibrillaire de Sup35p et Ure2p. (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015)

L'étude des effets des chaperons moléculaires sur la dégradation protéasomale des prions de levure n'a malheureusement pas été conclusive, en raison de limitations techniques liées à l'approche biochimique que nous avons choisie (voir Résultats 1.2).

Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à l'évolution des propriétés des agrégats de Sup35p ainsi qu'à leurs conséquences physiologiques au cours du vieillissement chronologique d'une population de levures. Nous avons tout d'abord montré que les agrégats de Sup35p subissent d'importants changements ultra-structuraux et fonctionnels lorsque les cellules passent d'une phase de division active à une croissance diauxique plus lente : la quantité de Sup35p diminue progressivement ; la taille des polymères constituant les agrégats de Sup35p diminue ; la capacité infectieuse de ces agrégats augmente fortement. Lorsque les cellules entrent en phase stationnaire, les polymères constituant les agrégats de Sup35p (lorsque ceux-ci sont détectables) retrouvent une taille comparable à celle observée dans des cellules en phase exponentielle. La capacité infectieuse de ces agrégats demeure néanmoins très faible. Ces changements de taille et de propriétés infectieuses pourraient être liés à une modification de l'équilibre entre les espèces soluble et agrégées de Sup35p et les composants du CQP, notamment à cause de l'atténuation traductionnelle qui a lieu lorsque les cellules poussent plus lentement ou cessent de croître. Il est important de souligner que les changements subis par les particules prions de Sup35p ne modifient pas l'information structurale qu'elles portent et qui permet de générer différentes souches de prion. Nos résultats montrent que les prions de levure sont constamment remodelés en fonction de l'état physiologique des cellules, et ce même en absence de division cellulaire.

Nous avons découvert que les cellules [PSI^+] peuvent survivre plus longtemps que les cellules [psi^-] en phase stationnaire, et ce dans deux fonds génétiques différents. Lorsque [PSI^+] est éliminé des cellules par un traitement à la guanidine, les cellules curées conservent cependant cet avantage sélectif. Nos résultats confirment que [PSI^+] facilite l'acquisition rapide de traits bénéfiques nouveaux qui sont ensuite fixés de manière permanente dans le génome par des mécanismes restant à élucider.

Une durée de vie prolongée dans des conditions de carence nutritive constitue certainement l'un des avantages sélectifs principaux pouvant être conférés par [PSI^+]. Cela pourrait expliquer le fait qu'après un milliard d'années d'évolution fongique, les orthologues de Sup35p chez des levures proches (e.g. *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces paradoxus*) ou éloignées (e.g. *Candida albicans*, *Yarrowia lipolytica*) de *S. cerevisiae* possèdent des domaines de type PrD riches en Q/N leur conférant en théorie la capacité de former et propager [PSI^+] (Harrison et al., 2007). Il est intéressant de noter que les protéines eRF3, homologues de Sup35p chez les eucaryotes supérieurs et chez l'Homme en particulier,

semblent avoir perdu cette capacité de conversion en une forme prion. On peut supposer que l'apparition de cellules « $[eRF3^+]$ » chez un organisme complexe, organisé en organes multicellulaires aux fonctions précises et coordonnées, pourrait avoir de graves conséquences. Cela pourrait par exemple conduire au développement anarchique de certaines cellules au détriment des cellules environnantes et échappant aux mécanismes de régulation de la prolifération cellulaire. De telles situations sont rencontrées dans des pathologies graves comme les cancers.

II Perspectives

Les résultats obtenus au cours de cette thèse et résumés ci-dessus ont apporté de nouvelles connaissances sur la biologie des prions de levure. Ils soulèvent également plusieurs questions qui pourront faire l'objet d'études ultérieures.

Les domaines intrinsèquement désordonnés présents dans les protéines prions ou non-prions constituent-ils des motifs de reconnaissance pour leur dégradation par le protéasome ? La structuration des PrD ou les interactions intra- ou intermoléculaires qu'ils établissent au sein d'assemblages macromoléculaires empêchent-elles la reconnaissance par le protéasome ?

La dégradation protéasomale *in vitro* de Sup35p et Ure2p sous leur forme soluble semble reposer sur le même mécanisme. En effet, la dégradation protéasomale de ces deux protéines prions est initiée par leur PrD, domaines intrinsèquement désordonnés et riches en Q/N (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). L'élimination du domaine PrD abolit complètement la dégradation de ces deux protéines. De plus, la dégradation procède en deux étapes : une protéolyse rapide des PrD suivie d'une protéolyse plus lente des domaines C-terminaux structurés. Ces derniers, plus résistants à l'action du protéasome, doivent probablement être dépliés avant que la protéolyse puisse avoir lieu. De plus, la dégradation de Sup35p et Ure2p ne requiert pas l'ubiquitination de ces deux protéines, tout du moins *in vitro* (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015).

Il a été montré que la présence d'un fragment désordonné au sein de certaines protéines constitue un motif suffisant pour leur dégradation par le protéasome sans ubiquitination préalable (Baugh et al., 2009; Yu et al., 2016). 30% des protéines (y compris les protéines prions) sont classées comme des protéines intrinsèquement désordonnées dans les cellules eucaryotes (Dunker et al., 2008). Ces protéines contiennent des fragments flexibles dont la

composition en acides aminés est très variable. Les contributions relatives de la structure désordonnée de ces domaines et de leur composition en acides aminés comme motifs de reconnaissance pour la dégradation par le protéasome restent à déterminer, ainsi que les mécanismes de reconnaissance et d'adressage au protéasome proprement dits. Nous avons montré que le protéasome 26S contrôle le turnover de Sup35p et Ure2p *in vivo*. Néanmoins, le turnover cellulaire de ces protéines est très lent (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). Si le mécanisme de dégradation *in vivo* est similaire à nos observations en tubes à essai, ces observations suggèrent que les PrD ne sont pas aisément accessibles au protéasome. D'autres protéines possédant des domaines intrinsèquement désordonnés, comme par exemple des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine ou la régulation de la transcription, ne sont pas non plus systématiquement dégradées par le protéasome (Dunker et al., 2008).

Il existe donc des mécanismes de protection qui empêchent la reconnaissance de ces protéines par le protéasome. La formation de complexes intermoléculaires avec leurs partenaires (e.g. Sup45p pour Sup35p, Gln3p pour Ure2p), voire de liaisons intramoléculaires (e.g. lors de l'assemblage de Ure2p en fibres), pourrait masquer le domaine prion ou entraîner la structuration de ce dernier.

Ainsi, les protéines prions, par leur capacité à adopter différentes conformations via leur PrD, constituent un excellent outil pour caractériser les mécanismes de dégradation protéasomale de protéines à domaines intrinsèquement désordonnés.

Quel est le mécanisme de dégradation des agrégats de prions ?

La dégradation protéasomale des fibres de Sup35p et Ure2p semble dépendre de la structure des fibres (voir la partie Principaux résultats et conclusions). Les différentes protéines prions peuvent former des fibres ayant des organisations structurales différentes (voir 3.2.3.1). La dégradation protéasomale de différents types de fibres peut suivre différents mécanismes. Dans les structures de type amyloïde (e.g. fibres de Sup35p) tout le domaine PrD n'est pas impliqué dans la formation du cœur amyloïde (Luckgei et al., 2013; Schütz et al., 2014). Une partie du PrD pourrait conserver une structure flexible et accessible par le protéasome. En revanche, lorsque le PrD est totalement structuré ou inaccessible au sein des fibres (e.g. fibres de Ure2p), il pourrait échapper à la reconnaissance par le protéasome (Wang et al., 2015).

La situation pourrait être beaucoup plus complexe dans un contexte cellulaire, en nécessitant par exemple l'intervention de nombreux acteurs du CQP ou en dépendant de facteurs environnementaux. Ainsi, l'organisation structurale des particules infectieuses et agrégats formés par ces prions dans les cellules n'est pas connue et pourrait être très différente de ce

qui est observé avec des protéines purifiées. Il a été proposé que le protéasome soit principalement localisé dans le noyau dans des cellules en division active (Russell et al., 1999; Wójcik and DeMartino, 2003), ce qui l'empêche en théorie de « voir » les prions de levures cytoplasmiques. En revanche, lors de l'entrée en phase stationnaire, le protéasome est relocalisé au cytoplasme, principalement sous la forme de PSG (*proteasome storage granules*) (Laporte et al., 2008), où il pourrait avoir une activité protéolytique transitoire vis-à-vis de certaines protéines. De plus, les PSGs sont transitoirement associés à des inclusions protéiques de type IPOD contenant justement des protéines agrégées (Peters et al., 2016). D'autres mécanismes protéolytiques pourraient également intervenir dans l'élimination de certains prions et en particulier l'autophagie qui semble empêcher la formation de novo de $[PSI^+]$ (Speldewinde et al., 2015).

Est-ce que les peptides amyloïdes libérés par la dégradation de protéines prions ont une influence sur les cellules ?

La dégradation des protéines Sup35p et Ure2p génère de nombreux peptides amyloïdes issus du domaine PrD riche en Q/N (Kabani et al., 2014; Wang et al., 2015). De tels peptides pourraient résister à l'action de peptidases cellulaires, par exemple en raison de leur composition biaisée en acides aminés ou de leur agrégation rapide. L'agrégation de ces peptides pourrait interférer avec des constituants ou fonctions cellulaires, voire avoir un effet « $[PIN^+]$ » en facilitant l'agrégation d'autres protéines. L'accumulation et l'agrégation cryptique de tels peptides pourraient ainsi constituer des marqueurs de vieillissement. En accord avec cette hypothèse, des peptides riches en Q (mimant les peptides libérés par la dégradation protéasomale de la huntingtine) exprimés dans des cellules échappent aux systèmes de dégradation, s'agrègent et sont cytotoxiques (Raspe et al., 2009). Il serait donc intéressant de déterminer si de tels peptides sont produits *in vivo* et si oui, de documenter leurs effets sur la croissance des levures et sur la formation et la propagation des prions de levure.

Quelles sont les contributions relatives de $[PSI^+]$ et des autres prions de levure dans la plasticité phénotypique et l'acquisition de traits nouveaux ?

Les souches de prion $[PSI^+]$ sur lesquelles nous travaillons au laboratoire ne sont pas cytotoxiques et confèrent même une durée de vie prolongée dans des conditions de phase stationnaire (article 2). Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres laboratoires et suggèrent un rôle de certains prions de levure dans l'acquisition de nouveaux traits facilitant

la survie lorsque les conditions environnementales deviennent subitement plus difficiles (Halfmann and Lindquist, 2010; Halfmann et al., 2012a; True and Lindquist, 2000; True et al., 2004; Tyedmers et al., 2008).

L'importance de ces observations comme mécanisme évolutif à part entière rencontre une forte opposition de la part de certains scientifiques (Wickner and Kelly, 2016). A cause notamment de la rareté des prions dans la nature et de la forte toxicité de la plupart des variants de prions, ces chercheurs considèrent que les prions sont essentiellement soumis à une pression de sélection négative (Wickner and Kelly, 2016 ; McGlinchey et al., PNAS 2011). Cette pression de sélection évolutive s'exerce à la fois sur leur séquence en acides aminés mais également sur les différents variants pouvant être formés (Wickner and Kelly, 2016).

La sélection au niveau génétique peut conduire à des polymorphismes des séquences d'ADN par mutations. Ces mutations, en changeant la séquence en acides aminés, peuvent être responsables de l'établissement de barrières d'espèces limitant la transmission des prions (Wickner and Kelly, 2016). En raison des fonctions qu'ils remplissent, les domaines non-prions sont beaucoup plus conservés que leurs domaines prions correspondants (Bateman and Wickner, 2012; Baudin-Baillieu et al., 2003; Edskes and Wickner, 2002; Kelly et al., 2012). Cependant, les domaines PrD pourraient aussi contribuer à la fonction des protéines qui les contiennent, ce qui pourrait expliquer leur conservation au cours de l'évolution, leurs rôles dans la formation de prions étant alors considérés comme opportuniste (Wickner and Kelly, 2016).

La sélection au niveau protéique peut conduire à une diversité phénotypique par la formation des souches de prions. Différentes souches de prions ayant la même séquence en acides aminés peuvent produire des effets dramatiquement différents sur l'organisme hôte (Halfmann and Lindquist, 2010; Wickner and Kelly, 2016). La formation d'espèces cytotoxiques par les protéines prions pourrait expliquer leur contre-sélection dans la nature et la mise en place de mécanismes cellulaires permettant leur élimination, et ce malgré les effets bénéfiques qu'ils peuvent avoir dans certaines conditions (Wickner and Kelly, 2016).

Les processus évolutifs sont lents et reposent sur des changements stochastiques de l'expression génique soumis ou non à une pression de sélection permettant ou non leur fixation dans la population. Les conditions dans lesquelles les prions fongiques pourraient exercer des effets bénéfiques sur leurs cellules hôtes pourraient être trop rares ou trop transitoires pour qu'ils puissent se maintenir et être retrouvés plus fréquemment. De plus, les effets bénéfiques induits par ces prions peuvent être fixés de façon permanente dans le

génomique des cellules et ne nécessitent plus la présence physique du prion ce qui rend leur détection plus difficile (article 2) (Halfmann and Lindquist, 2010; Halfmann et al., 2012a; True and Lindquist, 2000; True et al., 2004; Tyedmers et al., 2008). Afin de mieux appréhender la nature générique ou anecdotique de ces phénomènes, il faudrait à l'avenir obtenir plus de données expérimentales sur les nombreux prions identifiés chez la levure, à la fois dans des souches et des conditions contrôlées de laboratoire, mais également dans des souches sauvages issues de différentes niches écologiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramova, N., Sertil, O., Mehta, S., and Lowry, C.V. (2001). Reciprocal Regulation of Anaerobic and Aerobic Cell Wall Mannoprotein Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *183*, 2881–2887.
- Aguzzi, A., and Calella, A.M. (2009). Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases. *Physiol. Rev.* *89*, 1105–1152.
- Ahmad, A., Bhattacharya, A., McDonald, R.A., Cordes, M., Ellington, B., Bertelsen, E.B., and Zuiderweg, E.R. (2011). Heat shock protein 70 kDa chaperone/DnaJ cochaperone complex employs an unusual dynamic interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 18966–18971.
- Aigle, M., and Lacroute, F. (1975). Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol. Gen. Genet. MGG* *136*, 327.
- Alberghina, L., Mavelli, G., Drovandi, G., Palumbo, P., Pessina, S., Tripodi, F., Coccetti, P., and Vanoni, M. (2012). Cell growth and cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*: Basic regulatory design and protein–protein interaction network. *Biotechnol. Adv.* *30*, 52–72.
- Alberti, S., Halfmann, R., King, O., Kapila, A., and Lindquist, S. (2009). A Systematic Survey Identifies Prions and Illuminates Sequence Features of Prionogenic Proteins. *Cell* *137*, 146–158.
- Alkalaeva, E.Z., Pisarev, A.V., Frolova, L.Y., Kisselev, L.L., and Pestova, T.V. (2006). In Vitro Reconstitution of Eukaryotic Translation Reveals Cooperativity between Release Factors eRF1 and eRF3. *Cell* *125*, 1125–1136.
- Allen, C., Büttner, S., Aragon, A.D., Thomas, J.A., Meirelles, O., Jaetao, J.E., Benn, D., Ruby, S.W., Veenhuis, M., Madeo, F., et al. (2006). Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J. Cell Biol.* *174*, 89–100.
- Allen, K.D., Wegrzyn, R.D., Chernova, T.A., Müller, S., Newnam, G.P., Winslett, P., Wittich, K., Wilkinson, K.D., and Chernoff, Y.O. (2005). Hsp70 Chaperones as Modulators of Prion Life Cycle: Novel Effects of Ssa and Ssb on the *Saccharomyces cerevisiae* Prion [PSI⁺]. *Genetics* *169*, 1227–1242.
- Allen, K.D., Chernova, T.A., Tennant, E.P., Wilkinson, K.D., and Chernoff, Y.O. (2007). Effects of Ubiquitin System Alterations on the Formation and Loss of a Yeast Prion. *J. Biol. Chem.* *282*, 3004–3013.
- Anfinsen, C.B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* *181*, 223–230.
- Aragon, A.D., Rodriguez, A.L., Meirelles, O., Roy, S., Davidson, G.S., Tapia, P.H., Allen, C., Joe, R., Benn, D., and Werner-Washburne, M. (2008). Characterization of differentiated quiescent and nonquiescent cells in yeast stationary-phase cultures. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1271–1280.
- Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J.I., and Guarente, L. (1999). Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 9100–9105.
- Ayyadevara, S., Balasubramaniam, M., Gao, Y., Yu, L.-R., Alla, R., and Shmookler Reis, R. (2015). Proteins in aggregates functionally impact multiple neurodegenerative disease models by forming proteasome-blocking complexes. *Aging Cell* *14*, 35–48.

Bagriantsev, S.N., Gracheva, E.O., Richmond, J.E., and Liebman, S.W. (2008). Variant-specific [PSI⁺] infection is transmitted by Sup35 polymers within [PSI⁺] aggregates with heterogeneous protein composition. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2433–2443.

Bai, M., Zhou, J.-M., and Perrett, S. (2004). The Yeast Prion Protein Ure2 Shows Glutathione Peroxidase Activity in Both Native and Fibrillar Forms. *J. Biol. Chem.* *279*, 50025–50030.

Balch, W.E., Morimoto, R.I., Dillin, A., and Kelly, J.W. (2008). Adapting proteostasis for disease intervention. *Science* *319*, 916–919.

Balchin, D., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). In vivo aspects of protein folding and quality control. *Science* *353*, aac4354–aac4354.

Bartlett, A.I., and Radford, S.E. (2009). An expanding arsenal of experimental methods yields an explosion of insights into protein folding mechanisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 582–588.

Barton, A.A. (1950). Some aspects of cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* *4*, 84–86.

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wächli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., and Weissmann, C. (1986). Scrapie and Cellular PrP Isoforms Are Encoded by the Same Chromosomal Gene. *Cell* *46*, 417–428.

Bateman, D.A., and Wickner, R.B. (2012). [PSI⁺] Prion Transmission Barriers Protect *Saccharomyces cerevisiae* from Infection: Intraspecies “Species Barriers.” *Genetics* *190*, 569–579.

Baudin-Baillieu, A., Fernandez-Bellot, E., Reine, F., Coissac, E., and Cullin, C. (2003). Conservation of the prion properties of Ure2p through evolution. *Mol. Biol. Cell* *14*, 3449–3458.

Baudin-Baillieu, A., Legendre, R., Kuchly, C., Hatin, I., Demais, S., Mestdagh, C., Gautheret, D., and Namy, O. (2014). Genome-wide Translational Changes Induced by the Prion [PSI⁺]. *Cell Rep.* *8*, 439–448.

Baugh, J.M., Viktorova, E.G., and Pilipenko, E.V. (2009). Proteasomes Can Degrade a Significant Proportion of Cellular Proteins Independent of Ubiquitination. *J. Mol. Biol.* *386*, 814–827.

Baxa, U., Keller, P.W., Cheng, N., Wall, J.S., and Steven, A.C. (2011). In Sup35p filaments (the [PSI⁺] prion), the globular C-terminal domains are widely offset from the amyloid fibril backbone: Sup35p C-domains are widely offset from the amyloid fibril backbone. *Mol. Microbiol.* *79*, 523–532.

Bence, N.F., Sampat, R.M., and Kopito, R.R. (2001). Impairment of the Ubiquitin-Proteasome System by Protein Aggregation. *Science* *292*, 1552–1555.

Bolton, D.C., McKinley, M.P., and Prusiner, S.B. (1982). Identification of a Protein that Purifies with the Scrapie Prion. *Science* *1309*.

Borchsenius, A.S., Wegrzyn, R.D., Newnam, G.P., Inge-Vechtomov, S.G., and Chernoff, Y.O. (2001). Yeast prion protein derivative defective in aggregate shearing and production of new “seeds.” *EMBO J.* *20*, 6683–6691.

- Borchsenius, A.S., Müller, S., Newnam, G.P., Inge-Vechtomov, S.G., and Chernoff, Y.O. (2006). Prion variant maintained only at high levels of the Hsp104 disaggregase. *Curr. Genet.* *49*, 21–29.
- Bousset, L., and Melki, R. (2002). Similar and divergent features in mammalian and yeast prions. *Microbes Infect.* *4*, 461–469.
- Bousset, L., and Melki, R. (2005). Protéines prions: propriétés de repliement et d'agrégation. *MS Médecine Sci.* *21*, 634–640.
- Bousset, L., Belrhali, H., Melki, R., and Morera, S. (2001a). Crystal Structures of the Yeast Prion Ure2p Functional Region in Complex with Glutathione and Related Compounds [†], [‡]. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 13564–13573.
- Bousset, L., Belrhali, H., Janin, J., Melki, R., and Morera, S. (2001b). Structure of the globular region of the prion protein Ure2 from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Structure* *9*, 39–46.
- Bousset, L., Thomson, N., Radford, S.E., and Melki, R. (2002). The yeast prion Ure2p retains its native alpha-helical conformation upon assembly into protein fibrils in vitro. *EMBO J.* *21*, 2903–2911.
- Bousset, L., Briki, F., Doucet, J., and Melki, R. (2003). The native-like conformation of Ure2p in fibrils assembled under physiologically relevant conditions switches to an amyloid-like conformation upon heat-treatment of the fibrils. *J. Struct. Biol.* *141*, 132–142.
- Bousset, L., Redeker, V., Decottignies, P., Dubois, S., Le Maréchal, P., and Melki, R. (2004). Structural Characterization of the Fibrillar Form of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Prion Ure2p [†]. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 5022–5032.
- Bousset, L., Bonnefoy, J., Sourigues, Y., Wien, F., and Melki, R. (2010). Structure and Assembly Properties of the N-Terminal Domain of the Prion Ure2p in Isolation and in Its Natural Context. *PLoS ONE* *5*, e9760.
- Bousset, L., Pieri, L., Ruiz-Arlandis, G., Gath, J., Jensen, P.H., Habenstein, B., Madiona, K., Olieric, V., Böckmann, A., Meier, B.H., et al. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat. Commun.* *4*.
- Brachmann, A., Baxa, U., and Wickner, R.B. (2005). Prion generation in vitro: amyloid of Ure2p is infectious. *EMBO J.* *24*, 3082–3092.
- Bradley, M.E., Edskes, H.K., Hong, J.Y., Wickner, R.B., and Liebman, S.W. (2002). Interactions among prions and prion “strains” in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 16392–16399.
- Brauer, M.J., Huttenhower, C., Airoidi, E.M., Rosenstein, R., Matese, J.C., Gresham, D., Boer, V.M., Troyanskaya, O.G., and Botstein, D. (2008). Coordination of growth rate, cell cycle, stress response, and metabolic activity in yeast. *Mol. Biol. Cell* *19*, 352–367.
- Brehme, M., Voisine, C., Rolland, T., Wachi, S., Soper, J.H., Zhu, Y., Orton, K., Vilella, A., Garza, D., Vidal, M., et al. (2014). A Chaperome Subnetwork Safeguards Proteostasis in Aging and Neurodegenerative Disease. *Cell Rep.* *9*, 1135–1150.

- Bregues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* *310*, 486–489.
- Brown, J.C.S., and Lindquist, S. (2009). A heritable switch in carbon source utilization driven by an unusual yeast prion. *Genes Dev.* *23*, 2320–2332.
- Bruce, K.L., and Chernoff, Y.O. (2011). Sequence specificity and fidelity of prion transmission in yeast. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 444–451.
- Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 301–307.
- Bukau, B., Weissman, J., and Horwich, A. (2006). Molecular Chaperones and Protein Quality Control. *Cell* *125*, 443–451.
- Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., and Vanoni, M. (2010). Glucose Signaling-Mediated Coordination of Cell Growth and Cell Cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sensors* *10*, 6195–6240.
- Cardenas, M.E., Cutler, N.S., Lorenz, M.C., Di Como, C.J., and Heitman, J. (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* *13*, 3271–3279.
- Chacinska, A., Szczesniak, B., Kochneva-Pervukhova, N.V., Kushnirov, V.V., Ter-Avanesyan, M.D., and Boguta, M. (2001). Ssb1 chaperone is a [PSI⁺] prion-curing factor. *Curr. Genet.* *39*, 62–67.
- Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G., and Liebman, S.W. (1995). Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science* *268*, 880–884.
- Chernoff, Y.O., Newnam, G.P., Kumar, J., Allen, K., and Zink, A.D. (1999). Evidence for a protein mutator in yeast: role of the Hsp70-related chaperone ssb in formation, stability, and toxicity of the [PSI] prion. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 8103–8112.
- Chernoff, Y.O., Galkin, A.P., Lewitin, E., Chernova, T.A., Newnam, G.P., and Belenkiy, S.M. (2000). Evolutionary conservation of prion-forming abilities of the yeast Sup35 protein. *Mol. Microbiol.* *35*, 865–876.
- Chernova, T.A., Allen, K.D., Wesoloski, L.M., Shanks, J.R., Chernoff, Y.O., and Wilkinson, K.D. (2003). Pleiotropic Effects of Ubp6 Loss on Drug Sensitivities and Yeast Prion Are Due to Depletion of the Free Ubiquitin Pool. *J. Biol. Chem.* *278*, 52102–52115.
- Chernova, T.A., Wilkinson, K.D., and Chernoff, Y.O. (2014). Physiological and environmental control of yeast prions. *FEMS Microbiol. Rev.* *38*, 326–344.
- Chien, P., DePace, A.H., Collins, S.R., and Weissman, J.S. (2003). Generation of prion transmission barriers by mutational control of amyloid conformations. *Nature* *424*, 948–951.
- Chiti, F., and Dobson, C.M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 333–366.
- Choder, M. (1991). A general topoisomerase I-dependent transcriptional repression in the stationary phase in yeast. *Genes Dev.* *5*, 2315–2326.

- Cohen, E., Bieschke, J., Perciavalle, R., Kelly, J., and Dillin, A. (2006). Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science* 313, 1604–1610.
- Colby, D.W., and Prusiner, S.B. (2011). Prions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a006833–a006833.
- Colby, D.W., Giles, K., Legname, G., Wille, H., Baskakov, I.V., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (2009). Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 20417–20422.
- Coller, H.A. (2011). The Essence of Quiescence. *Science* 334, 1074–1075.
- Collinge, J., Sidle, K.C.L., Meads, J., Ironside, J., and Hill, A.F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nat. Lond. U. K.* 685.
- Coschigano, P.W., and Magasanik, B. (1991). The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. *Mol. Cell. Biol.* 11, 822–832.
- Courchesne, W.E., and Magasanik, B. (1988). Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* : roles of the URE2 and GLN3 genes. *J. Bacteriol.* 170, 708–713.
- Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., and Begueret, J. (1997). The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 9773–9778.
- Cox, B.S. (1965). Ψ , A cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. *Heredity* 20, 505.
- Cox, K.H., Rai, R., Distler, M., Daugherty, J.R., Coffman, J.A., and Cooper, T.G. (2000). *Saccharomyces cerevisiae* GATA Sequences Function as TATA Elements during Nitrogen Catabolite Repression and When Gln3p Is Excluded from the Nucleus by Overproduction of Ure2p. *J. Biol. Chem.* 275, 17611–17618.
- Crow, E.T., and Li, L. (2011). Newly identified prions in budding yeast, and their possible functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 452–459.
- Cunningham, T.S., Andhare, R., and Cooper, T.G. (2000). Nitrogen Catabolite Repression of DAL80 Expression Depends on the Relative Levels of Gat1p and Ure2p Production in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 14408–14414.
- Debets, A.J.M., Dalstra, H.J.P., Slakhorst, M., Koopmanschap, B., Hoekstra, R.F., and Saupe, S.J. (2012). High natural prevalence of a fungal prion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 10432–10437.
- Decker, C.J., and Parker, R. (2012). P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a012286–a012286.
- Denoth Lippuner, A., Julou, T., and Barral, Y. (2014). Budding yeast as a model organism to study the effects of age. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 300–325.
- DePace, A.H., Santoso, A., Hillner, P., and Weissman, J.S. (1998). A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion. *Cell* 93, 1241–1252.
- Derkatch, I.L., and Liebman, S.W. (2007). Prion-prion interactions. *Prion* 1, 161–169.

- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Zhou, P., Chernoff, Y.O., and Liebman, S.W. (1997). Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI⁺] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *147*, 507–519.
- Derkatch, I.L., Bradley, M.E., Hong, J.Y., and Liebman, S.W. (2001). Prions affect the appearance of other prions: the story of [PIN⁺]. *Cell* *106*, 171–182.
- De Vos, A., Anandhakumar, J., Van den Brande, J., Verduyck, M., Franssens, V., Winderickx, J., and Swinnen, E. (2011). Yeast as a Model System to Study Tau Biology. *Int. J. Alzheimers Dis.* *2011*, 1–16.
- Diaz-Avalos, R., King, C.-Y., Wall, J., Simon, M., and Caspar, D.L. (2005). Strain-specific morphologies of yeast prion amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10165–10170.
- Dickinson, A.G., and Meikle, V.M.H. (1969). A comparison of some biological characteristics of the mouse-passaged scrapie agents, 22A and ME7. *Genet. Res.* *13*, 213.
- Douglas, P.M., Treusch, S., Ren, H.-Y., Halfmann, R., Duennwald, M.L., Lindquist, S., and Cyr, D.M. (2008). Chaperone-dependent amyloid assembly protects cells from prion toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 7206–7211.
- Du, Z., Park, K.-W., Yu, H., Fan, Q., and Li, L. (2008). Newly identified prion linked to the chromatin-remodeling factor Swi1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat. Genet.* *40*, 460–465.
- Dunker, A.K., Silman, I., Uversky, V.N., and Sussman, J.L. (2008). Function and structure of inherently disordered proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 756–764.
- Edskes, H.K., and Wickner, R.B. (2002). Conservation of a portion of the *S. cerevisiae* Ure2p prion domain that interacts with the full-length protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 16384–16391.
- Egilmez, N.K., and Jazwinski, S.M. (1989). Evidence for the involvement of a cytoplasmic factor in the aging of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *171*, 37–42.
- Eichner, T., and Radford, S.E. (2011). A Diversity of Assembly Mechanisms of a Generic Amyloid Fold. *Mol. Cell* *43*, 8–18.
- Escusa-Toret, S., Vonk, W.I.M., and Frydman, J. (2013). Spatial sequestration of misfolded proteins by a dynamic chaperone pathway enhances cellular fitness during stress. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1231–1243.
- Evans, M.L., Chorell, E., Taylor, J.D., Åden, J., Göthesson, A., Li, F., Koch, M., Sefer, L., Matthews, S.J., Wittung-Stafshede, P., et al. (2015). The Bacterial Curli System Possesses a Potent and Selective Inhibitor of Amyloid Formation. *Mol. Cell* *57*, 445–455.
- Fabrizio, P., and Longo, V.D. (2003). The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* *2*, 73–81.
- Falsone, S.F., Meyer, N.H., Schrank, E., Leitinger, G., Pham, C.L.L., Fodero-Tavoletti, M.T., Holmberg, M., Dulle, M., Scicluna, B., Gesslbauer, B., et al. (2012). SERF Protein Is a Direct Modifier of Amyloid Fiber Assembly. *Cell Rep.* *2*, 358–371.

- Fan, Q., Park, K.-W., Du, Z., Morano, K.A., and Li, L. (2007). The Role of Sse1 in the de Novo Formation and Variant Determination of the [PSI⁺] Prion. *Genetics* *177*, 1583–1593.
- Fay, N., Redeker, V., Savistchenko, J., Dubois, S., Bousset, L., and Melki, R. (2005). Structure of the Prion Ure2p in Protein Fibrils Assembled in Vitro. *J. Biol. Chem.* *280*, 37149–37158.
- Fehrenbacher, K.L., Yang, H.-C., Gay, A.C., Huckaba, T.M., and Pon, L.A. (2004). Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. *Curr. Biol.* *14*, 1996–2004.
- Ferreira, P.C., Ness, F., Edwards, S.R., Cox, B.S., and Tuite, M.F. (2001). The elimination of the yeast [PSI⁺] prion by guanidine hydrochloride is the result of Hsp104 inactivation. *Mol. Microbiol.* *40*, 1357–1369.
- Fraser, H., and Dickinson, A.G. (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation.
- Frederick, K.K., Debelouchina, G.T., Kayatekin, C., Dorminy, T., Jacavone, A.C., Griffin, R.G., and Lindquist, S. (2014). Distinct Prion Strains Are Defined by Amyloid Core Structure and Chaperone Binding Site Dynamics. *Chem. Biol.* *21*, 295–305.
- Frolova, L.Y., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., and Kisselev, L.L. (1996). Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA* *2*, 334–341.
- Galdieri, L., Mehrotra, S., Yu, S., and Vancura, A. (2010). Transcriptional Regulation in Yeast during Diauxic Shift and Stationary Phase. *OMICS J. Integr. Biol.* *14*, 629–638.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4241–4257.
- Gendron, C.M., Minois, N., Longo, V.D., Pletcher, S.D., and Vaupel, J.W. (2003). Biodemographic trajectories of age-specific re proliferation from stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* seem multiphasic. *Mech. Ageing Dev.* *124*, 1059–1063.
- Glover, J.R., Kowal, A.S., Schirmer, E.C., Patino, M.M., Liu, J.-J., and Lindquist, S. (1997). Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell* *89*, 811–819.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., et al. (1996). Life with 6000 Genes. *Science* *274*, 546–567.
- Gokhale, K.C., Newnam, G.P., Sherman, M.Y., and Chernoff, Y.O. (2005). Modulation of Prion-dependent Polyglutamine Aggregation and Toxicity by Chaperone Proteins in the Yeast Model. *J. Biol. Chem.* *280*, 22809–22818.
- Gonzalez Nelson, A.C., and Ross, E.D. (2011). Interactions between non-identical prion proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 437–443.

- Gorkovskiy, A., Thurber, K.R., Tycko, R., and Wickner, R.B. (2014). Locating folds of the in-register parallel β -sheet of the Sup35p prion domain infectious amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, E4615–E4622.
- Gray, J.V., Petsko, G.A., Johnston, G.C., Ringe, D., Singer, R.A., and Werner-Washburne, M. (2004). “Sleeping Beauty”: Quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *68*, 187–206.
- Greenwald, J., and Riek, R. (2010). Biology of Amyloid: Structure, Function, and Regulation. *Structure* *18*, 1244–1260.
- Gresham, D., Boer, V.M., Caudy, A., Ziv, N., Brandt, N.J., Storey, J.D., and Botstein, D. (2011). System-Level Analysis of Genes and Functions Affecting Survival During Nutrient Starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *187*, 299–317.
- Grimminger-Marquardt, V., and Lashuel, H.A. (2010). Structure and function of the molecular chaperone Hsp104 from yeast. *Biopolymers* *93*, 252–276.
- Grishin, A.V., Rothenberg, M., Downs, M.A., and Blumer, K.J. (1998). Mot3, a Zn finger transcription factor that modulates gene expression and attenuates mating pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *149*, 879–892.
- Groenning, M., Olsen, L., van de Weert, M., Flink, J.M., Frokjaer, S., and Jørgensen, F.S. (2007). Study on the binding of Thioflavin T to β -sheet-rich and non- β -sheet cavities. *J. Struct. Biol.* *158*, 358–369.
- Gutteridge, A., Pir, P., Castrillo, J.I., Charles, P.D., Lilley, K.S., and Oliver, S.G. (2010). Nutrient control of eukaryote cell growth: a systems biology study in yeast. *BMC Biol.* *8*, 68.
- Habenstein, B., Bousset, L., Sourigues, Y., Kabani, M., Loquet, A., Meier, B.H., Melki, R., and Böckmann, A. (2012). A Native-Like Conformation for the C-Terminal Domain of the Prion Ure2p within its Fibrillar Form. *Angew. Chem. Int. Ed.* *51*, 7963–7966.
- Halfmann, R., and Lindquist, S. (2010). Epigenetics in the extreme: Prions and the inheritance of environmentally acquired traits. *Science* *330*, 329–332.
- Halfmann, R., Jarosz, D.F., Jones, S.K., Chang, A., Lancaster, A.K., and Lindquist, S. (2012a). Prions are a common mechanism for phenotypic inheritance in wild yeasts. *Nature* *482*, 363–368.
- Halfmann, R., Wright, J.R., Alberti, S., Lindquist, S., and Rexach, M. (2012b). Prion formation by a yeast GLFG nucleoporin. *Prion* *6*, 391–399.
- Harrison, P.M., and Gerstein, M. (2003). A method to assess compositional bias in biological sequences and its application to prion-like glutamine/asparagine-rich domains in eukaryotic proteomes. *Genome Biol.* *4*, 1.
- Harrison, L.B., Yu, Z., Stajich, J.E., Dietrich, F.S., and Harrison, P.M. (2007). Evolution of Budding Yeast Prion-determinant Sequences Across Diverse Fungi. *J. Mol. Biol.* *368*, 273–282.
- Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* *381*, 571–579.
- Hartl, F.U. (2016). Cellular Homeostasis and Aging. *Annu. Rev. Biochem.* *85*.

- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2009). Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 574–581.
- Helsen, C.W., and Glover, J.R. (2012). Insight into Molecular Basis of Curing of [PSI⁺] Prion by Overexpression of 104-kDa Heat Shock Protein (Hsp104). *J. Biol. Chem.* *287*, 542–556.
- Henderson, K.A., and Gottschling, D.E. (2008). A mother's sacrifice: what is she keeping for herself? *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 723–728.
- Herman, P.K. (2002). Stationary phase in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* *5*, 602–607.
- Higuchi, R., Vevea, J.D., Swayne, T.C., Chojnowski, R., Hill, V., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2013). Actin Dynamics Affect Mitochondrial Quality Control and Aging in Budding Yeast. *Curr. Biol.* *23*, 2417–2422.
- Higuchi-Sanabria, R., Pernice, W.M.A., Vevea, J.D., Alessi Wolken, D.M., Boldogh, I.R., and Pon, L.A. (2014). Role of asymmetric cell division in lifespan control in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* *14*, 1133–1146.
- Higurashi, T., Hines, J.K., Sahi, C., Aron, R., and Craig, E.A. (2008). Specificity of the J-protein Sis1 in the propagation of 3 yeast prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 16596–16601.
- Hines, J.K., Li, X., Du, Z., Higurashi, T., Li, L., and Craig, E.A. (2011). [SWI⁺], the Prion Formed by the Chromatin Remodeling Factor Swi1, Is Highly Sensitive to Alterations in Hsp70 Chaperone System Activity. *PLoS Genet.* *7*, e1001309.
- Hochstrasser, M. (2009). Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature* *458*, 422–429.
- Holmes, D.L., Lancaster, A.K., Lindquist, S., and Halfmann, R. (2013). Heritable Remodeling of Yeast Multicellularity by an Environmentally Responsive Prion. *Cell* *153*, 153–165.
- Inoue, Y., Taguchi, H., Kishimoto, A., and Yoshida, M. (2004). Hsp104 Binds to Yeast Sup35 Prion Fiber but Needs Other Factor(s) to Sever It. *J. Biol. Chem.* *279*, 52319–52323.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. In *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, (Elsevier), pp. 45–93.
- Jelinsky, S.A., Estep, P., Church, G.M., and Samson, L.D. (2000). Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged *Saccharomyces cerevisiae* cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. *Mol. Cell Biol.* *20*, 8157–8167.
- Jiang, J., Maes, E.G., Taylor, A.B., Wang, L., Hinck, A.P., Lafer, E.M., and Sousa, R. (2007). Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. *Mol. Cell* *28*, 422–433.
- Jung, G., Jones, G., Wegrzyn, R.D., and Masison, D.C. (2000). A role for cytosolic Hsp70 in yeast [PSI⁺] prion propagation and [PSI⁺] as a cellular stress. *Genetics* *156*, 559–570.
- Kabani, M., and Martineau, C.N. (2008). Multiple hsp70 isoforms in the eukaryotic cytosol: mere redundancy or functional specificity? *Curr. Genomics* *9*, 338–348.
- Kabani, M., and Melki, R. (2011). Yeast prions assembly and propagation: Contributions of the prion and non-prion moieties and the nature of assemblies. *Prion* *5*, 277–284.

- Kabani, M., and Melki, R. (2015). Sup35p in Its Soluble and Prion States Is Packaged inside Extracellular Vesicles. *mBio* 6, e01017–15.
- Kabani, M., and Melki, R. (2016). More than just trash bins? Potential roles for extracellular vesicles in the vertical and horizontal transmission of yeast prions. *Curr. Genet.* 62, 265–270.
- Kabani, M., Cosnier, B., Bousset, L., Rousset, J.-P., Melki, R., and Fabret, C. (2011). A mutation within the C-terminal domain of Sup35p that affects [PSI⁺] prion propagation: The C-terminus of Sup35p affects [PSI⁺] propagation. *Mol. Microbiol.* 81, 640–658.
- Kabani, M., Redeker, V., and Melki, R. (2014). A role for the proteasome in the turnover of Sup35p and in [PSI⁺] prion propagation: The proteasome and Sup35p turnover. *Mol. Microbiol.* 92, 507–528.
- Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454, 1088–1095.
- Kajava, A.V., Baxa, U., Wickner, R.B., and Steven, A.C. (2004). A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: The parallel superpleated β -structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7885–7890.
- Kampinga, H.H., and Craig, E.A. (2010). The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 579–592.
- Kelly, A.C., Shewmaker, F.P., Kryndushkin, D., and Wickner, R.B. (2012). Sex, prions, and plasmids in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, E2683–E2690.
- Kennedy, B.K., Austriaco, N.R., and Guarente, L. (1994). Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J. Cell Biol.* 127, 1985–1993.
- Kim, Y.E., Hipp, M.S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., and Ulrich Hartl, F. (2013). Molecular Chaperone Functions in Protein Folding and Proteostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 323–355.
- King, C.-Y., and Diaz-Avalos, R. (2004). Protein-only transmission of three yeast prion strains. *Nature* 428, 316–319.
- King, C.-Y., Wang, H.-L., and Chang, H.-Y. (2006). Transformation of yeast by infectious prion particles. *Methods* 39, 68–71.
- Kirkland, P.A., Reidy, M., and Masison, D.C. (2011). Functions of Yeast Hsp40 Chaperone Sis1p Dispensable for Prion Propagation but Important for Prion Curing and Protection From Prion Toxicity. *Genetics* 188, 565–577.
- Klaips, C.L., Hochstrasser, M.L., Langlois, C.R., and Serio, T.R. (2014). Spatial quality control bypasses cell-based limitations on proteostasis to promote prion curing. *Elife* 3, e04288.
- Klosinska, M.M., Crutchfield, C.A., Bradley, P.H., Rabinowitz, J.D., and Broach, J.R. (2011). Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes Dev.* 25, 336–349.
- Kong, C., Ito, K., Walsh, M.A., Wada, M., Liu, Y., Kumar, S., Barford, D., Nakamura, Y., and Song, H. (2004). Crystal structure and functional analysis of the eukaryotic class II release factor eRF3 from *S. pombe*. *Mol. Cell* 14, 233–245.

- Kononenko, A.V., Mitkevich, V.A., Dubovaya, V.I., Kolosov, P.M., Makarov, A.A., and Kisselev, L.L. (2007). Role of the individual domains of translation termination factor eRF1 in GTP binding to eRF3. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* *70*, 388–393.
- Kristiansen, M., Deriziotis, P., Dimcheff, D.E., Jackson, G.S., Ovaa, H., Naumann, H., Clarke, A.R., van Leeuwen, F.W.B., Menéndez-Benito, V., Dantuma, N.P., et al. (2007). Disease-Associated Prion Protein Oligomers Inhibit the 26S Proteasome. *Mol. Cell* *26*, 175–188.
- Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D., and Kushnirov, V.V. (2003). Yeast [PSI⁺] Prion Aggregates Are Formed by Small Sup35 Polymers Fragmented by Hsp104. *J. Biol. Chem.* *278*, 49636–49643.
- Kryndushkin, D.S., Engel, A., Edskes, H., and Wickner, R.B. (2011). Molecular Chaperone Hsp104 Can Promote Yeast Prion Generation. *Genetics* *188*, 339–348.
- Krzewska, J., and Melki, R. (2006). Molecular chaperones and the assembly of the prion Sup35p, an in vitro study. *EMBO J.* *25*, 822–833.
- Krzewska, J., Tanaka, M., Burston, S.G., and Melki, R. (2007). Biochemical and Functional Analysis of the Assembly of Full-length Sup35p and Its Prion-forming Domain. *J. Biol. Chem.* *282*, 1679–1686.
- Kucsera, J., Yarita, K., and Takeo, K. (2000). Simple detection method for distinguishing dead and living yeast colonies. *J. Microbiol. Methods* *41*, 19–21.
- Kushnirov, V.V., Kryndushkin, D., Boguta, M., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. (2000). Chaperones that cure yeast artificial PSI⁺ and their prion-specific effects. *Curr. Biol.* *10*, 1443–1446.
- Laporte, D., Salin, B., Daignan-Fornier, B., and Sagot, I. (2008). Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *J. Cell Biol.* *181*, 737–745.
- Lasker, K., Förster, F., Bohn, S., Walzthoeni, T., Villa, E., Unverdorben, P., Beck, F., Aebersold, R., Sali, A., and Baumeister, W. (2012). Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 1380–1387.
- Lee, S.S., Vizcarra, I.A., Huberts, D.H.E.W., Lee, L.P., and Heinemann, M. (2012). Whole lifespan microscopic observation of budding yeast aging through a microfluidic dissection platform. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 4916–4920.
- Leggett, D., Gilckman, M., and Finley, D. (2005). Purification of proteasomes, proteasome subcomplexes, and proteasome-associated proteins from budding yeast. *Methods Mol Biol* *301*, 57–70.
- Lennox, G., Lowe, J., Morrell, K., Landon, M., and Mayer, R.J. (1988). Ubiquitin is a component of neurofibrillary tangles in a variety of neurodegenerative diseases. *Neurosci. Lett.* *94*, 211–217.
- Li, L., Miles, S., Melville, Z., Prasad, A., Bradley, G., and Breeden, L.L. (2013). Key events during the transition from rapid growth to quiescence in budding yeast require posttranscriptional regulators. *Mol. Biol. Cell* *24*, 3697–3709.
- Liebman, S.W., and Chernoff, Y.O. (2012). Prions in Yeast. *Genetics* *191*, 1041–1072.

- Liu, B., Larsson, L., Franssens, V., Hao, X., Hill, S.M., Andersson, V., Höglund, D., Song, J., Yang, X., Öling, D., et al. (2011). Segregation of protein aggregates involves actin and the polarity machinery. *Cell* 147, 959–961.
- Liu, J.-J., Sondheimer, N., and Lindquist, S.L. (2002). Changes in the middle region of Sup35 profoundly alter the nature of epigenetic inheritance for the yeast prion [PSI⁺]. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16446–16453.
- Longo, V.D., Shadel, G.S., Kaerberlein, M., and Kennedy, B. (2012). Replicative and Chronological Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Metab.* 16, 18–31.
- Loquet, A., Bousset, L., Gardiennet, C., Sourigues, Y., Wasmer, C., Habenstein, B., Schütz, A., Meier, B.H., Melki, R., and Böckmann, A. (2009). Prion Fibrils of Ure2p Assembled under Physiological Conditions Contain Highly Ordered, Natively Folded Modules. *J. Mol. Biol.* 394, 108–118.
- Lord, P.G., and Wheals, A.E. (1980). Asymmetrical division of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 142, 808–818.
- Lowe, J., Blanchard, A., Morrell, K., Lennox, G., Reynolds, L., Billett, M., Landon, M., and Mayer, R. (1988). Ubiquitin is a common factor in intermediate filament inclusion bodies of diverse type in man, including those of Parkinson's disease, Pick's disease, and Alzheimer's disease, as well as Rosenthal fibres in cerebellar astrocytomas, cytoplasmic bodies in muscle, and mallory bodies in alcoholic liver disease. *J Pathol* 155, 9–15.
- Luckgei, N., Schütz, A.K., Bousset, L., Habenstein, B., Sourigues, Y., Gardiennet, C., Meier, B.H., Melki, R., and Böckmann, A. (2013). The Conformation of the Prion Domain of Sup35 p in Isolation and in the Full-Length Protein. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 12741–12744.
- Luckgei, N., Schütz, A.K., Habenstein, B., Bousset, L., Sourigues, Y., Melki, R., Meier, B.H., and Böckmann, A. (2014). Solid-state NMR sequential assignments of the amyloid core of Sup35pNM. *Biomol. NMR Assign.* 8, 365–370.
- Maji, S.K., Perrin, M.H., Sawaya, M.R., Jessberger, S., Vadodaria, K., Rissman, R.A., Singru, P.S., Nilsson, K.P.R., Simon, R., Schubert, D., et al. (2009). Functional Amyloids As Natural Storage of Peptide Hormones in Pituitary Secretory Granules. *Science* 325, 328–332.
- March, Z.M., King, O.D., and Shorter, J. (2016). Prion-like domains as epigenetic regulators, scaffolds for subcellular organization, and drivers of neurodegenerative disease. *Brain Res.*
- Martinez, M.J., Roy, S., Archuletta, A.B., Wentzell, P.D., Santa Anna-Arriola, S., Rodriguez, A.L., Aragon, A.D., Quiñones, G.A., Allen, C., and Werner-Washburne, M. (2004). Genomic analysis of stationary-phase and exit in *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression and identification of novel essential genes. *Mol. Biol. Cell* 15, 5295–5305.
- Maskell, D., Kennedy, A., Hodgson, J., and Smart, K. (2003). Chronological and replicative lifespan of polyploid *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 3, 201–209.
- Mathur, V., Hong, J.Y., and Liebman, S.W. (2009). Ssa1 Overexpression and [PIN⁺] Variants Cure [PSI⁺] by Dilution of Aggregates. *J. Mol. Biol.* 390, 155–167.

- Mayer, M.P. (2010). Gymnastics of Molecular Chaperones. *Mol. Cell* 39, 321–331.
- McGlinchey, R.P., Kryndushkin, D., and Wickner, R.B. (2011). Suicidal [PSI⁺] is a lethal yeast prion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5337–5341.
- McKinney, J., and Cross, F. (1992). A switch-hitter at the Start of the cell cycle. *Curr. Biol.* 2, 421–423.
- McKnight, J.N., Boerma, J.W., Breeden, L.L., and Tsukiyama, T. (2015). Global Promoter Targeting of a Conserved Lysine Deacetylase for Transcriptional Shutoff during Quiescence Entry. *Mol. Cell* 59, 732–743.
- Michelitsch, M.D., and Weissman, J.S. (2000). A census of glutamine/asparagine-rich regions: implications for their conserved function and the prediction of novel prions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 11910–11915.
- von Mikecz, A. (2006). The nuclear ubiquitin-proteasome system. *J. Cell Sci.* 119, 1977–1984.
- Miles, S., Li, L., Davison, J., and Breeden, L.L. (2013). Xbp1 Directs Global Repression of Budding Yeast Transcription during the Transition to Quiescence and Is Important for the Longevity and Reversibility of the Quiescent State. *PLoS Genet.* 9, e1003854.
- Montañés, F.M., Pascual-Ahuir, A., and Proft, M. (2011). Repression of ergosterol biosynthesis is essential for stress resistance and is mediated by the Hog1 MAP kinase and the Mot3 and Rox1 transcription factors: Stress-mediated repression of ergosterol biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 79, 1008–1023.
- Moriyama, H., Edskes, H.K., and Wickner, R.B. (2000). [URE3] prion propagation in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement for chaperone Hsp104 and curing by overexpressed chaperone Ydj1p. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8916–8922.
- Mortimer, R., and Johnston, J. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature* 183, 1751–1752.
- Mugnier, P., and Tuite, M.F. (1999). Translation termination and its regulation in eukaryotes: recent insights provided by studies in yeast. *Biochem. CC BIOKHIMIIA* 64, 1360–1366.
- Müller, I. (1985). Parental age and the life-span of zygotes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 51, 1–10.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Kameji, T., Hayashi, S., Igarashi, K., Tamura, T., Tanaka, K., and Ichihara, A. (1992). Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 360, 597–599.
- Nakayashiki, T., Kurtzman, C.P., Edskes, H.K., and Wickner, R.B. (2005). Yeast prions [URE3] and [PSI⁺] are diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 10575–10580.
- Namy, O., Galopier, A., Martini, C., Matsufuji, S., Fabret, C., and Rousset, J.-P. (2008). Epigenetic control of polyamines by the prion [PSI⁺]. *Nat. Cell Biol.* 10, 1069–1075.

- Narayanaswamy, R., Levy, M., Tsechansky, M., Stovall, G.M., O'Connell, J.D., Mirrielees, J., Ellington, A.D., and Marcotte, E.M. (2009). Widespread reorganization of metabolic enzymes into reversible assemblies upon nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 10147–10152.
- Ness, F., Ferreira, P., Cox, B.S., and Tuite, M.F. (2002). Guanidine Hydrochloride Inhibits the Generation of Prion “Seeds” but Not Prion Protein Aggregation in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 5593–5605.
- Newnam, G.P., Wegrzyn, R.D., Lindquist, S.L., and Chernoff, Y.O. (1999). Antagonistic interactions between yeast chaperones Hsp104 and Hsp70 in prion curing. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 1325–1333.
- Newnam, G.P., Birchmore, J.L., and Chernoff, Y.O. (2011). Destabilization and Recovery of a Yeast Prion after Mild Heat Shock. *J. Mol. Biol.* *408*, 432–448.
- Nizhnikov, A.A., Alexandrov, A.I., Ryzhova, T.A., Mitkevich, O.V., Dergalev, A.A., Ter-Avanesyan, M.D., and Galkin, A.P. (2014). Proteomic Screening for Amyloid Proteins. *PLoS ONE* *9*, e116003.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., and Klis, F.M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2–lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* *146*, 2121–2132.
- Noree, C., Sato, B.K., Broyer, R.M., and Wilhelm, J.E. (2010). Identification of novel filament-forming proteins in *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* *190*, 541–551.
- Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* *40*, 735–746.
- Osherovich, L.Z., and Weissman, J.S. (2001). Multiple Gln/Asn-rich prion domains confer susceptibility to induction of the yeast [PSI⁺] prion. *Cell* *106*, 183–194.
- Otvos, L., Jr, and Cudic, M. (2002). Post-translational modifications in prion proteins. *Curr. Protein Pept. Sci.* *3*, 643–652.
- Park, K.-W. (2006). De Novo Appearance and “Strain” Formation of Yeast Prion [PSI⁺] Are Regulated by the Heat-Shock Transcription Factor. *Genetics* *173*, 35–47.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature* *372*, 475–478.
- Patel, B.K., Gavin-Smyth, J., and Liebman, S.W. (2009). The yeast global transcriptional co-repressor protein Cyc8 can propagate as a prion. *Nat. Cell Biol.* *11*, 344–349.
- Patino, M.M., Liu, J.-J., Glover, J.R., and Lindquist, S. (1996). Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science* *273*, 622–626.
- Paushkin, S.V., Kushnirov, V.V., Smirnov, V.N., and Ter-Avanesyan, M.D. (1996). Propagation of the yeast prion-like [psi⁺] determinant is mediated by oligomerization of the SUP35-encoded polypeptide chain release factor. *EMBO J.* *15*, 3127.

- Peelaerts, W., Bousset, L., Van der Perren, A., Moskalyuk, A., Pulizzi, R., Giugliano, M., Van den Haute, C., Melki, R., and Baekelandt, V. (2015). α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344.
- Peters, L.Z., Karmon, O., Miodownik, S., and Ben-Aroya, S. (2016). Proteasome storage granules are transiently associated with the insoluble protein deposit in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 129, 1190–1197.
- Petrovska, I., Nüske, E., Munder, M.C., Kulasegaran, G., Malinowska, L., Kroschwald, S., Richter, D., Fahmy, K., Gibson, K., Verbavatz, J.-M., et al. (2014). Filament formation by metabolic enzymes is a specific adaptation to an advanced state of cellular starvation. *Elife* 3, e02409.
- Pezza, J.A., Villali, J., Sindi, S.S., and Serio, T.R. (2014). Amyloid-associated activity contributes to the severity and toxicity of a prion phenotype. *Nat. Commun.* 5.
- Plesset, J., Ludwig, J.R., Cox, B.S., and McLaughlin, C.S. (1987). Effect of cell cycle position on thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169, 779–784.
- Porro, D., Vai, M., Vanoni, M., Alberghina, L., and Hatzis, C. (2009). Analysis and modeling of growing budding yeast populations at the single cell level. *Cytometry A* 75A, 114–120.
- Powell, C., Quain, D., and Smart, K. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res.* 3, 149–157.
- Pringle, J. (1991). Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.* 194, 732–735.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. *Science* 136.
- Radonjic, M., Andrau, J.-C., Lijnzaad, P., Kemmeren, P., Kockelkorn, T.T.J.P., van Leenen, D., van Berkum, N.L., and Holstege, F.C.P. (2005). Genome-Wide Analyses Reveal RNA Polymerase II Located Upstream of Genes Poised for Rapid Response upon *S. cerevisiae* Stationary Phase Exit. *Mol. Cell* 18, 171–183.
- Raspe, M., Gillis, J., Krol, H., Krom, S., Bosch, K., van Veen, H., and Reits, E. (2009). Mimicking proteasomal release of polyglutamine peptides initiates aggregation and toxicity. *J. Cell Sci.* 122, 3262–3271.
- Redeker, V., Halgand, F., Le Caer, J.-P., Bousset, L., Laprévotte, O., and Melki, R. (2007). Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometric Analysis of Conformational Changes Accompanying the Assembly of the Yeast Prion Ure2p into Protein Fibrils. *J. Mol. Biol.* 369, 1113–1125.
- Resende, C.G., Outeiro, T.F., Sands, L., Lindquist, S., and Tuite, M.F. (2003). Prion protein gene polymorphisms in *Saccharomyces cerevisiae*: Yeast prion gene polymorphisms. *Mol. Microbiol.* 49, 1005–1017.
- Roberts, B.T., and Wickner, R.B. (2003). Heritable activity: a prion that propagates by covalent autoactivation. *Genes Dev.* 17, 2083–2087.

- Rogoza, T., Goginashvili, A., Rodionova, S., Ivanov, M., Viktorovskaya, O., Rubel, A., Volkov, K., and Mironova, L. (2010). Non-Mendelian determinant [ISP+] in yeast is a nuclear-residing prion form of the global transcriptional regulator Sfp1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 10573–10577.
- Römer, L., and Scheibel, T. (2008). The elaborate structure of spider silk. *Prion*.
- Russell, S.J., Steger, K.A., and Johnston, S.A. (1999). Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J. Biol. Chem.* *274*, 21943–21952.
- Saarikangas, J., and Barral, Y. (2015). Protein aggregates are associated with replicative aging without compromising protein quality control. *Elife* *4*, e06197.
- Saarikangas, J., and Barral, Y. (2016). Protein aggregation as a mechanism of adaptive cellular responses. *Curr. Genet.*
- Sagot, I., Pinson, B., Salin, B., and Daignan-Fornier, B. (2006). Actin bodies in yeast quiescent cells: an immediately available actin reserve? *Mol. Biol. Cell* *17*, 4645–4655.
- Sailer, A., Büeler, H., Fischer, M., Aguzzi, A., and Weissmann, C. (1994). No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* *77*, 967–968.
- Saldanha, A.J., Brauer, M.J., and Botstein, D. (2004). Nutritional homeostasis in batch and steady-state culture of yeast. *Mol. Biol. Cell* *15*, 4089–4104.
- Satpute-Krishnan, P., and Serio, T.R. (2005). Prion protein remodelling confers an immediate phenotypic switch. *Nature* *437*, 262–265.
- Savistchenko, J., Krzewska, J., Fay, N., and Melki, R. (2008). Molecular Chaperones and the Assembly of the Prion Ure2p in Vitro. *J. Biol. Chem.* *283*, 15732–15739.
- Schäfer, G., McEvoy, C.R., and Patterton, H.-G. (2008). The *Saccharomyces cerevisiae* linker histone Hho1p is essential for chromatin compaction in stationary phase and is displaced by transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 14838–14843.
- Schaupp, A., Marcinowski, M., Grimminger, V., Bösl, B., and Walter, S. (2007). Processing of Proteins by the Molecular Chaperone Hsp104. *J. Mol. Biol.* *370*, 674–686.
- Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G.P., Lehrach, H., and Wanker, E.E. (1999). Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 4604–4609.
- Schlumpberger, M., Prusiner, S.B., and Herskowitz, I. (2001). Induction of Distinct [URE3] Yeast Prion Strains. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 7035–7046.
- Schütz, A.K., Habenstein, B., Luckgei, N., Bousset, L., Sourigues, Y., Nielsen, A.B., Melki, R., Böckmann, A., and Meier, B.H. (2014). Solid-state NMR sequential assignments of the amyloid core of full-length Sup35p. *Biomol. NMR Assign.* *8*, 349–356.

- Schütz, A.K., Vagt, T., Huber, M., Ovchinnikova, O.Y., Cadalbert, R., Wall, J., Güntert, P., Böckmann, A., Glockshuber, R., and Meier, B.H. (2015). Atomic-Resolution Three-Dimensional Structure of Amyloid β Fibrils Bearing the Osaka Mutation. *Angew. Chem. Int. Ed.* *54*, 331–335.
- Schwimmer, C., and Masison, D.C. (2002). Antagonistic Interactions between Yeast [PSI⁺] and [URE3] Prions and Curing of [URE3] by Hsp70 Protein Chaperone Ssa1p but Not by Ssa2p. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 3590–3598.
- Sertil, O. (2003). Synergistic repression of anaerobic genes by Mot3 and Rox1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* *31*, 5831–5837.
- Seyffer, F., Kummer, E., Oguchi, Y., Winkler, J., Kumar, M., Zahn, R., Sourjik, V., Bukau, B., and Mogk, A. (2012). Hsp70 proteins bind Hsp100 regulatory M domains to activate AAA⁺ disaggregase at aggregate surfaces. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1347–1355.
- Sharma, D., and Masison, D.C. (2008). Functionally Redundant Isoforms of a Yeast Hsp70 Chaperone Subfamily Have Different Antiprion Effects. *Genetics* *179*, 1301–1311.
- Sharma, D., and Masison, D.C. (2009). Hsp70 structure, function, regulation and influence on yeast prions. *Protein Pept. Lett.* *16*, 571.
- Sharma, D., and Masison, D.C. (2011). Single methyl group determines prion propagation and protein degradation activities of yeast heat shock protein (Hsp)-70 chaperones Ssa1p and Ssa2p. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 13665–13670.
- Sharma, D., Martineau, C.N., Le Dall, M.-T., Reidy, M., Masison, D.C., and Kabani, M. (2009). Function of SSA Subfamily of Hsp70 Within and Across Species Varies Widely in Complementing *Saccharomyces cerevisiae* Cell Growth and Prion Propagation. *PLoS ONE* *4*, e6644.
- Shcheprova, Z., Baldi, S., Frei, S.B., Gonnet, G., and Barral, Y. (2008). A mechanism for asymmetric segregation of age during yeast budding. *Nature*.
- Shewmaker, F., Kryndushkin, D., Chen, B., Tycko, R., and Wickner, R.B. (2009). Two Prion Variants of Sup35p Have In-Register Parallel β -Sheet Structures, Independent of Hydration. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 5074–5082.
- Shewmaker, F., McGlinchey, R.P., and Wickner, R.B. (2011). Structural Insights into Functional and Pathological Amyloid. *J. Biol. Chem.* *286*, 16533–16540.
- Shorter, J., and Lindquist, S. (2004). Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science* *304*, 1793–1797.
- Shorter, J., and Lindquist, S. (2008). Hsp104, Hsp70 and Hsp40 interplay regulates formation, growth and elimination of Sup35 prions. *EMBO J.* *27*, 2712–2724.
- Si, K., Choi, Y.-B., White-Grindley, E., Majumdar, A., and Kandel, E.R. (2010). *Aplysia* CPEB Can Form Prion-like Multimers in Sensory Neurons that Contribute to Long-Term Facilitation. *Cell* *140*, 421–435.
- Smith, R.L., and Johnson, A.D. (2000). Turning genes off by Ssn6–Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* *25*, 325–330.

- Sondheimer, N., Lopez, N., Craig, E.A., and Lindquist, S.L. (2001). The role of Sis1 in the maintenance of the RNQ+ prion. *EMBO J.* *20*, 2435–2442.
- Song, Y., Wu, Y. -x., Jung, G., Tutar, Y., Eisenberg, E., Greene, L.E., and Masison, D.C. (2005). Role for Hsp70 Chaperone in *Saccharomyces cerevisiae* Prion Seed Replication. *Eukaryot. Cell* *4*, 289–297.
- Sontag, E.M., Vonk, W.I., and Frydman, J. (2014). Sorting out the trash: the spatial nature of eukaryotic protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* *26*, 139–146.
- Specht, S., Miller, S.B.M., Mogk, A., and Bukau, B. (2011). Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *195*, 617–629.
- Speldewinde, S.H., Doronina, V.A., and Grant, C.M. (2015). Autophagy protects against de novo formation of the [PSI+] prion in yeast. *Mol. Biol. Cell* *26*, 4541–4551.
- Spokoini, R., Moldavski, O., Nahmias, Y., England, J.L., Schuldiner, M., and Kaganovich, D. (2012). Confinement to Organelle-Associated Inclusion Structures Mediates Asymmetric Inheritance of Aggregated Protein in Budding Yeast. *Cell Rep.* *2*, 738–747.
- Stansfield, I., Jones, K.M., Kushnirov, V.V., Dagkesamanskaya, A.R., Poznyakovski, A.I., Paushkin, S.V., Nierras, C.R., Cox, B.S., Ter-Avanesyan, M.D., and Tuite, M.F. (1995). The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *14*, 4365.
- Sunde, M., and Blake, . (1997). The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. In *Advances in Protein Chemistry*, pp. 123–124, C11–C12, 125–159.
- Suzuki, G., and Tanaka, M. (2013). Active conversion to the prion state as a molecular switch for cellular adaptation to environmental stress. *BioEssays* *35*, 12–16.
- Suzuki, G., Shimazu, N., and Tanaka, M. (2012). A yeast prion, Mod5, promotes acquired drug resistance and cell survival under environmental stress. *Science* *336*, 355–359.
- Tanaka, M. (2010). A Protein Transformation Protocol for Introducing Yeast Prion Particles into Yeast. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 681–693.
- Tanaka, M., Chien, P., Naber, N., Cooke, R., and Weissman, J. (2004). Conformational variation in an infectious protein determine prion strain differences. *Nature* *428*, 319–323.
- Taylor, R.C., and Dillin, A. (2011). Aging as an Event of Proteostasis Collapse. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a004440–a004440.
- Taylor, K.L., Cheng, N., Williams, R.W., Steven, A.C., and Wickner, R.B. (1999). Prion Domain Initiation of Amyloid Formation in Vitro from Native Ure2p. *Science* *283*, 1399–1343.
- Teixeira, D. (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* *11*, 371–382.

- Ter-Avanesyan, M.D., Dagkesamanskaya, A.R., Kushnirov, V.V., and Smirnov, V.N. (1994). The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi+] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *137*, 671–676.
- Tessarz, P., Mogk, A., and Bukau, B. (2008). Substrate threading through the central pore of the Hsp104 chaperone as a common mechanism for protein disaggregation and prion propagation. *Mol. Microbiol.* *68*, 87–97.
- Tessier, P., and Lindquist, S. (2007). Prion recognition elements govern nucleation, strain specificity and species barriers. *Nature* *447*, 556–561.
- Thual, C., Komar, A.A., Bousset, L., Fernandez-Bellot, E., Cullin, C., and Melki, R. (1999). Structural characterization of *Saccharomyces cerevisiae* prion-like protein Ure2. *J. Biol. Chem.* *274*, 13666–13674.
- Thual, C., Bousset, L., Komar, A.A., Walter, S., Buchner, J., Cullin, C., and Melki, R. (2001). Stability, Folding, Dimerization, and Assembly Properties of the Yeast Prion Ure2p[†]. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 1764–1773.
- Tibor Roberts, B., Moriyama, H., and Wickner, R.B. (2004). [URE3] prion propagation is abolished by a mutation of the primary cytosolic Hsp70 of budding yeast. *Yeast* *21*, 107–117.
- Tipton, K.A., Verges, K.J., and Weissman, J.S. (2008). In Vivo Monitoring of the Prion Replication Cycle Reveals a Critical Role for Sis1 in Delivering Substrates to Hsp104. *Mol. Cell* *32*, 584–591.
- Toyama, B.H., Kelly, M.J.S., Gross, J.D., and Weissman, J.S. (2007). The structural basis of yeast prion strain variants. *Nature* *449*, 233–237.
- True, H.L., and Lindquist, S.L. (2000). A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* *407*, 477–483.
- True, H.L., Berlin, I., and Lindquist, S.L. (2004). Epigenetic regulation of translation reveals hidden genetic variation to produce complex traits. *Nature* *431*, 184–187.
- Tsakiri, E.N., and Trougakos, I.P. (2015). The Amazing Ubiquitin-Proteasome System: Structural Components and Implication in Aging. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier), pp. 171–237.
- Tuite, M.F. (2013). The Natural History of Yeast Prions. In *Advances in Applied Microbiology*, (Elsevier), pp. 85–137.
- Tuite, M.F. (2015). Yeast prions: Paramutation at the protein level? *Semin. Cell Dev. Biol.* *44*, 51–61.
- Tyedmers, J., Madariaga, M.L., and Lindquist, S. (2008). Prion Switching in Response to Environmental Stress. *PLoS Biol.* *6*, e294.
- Valouev, I.A., Kushnirov, V.V., and Ter-Avanesyan, M.D. (2002). Yeast polypeptide chain release factors eRF1 and eRF3 are involved in cytoskeleton organization and cell cycle regulation. *Cell Motil. Cytoskeleton* *52*, 161–173.

- Vanik, D.L., Surewicz, K.A., and Surewicz, W.K. (2004). Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol. Cell* *14*, 139–145.
- Vanoni, M., Vai, M., and Frascotti, G. (1984). Effects of temperature on the yeast cell cycle analyzed by flow cytometry. *Cytometry* *5*, 530–533.
- Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, C. (1999). The 26S proteasome : a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* *68*, 1015–1068.
- Wallace, E.W.J., Kear-Scott, J.L., Pilipenko, E.V., Schwartz, M.H., Laskowski, P.R., Rojek, A.E., Katanski, C.D., Riback, J.A., Dion, M.F., Franks, A.M., et al. (2015). Reversible, Specific, Active Aggregates of Endogenous Proteins Assemble upon Heat Stress. *Cell* *162*, 1286–1298.
- Walther, D.M., Kasturi, P., Zheng, M., Pinkert, S., Vecchi, G., Ciryam, P., Morimoto, R.I., Dobson, C.M., Vendruscolo, M., Mann, M., et al. (2015). Widespread Proteome Remodeling and Aggregation in Aging *C. elegans*. *Cell* *161*, 919–932.
- Wang, K., Redeker, V., Madiona, K., Melki, R., and Kabani, M. (2015). The 26S Proteasome Degrades the Soluble but Not the Fibrillar Form of the Yeast Prion Ure2p In Vitro. *PLOS ONE* *10*, e0131789.
- Wegrzyn, R.D., Bapat, K., Newnam, G.P., Zink, A.D., and Chernoff, Y.O. (2001). Mechanism of Prion Loss after Hsp104 Inactivation in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 4656–4669.
- Weibezahn, J., Tessarz, P., Schlieker, C., Zahn, R., Maglica, Z., Lee, S., Zentgraf, H., Weber-Ban, E.U., Dougan, D.A., Tsai, F.T., et al. (2004). Thermotolerance requires refolding of aggregated proteins by substrate translocation through the central pore of ClpB. *Cell* *119*, 653–665.
- Wendler, P., Shorter, J., Snead, D., Plisson, C., Clare, D.K., Lindquist, S., and Saibil, H.R. (2009). Motor Mechanism for Protein Threading through Hsp104. *Mol. Cell* *34*, 81–92.
- Werner-Washburne, M., Braun, E.L., Crawford, M.E., and Peck, V.M. (1996). Stationary phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* *19*, 1159–1166.
- Westergard, L., and True, H.L. (2014). Wild yeast harbour a variety of distinct amyloid structures with strong prion-inducing capabilities: Wild yeast harbour distinct amyloid structures. *Mol. Microbiol.* *92*, 183–193.
- Wickner, R.B. (1994). [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *264*, 566–569.
- Wickner, R.B., and Kelly, A.C. (2016). Prions are affected by evolution at two levels. *Cell. Mol. Life Sci.* *73*, 1131–1144.
- Wickner, R.B., Edskes, H.K., and Shewmaker, F. (2006). How to find a prion: [URE3], [PSI⁺] and [β]. *Methods* *39*, 3–8.
- Wickner, R.B., Edskes, H.K., Bateman, D., Kelly, A.C., and Gorkovskiy, A. (2011). The yeast prions [PSI⁺] and [URE3] are molecular degenerative diseases. *Prion* *5*, 258–262.

- Wickner, R.B., Shewmaker, F.P., Bateman, D.A., Edskes, H.K., Gorkovskiy, A., Dayani, Y., and Bezsonov, E.E. (2015). Yeast Prions: Structure, Biology, and Prion-Handling Systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *79*, 1–17.
- Winkler, J., Tyedmers, J., Bukau, B., and Mogk, A. (2012). Hsp70 targets Hsp100 chaperones to substrates for protein disaggregation and prion fragmentation. *J. Cell Biol.* *198*, 387–404.
- Wójcik, C., and DeMartino, G.N. (2003). Intracellular localization of proteasomes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 579–589.
- Wu, J., Zhang, N., Hayes, A., Panoutsopoulou, K., and Oliver, S.G. (2004). Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 3148–3153.
- Xie, Z., Zhang, Y., Zou, K., Brandman, O., Luo, C., Ouyang, Q., and Li, H. (2012). Molecular phenotyping of aging in single yeast cells using a novel microfluidic device: Molecular phenotyping of aging. *Aging Cell* *11*, 599–606.
- Yu, H., Kago, G., Yellman, C.M., and Matouschek, A. (2016). Ubiquitin-like domains can target to the proteasome but proteolysis requires a disordered region. *EMBO J.* e201593147.
- Zakharov, I.A., and Yarovoy, B.P. (1977). Cytoinduction as a new tool in studying the cytoplasmic heredity in yeast. *Mol. Cell. Biochem.* *14*, 15–18.
- Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Eldakak, A., Rubinstein, B., and Li, R. (2011). Motility and Segregation of Hsp104-Associated Protein Aggregates in Budding Yeast. *Cell* *147*, 1186–1196.
- Zhou, C., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Guo, F., Yu, Z., Mickey, K., Narkar, A., Ross, R.T., McClain, M., and Li, R. (2014). Organelle-Based Aggregation and Retention of Damaged Proteins in Asymmetrically Dividing Cells. *Cell* *159*, 530–542.

Title : Infectious proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a blessing in disguise? Modulation of yeast prion propagation by the proteasome and molecular chaperones during diauxic shift and stationary phase

Keywords : yeast prions, 26S proteasome, molecular chaperons, chronological aging.

Abstract :

“Proteinaceous infectious particles”, or prions, are self-perpetuating alternate conformations of proteins that are responsible for heritable non-Mendelian traits in mammals, filamentous fungi and yeast. On a more general note, protein misfolding and aggregation is at the origin of over forty protein folding disorders including devastating neurodegenerative diseases such as Alzheimer’s, Parkinson’s or Huntington’s diseases. The aggregated proteins responsible for these diseases (i.e. amyloid- β peptide/tau, α -synuclein and huntingtin) were shown to propagate from cell to cell in a prion-like manner. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* hosts many prion or prion-like proteins, unrelated in sequence and function, which proved to be excellent models for understanding the dynamics of prion aggregation and distribution upon cell division.

Sup35p and Ure2p which cause the $[PSI^+]$ and $[URE3]$ heritable traits, respectively, stand out as the most studied and best characterized yeast prions to date. A plethora of cellular factors, mostly belonging to various molecular chaperone families, were shown to affect yeast prion formation and propagation. Clearance of protein aggregates and prion particles is however poorly understood and documented. Our laboratory showed that the 26S proteasome degrades both the soluble and prion-associated fibrillar forms of Sup35p. In the first part of my thesis, we investigated the role of the 26S proteasome in the degradation of the soluble and fibrillar forms of Ure2p. We found that, as with Sup35p, the 26S proteasome is able to degrade the soluble native Ure2p, generating an array of amyloidogenic N-terminal peptides and a C-terminal fragment which is resistant to proteolysis. The N-terminal prion domain was shown to act as a degron required for proteasomal engagement and degradation. In contrast to Sup35p, fibrillar Ure2p resisted proteasomal degradation. We expect the structural variability within prion assemblies in a cellular context to dictate their interaction with proteolytic machineries in general and the proteasome in particular.

The biology of yeast prions has been mostly explored in the context of logarithmically dividing cells. In nature however, most cells are generally in a post-mitotic non-dividing quiescent state. Yet little is known about the fate and properties of prion particles upon yeast cells entry into the stationary or quiescent states and the physiological consequences of harboring these prions throughout the lifespan of yeast cells. In the second part of my thesis, we addressed this issue using the $[PSI^+]$ prion as a model. Structurally different conformers of Sup35p aggregates can lead to distinct $[PSI^+]$ strains with different prion phenotypes. We found that Sup35p prion particles undergo growth phase-dependent ultrastructural and functional changes. Indeed, the size distributions of SDS-resistant core-prion particles significantly change during growth without affecting the structural information specific to each prion strain. The infectious properties of Sup35p prion particles undergo dramatic growth phase-dependent changes. Importantly, we found that while $[PSI^+]$ has little to no effects on the growth rates of yeasts, it robustly prolongs their chronological lifespan. Furthermore, this beneficial effect can then be permanently and efficiently fixed in the cells even when $[PSI^+]$ is subsequently lost. Similar genetic fixation of $[PSI^+]$ -induced epigenetic characteristics were previously observed and suggested $[PSI^+]$ (and possibly other prions) can act as transient evolutionary capacitors.



Titre : Protéines infectieuses chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* : un mal pour un bien ? Modulation de la propagation de prions de levure par le protéasome et les chaperons moléculaires durant la transition diauxique et la phase stationnaire

Mots clés : prions de levure, protéasome 26S, chaperons moléculaires, vieillissement chronologique.

Résumé :

Les prions sont des protéines qui suite à des changements de conformation acquièrent un caractère infectieux. Ils sont à l'origine de traits dominants, héréditaires de façon non-Mendélienne, chez les mammifères, les champignons filamenteux et les levures. Le mauvais repliement et l'agrégation des protéines sont à l'origine de plus de 40 maladies, parmi lesquelles on retrouve des maladies neurodégénératives telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington. Il a été montré que les formes agrégées des protéines supposées responsables de ces maladies (i.e. peptide amyloïde- β /tau, α -synucléine, huntingtine) se propagent de cellule en cellule à la manière des prions. La levure *Saccharomyces cerevisiae* possède plusieurs prions qui sont autant d'excellents modèles biologiques pour la compréhension des mécanismes de formation et de propagation des prions.

[*PSI*⁺] et [*URE3*], issus respectivement de la conversion sous forme prion du terminateur de la traduction Sup35p et d'un régulateur du métabolisme azoté Ure2p, sont à ce jour les deux prions les mieux documentés chez la levure. Les chaperons moléculaires et leurs co-chaperons modulent la formation, la réplication et la propagation des prions chez la levure. Cependant, l'élimination ou la dégradation de ces prions sont encore mal connus. Notre laboratoire a montré que le protéasome 26S est capable de dégrader les formes soluble et fibrillaire de Sup35p. Dans la première partie de ma thèse, nous avons étudié le rôle du protéasome 26S dans la dégradation des formes soluble et fibrillaire d'Ure2p. Nous avons montré que, comme pour Sup35p, le protéasome 26S dégrade Ure2p soluble en générant des peptides amyloïdes issus du domaine prion N-terminal ainsi qu'un fragment C-terminal résistant à la protéolyse. Nous avons montré que le domaine prion déstructuré est nécessaire pour la reconnaissance et la dégradation par le protéasome. Contrairement à ce qui avait été observé pour Sup35p, Ure2p sous sa forme fibrillaire est totalement résistante à la dégradation protéasomale. Nous suggérons que la variabilité structurale aux seins des particules de prions dans un contexte cellulaire dicte leurs interactions avec les machineries protéolytiques, et plus particulièrement avec le protéasome.

Les prions de levure ont principalement été étudiés dans un contexte de cellules en division active. Cependant, dans la nature, la plupart des cellules sont retrouvées dans un état quiescent post-mitotique. Nous n'avons que très peu d'informations sur le devenir des particules de prions lorsque les cellules entrent dans un état quiescent. De même les conséquences physiologiques des prions sur la survie à long terme des levures sont très peu documentées. Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons utilisé le prion [*PSI*⁺] comme modèle pour répondre à ces questions. Différentes conformations des agrégats de Sup35p conduisent à des souches phénotypiquement distinctes du prion [*PSI*⁺]. Nous avons constaté que les agrégats de Sup35p subissent des changements ultra-structuraux et fonctionnels au cours des différentes phases de croissance cellulaire. Ainsi, nous avons observés des changements importants dans la distribution de taille et dans l'infectiosité des polymères de Sup35p résistants au SDS formant les briques élémentaires du prion [*PSI*⁺]. Ces changements interviennent sans affecter les informations structurales spécifiques à chaque souche de prion [*PSI*⁺]. De façon remarquable, bien que [*PSI*⁺] n'affecte pas le taux de croissance des levures, ce prion semble prolonger significativement la durée de vie des levures. Cet effet bénéfique semble pouvoir se fixer de façon efficace et permanente dans les cellules et persister même après élimination de [*PSI*⁺]. La fixation génétique de caractéristiques épigénétiques induites par [*PSI*⁺] ont été déjà observées et l'ensemble de ces résultats suggère que [*PSI*⁺] (et éventuellement d'autres prions) peut jouer le rôle de capaciteurs évolutifs transitoires.

