



HAL
open science

Etude de facteurs impliqués dans le contrôle-qualité de l'expression des gènes, chez *Saccharomyces cerevisiae*

Elodie Zhang

► **To cite this version:**

Elodie Zhang. Etude de facteurs impliqués dans le contrôle-qualité de l'expression des gènes, chez *Saccharomyces cerevisiae*. Biologie moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066500 . tel-02357936

HAL Id: tel-02357936

<https://theses.hal.science/tel-02357936>

Submitted on 11 Nov 2019

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

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

Université Pierre et Marie Curie

École doctorale : Complexité du Vivant
Laboratoire : Génétique des Interactions Macromoléculaires

Thèse de doctorat de Biologie Moléculaire et Cellulaire

**Étude de facteurs impliqués dans le contrôle-
qualité de l'expression des gènes, chez
Saccharomyces cerevisiae.**

Présentée et soutenue publiquement le Jeudi 09 Novembre 2017

Par Élodie ZHANG

Devant un jury composé de :

M. Frédéric DEVAUX

Mme Josette BANROQUES

M. Marc GRAILLE

M. Domenico LIBRI

M. Olivier NAMY

Mme Micheline FROMONT-RACINE

Président du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse



献给我的爸爸妈妈,
À mes parents,

Remerciements

Ainsi s'achève (ou devrais-je dire « commence » ?) ma thèse... Jamais je n'aurais pensé pouvoir aller si loin. La route est semée d'embûches mais je ne regrette rien. J'ai travaillé sur des sujets passionnants et rencontré des personnes formidables. Je garderai un très bon souvenir de ces trois années passées dans le laboratoire GIM.

Je voudrais remercier Frédéric Devaux de m'avoir fait l'honneur d'être le président de mon jury de thèse, c'était important pour moi puisque tu m'as ouvert la voie vers la Recherche : tu m'as donné mes premiers contacts au Royaume-Uni pour mes stages de M1 ! Merci également à Josette Banroques, Marc Graille, Domenico Libri et Olivier Namy d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer mon travail. Olivier Namy, nos échanges lors des comités de thèse ont toujours été très enrichissants et encourageants.

J'adresse des remerciements particuliers à ma directrice de thèse, Micheline Fromont-Racine : merci pour la confiance que tu m'as accordée en m'intégrant dans ton projet de recherche, pour m'avoir toujours poussé à me surpasser et pour m'avoir soutenue et guidée pendant ces trois années ! J'ai énormément appris à tes côtés !

Je remercie Alain Jacquier, pour m'avoir accueillie dans ton laboratoire et pour ton implication dans les projets de Micheline et moi. Tes avis et conseils nous ont beaucoup apporté. Je n'oublierai pas que tu as même fait un Northern Blot avec moi !

Merci beaucoup Antonia Doyen pour toute l'aide que tu m'as apportée au niveau des manipulations : je n'ai jamais vu d'aussi beaux ARN que les tiens ! Ta bonne humeur, ton soutien et tes encouragements m'ont beaucoup motivé !

Je remercie Abdelkader Namane pour les expériences et analyses de spectrométrie de masse que tu as effectuées mais également pour toutes les discussions diverses et variées que nous avons pu avoir, j'ai bien ri !

Je remercie Varun Khanna et Christophe Malabat car sans vous, bien des données seraient encore en train de dormir quelque part ! Votre aide pour le traitement des données de mes expériences représente une bonne partie de cette thèse.

Merci également à Bernard Turcotte, grâce à toi, ma thèse a pris un nouveau tournant après un an et demi avec le projet *SKA1*.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Alicia Nevers, mon alter-ego au laboratoire. Merci d'être toujours là pour moi, dans les bons comme dans les mauvais moments. Je mesure la chance que j'ai eu d'effectuer ma thèse, en même temps et dans le même laboratoire que toi. Le « Binôme de choc », c'est nous !

Un grand merci à Lucia Oreus pour tout ce que tu as fait : les litres et les litres de milieu, les boîtes de pétri, les solutions, etc. Tu as toujours été très disponible pour m'aider dès que j'en avais besoin. Je me souviendrais toujours de ton soutien et de ta gentillesse.

Je voudrais remercier les membres de mon laboratoire, vous avez tous contribué à ce que cette thèse me soit agréable. Merci pour votre accueil et votre soutien. Gwenaël Badis-Bréard, merci de m'avoir formé aux expériences de CRAC. Cosmin Saveanu, Laurence Decourty et Marine Dehecq, merci pour tous les conseils que vous avez pu me donner. Frank Feuerbach, merci pour les discussions scientifiques et non-scientifiques que nous avons eues, je me souviendrai tout particulièrement d'un jour où tu nous as appris, à Alicia et moi, « comment écouter *Rage Against The Machine* ». Christelle Lenormand, merci pour l'aide que tu m'as fourni administrativement. Claudine Porée, merci pour ton travail dans le laboratoire de préparation. Je remercie aussi les anciens membres GIM, Quentin Defenouillère, pour m'avoir épaulé au début de ma thèse, Monique Moulin et Birame Name, pour votre travail dans le laboratoire de préparation.

Merci également aux plateformes de transcriptomique et de protéomique pour les accès dans vos locaux. Un merci particulier à Odile Sismeiro, Caroline Proux et Rachel Legendre pour votre disponibilité et votre aide.

Je remercie les collègues du 4^{ème} étage du bâtiment Fernbach pour leur aide, même ponctuelle, lors de mes recherches de matériels ou réactifs. Plus particulièrement, je remercie Simon Malesys, Valentine Mosbach, Lucie Poggi et Rostyslav Makarenko pour votre soutien qui fait du bien au moral et pour tous les moments dans et hors labo passés ensemble ! David Viterbo, Frédéric Moyrand, Célia Raimondi, Samia Miled et Corinne Maufrais, merci pour votre présence qui a rendu les journées meilleures.

Merci aussi à Claire Torchet et Alice Lebreton d'avoir été membres de mon comité de thèse, les discussions que nous avons eues ont été très intéressantes et enrichissantes.

Je voudrais remercier mes amis dont le soutien a été indispensable. Je n'oublierai jamais tous les petits et grands moments que nous avons partagés durant ces trois années. Je suis vraiment heureuse de vous avoir auprès de moi pour l'aboutissement de cette thèse ! Jérôme, merci pour les bons petits repas que nous avons partagés, ils m'ont bien changé les idées. Julie & Alexandre, merci pour votre soutien sans faille et vos petites attentions, ils m'ont rendu plus forte. Mayalène & Germain, merci pour tous les bons souvenirs que nous partageons depuis toutes ces années. Alicia & Quentin, merci pour tous les moments simples et chaleureux que nous avons passés ensemble. Amélie et Magali, merci pour vos encouragements, même de l'autre bout du monde. Octavio & Anne, Marc, Elodie, Zehua, Jing, Xiao, Lila... Tout simplement merci à vous tous.

Je remercie infiniment ma famille pour leurs encouragements, leur bienveillance et leur présence. Aucun mot ne saurait exprimer toute la gratitude et le bonheur que je ressens de vous avoir dans ma vie. Merci Papa & Maman, car d'une certaine manière, vous avez fait de moi la personne que je suis aujourd'hui. Je vous remercie de m'avoir toujours encouragé et de m'avoir fait confiance dans mes choix professionnels et personnels. Merci aussi à mes deux grands frères protecteurs, Lei et Yun ainsi qu'à mes adorables neveux et nièces, Lucas, Camille, Yuna et Théo. Merci à ma super cousine Sylvie. Je remercie également du fond du cœur ma « deuxième » famille, Dominique & Jean-Marc, Nanie & Georges, Mamie Nandou & Papi Ron, Nathan & Angéla et Julia, vous m'avez accueillie les bras grand-ouverts dans votre famille, m'avez soutenue tout au long de mon parcours, et bien plus encore. Merci pour tout le bonheur que vous m'apportez.

Enfin, je souhaite remercier profondément Antonin, la personne avec qui je partage ma vie. Depuis que l'on se connaît, tu as cru en moi et m'a soutenue dans toutes les étapes importantes de ma vie, me donnant ainsi la force nécessaire pour continuer à sourire et à avancer, même dans les moments les plus difficiles. Sans toi, je ne serai jamais arrivée jusqu'ici aujourd'hui.

Liste des abréviations

AA : **A**cide **a**miné
ADN : **A**cide **d**ésoxyribonucléique
ARN : **A**cide **r**ibonucléique
CAT-tail : **C**-terminal **A**lanine-**T**hreonine tail
CCT : **C**haperonin-**c**ontaining **T**CP1 complex
CLIP : **C**ross-**l**inking **i**mmunoprecipitation
CRAC : UV-**C**rosslinking and **a**nalysis of **c**DNA
ERAD : **E**ndoplasmic-**r**eticulum-**a**ssociated protein **d**egradation
GIM : **G**enetic **i**nteracting **m**apping
IAA : **I**ndole 3-**a**cetic **a**cid
IBAC : **I**ntermediate **b**iological **a**nalyzer and **c**ollector
IgG : **I**mmunoglobuline **G**
IPOD : **I**nsoluble **p**rotein **d**eposit
JUNQ : **J**uxta **n**uclear **q**uality control compartment
LC-MS/MS : **L**iquid **c**hromatography coupled to tandem **M**ass **S**pectrometry
LFQ : **L**abel-**f**ree **q**uantification
MS : **M**ass **S**pectrometry
MTOC : **M**icrotubule **o**rganizing **c**enter
NMD : **N**onSense-**m**ediated mRNA **d**ecay
NGD : **N**o-**G**o mRNA **d**ecay
NMR : **N**uclear **m**agnetic **r**esonance
NSD : **N**on-**S**top mRNA **d**ecay
ORF : **O**pen **r**eadin**f**rame
PCR : **P**olymerase **c**hain **r**eaction
PTC : **P**remature **t**erminaison **c**odon
RIP : **R**NA **i**mmunoprecipitation
RQC : **R**ibosome-bound **q**uality **c**ontrol
RQT : **R**QC-trigger
Rz : **R**ibozyme
SAXS : **S**mall **a**ngle **X**-rays **s**cattering
SDS : **S**odium **d**odecyl **s**ulfate
SKI : **S**uper**k**iller
SUT : **S**table **u**nnanotated **t**ranscript
TAP : **T**andem **a**ffinity **p**urification
TCA : **T**richloro-**a**cetic-acid
TRAMP : **T**rf4/**A**ir2/**M**tr4 **p**olyadenylation complex
TRiC : **T**CP1 **R**ing **C**omplex
uORF : **u**pstream ORF
UTR : **U**ntranslated **r**egion
XUT : **X**rn1-sensitive **u**nstable **t**ranscript
WT : **W**ild-**t**ype

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	9
I – REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES ET CONTROLE-QUALITE	9
II – TRADUCTION	11
II. 1. LE RIBOSOME	11
II. 2. INITIATION DE LA TRADUCTION	12
II. 3. ELONGATION DE LA TRADUCTION	15
II. 4. TERMINAISON DE LA TRADUCTION ET RECYCLAGE DES RIBOSOMES	16
II. 5. REINITIATION DE LA TRADUCTION	18
III – DEGRADATION DES ARN MESSAGERS CLASSIQUES	19
III. 1. DEADENYLATION	21
III. 2. DEGRADATION 5' – 3'	22
III. 3. DEGRADATION 3' – 5'	26
IV – DEGRADATION DES ARN MESSAGERS ABERRANTS	31
IV. 1. NONSENSE-MEDIATED DECAY (NMD)	31
IV. 2. NON-STOP DECAY (NSD) ET NO-GO DECAY (NGD)	35
V – DEGRADATION DES PEPTIDES NAISSANTS ABERRANTS	38
VI – FORMATION D'AGREGATS PROTEIQUES ET TOXICITE	44
OBJECTIF DE LA THESE	48
RESULTATS	50
I – JLP2, UN NOUVEAU CANDIDAT DANS LA DEGRADATION DES PEPTIDES ET ARN MESSAGERS ABERRANTS NON-STOP ?	50
I. 1. DONNEES INITIALES.	50
I. 2. STRUCTURE DE JLP2.	53
I. 3. ANALYSE DE DONNEES DANS LA LITTERATURE.	54
I. 4. JLP2 : UN ROLE DANS LE NSD ?	56
I. 5. EFFET DE LA SUREXPRESSION DE JPL2	59
I. 6. JLP2 N'EST PAS ASSOCIE AUX RIBOSOMES	61
I. 7. RECHERCHE DE PARTENAIRES PROTEIQUES DE JLP2	63
I. 8. CONCLUSIONS	65
II – TAC4, UN NOUVEAU CANDIDAT DANS LA REINITIATION DE LA TRADUCTION DANS LE 3'-UTR DES ARN MESSAGERS ?	66
II. 1. DONNEES INITIALES.	66
II. 2. DONNEES OBTENUES LORS DE MA THESE	70
II. 3. CONCLUSIONS	73
III – Un nouveau sous-complexe SKI implique dans la dégradation des transcrits dépourvus de ribosome	76
III. 1. SKA1, UN NOUVEAU FACTEUR ASSOCIE A UNE SOUS-POPULATION DU COMPLEXE SKI.	76
III. 2. SKA1 N'EST PAS NECESSAIRE A L'ASSEMBLAGE DU COMPLEXE SKI.	79
III. 3. L'ASSOCIATION DE SKA1 AVEC LES RIBOSOMES EST DEPENDANTE DE L'ARN.	81
III. 4. DES INTERMEDIAIRES DE DEGRADATION EN 3'-UTR DES ARN MESSAGERS SONT ACCUMULES EN ABSENCE DE SKA1.	83
III. 5. LES CIBLES DE SKA1	86
III. 6. MODELE PROPOSE ET CONCLUSION.	89
IV – Rqc1 ET Ltn1 sont essentiels pour éviter l'agregation des peptides aberrants induites par l'addition des CAT-TAIL par Rqc2	103
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	118
I – SKA1 ET LA DEGRADATION DES TRANSCRITS	118

I. 1. LE SOUS-COMPLEXE SKI-SKA1 EST IMPLIQUE DANS LA DEGRADATION DES TRANSCRITS DEPOURVUS DE RIBOSOMES.	118
I. 2. LE SOUS-COMPLEXE SKI-SKA1 EST IMPLIQUE DANS LA DEGRADATION DES XUT ET DES SUT.	120
I. 3. LE COMPLEXE SKI-SKA1 S'ASSEMBLE DE FAÇON CO-TRADUCTIONNELLE.	120
I. 4. RECHERCHE D'HOMOLOGUES.	121
II – TAC4 ET LE DEVENIR DES RIBOSOMES NON DISSOCIES ?	122
III – JLP2 ET LA VOIE DE DETOXIFICATION ?	124
MATERIELS ET METHODES	128
BIBLIOGRAPHIE	135
ANNEXES	155
ANNEXE 1 – SOUCHES DE LEVURE UTILISEES	155
ANNEXE 2 – PLASMIDES UTILISES	157
ANNEXE 3 – OLIGONUCLEOTIDES UTILISES	158
ANNEXE 4 – ANTICORPS UTILISES POUR LES IMMUNODETECTIONS	159

Introduction

I – Régulation de l'expression des gènes et contrôle-qualité

L'expression des gènes chez les eucaryotes est un ensemble de processus par lesquels l'ADN, support de l'information génétique, est transcrit en ARN messagers dans le noyau pour finalement aboutir à la synthèse de protéines matures et fonctionnelles dans le cytoplasme. Ces différentes étapes de l'expression génétique sont finement régulées et contrôlées par des mécanismes moléculaires, permettant ainsi de garantir une quantité et une qualité optimales en ARN messagers et protéines répondant aux besoins de la cellule.

Des études de transcriptomique couplées à des études de protéomique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et sur des cellules humaines ont montré que le niveau de transcrits d'un gène est bien corrélé avec le niveau d'expression des protéines correspondantes (Edfors et al., 2016; Lawless et al., 2016)(**Figure 1**).

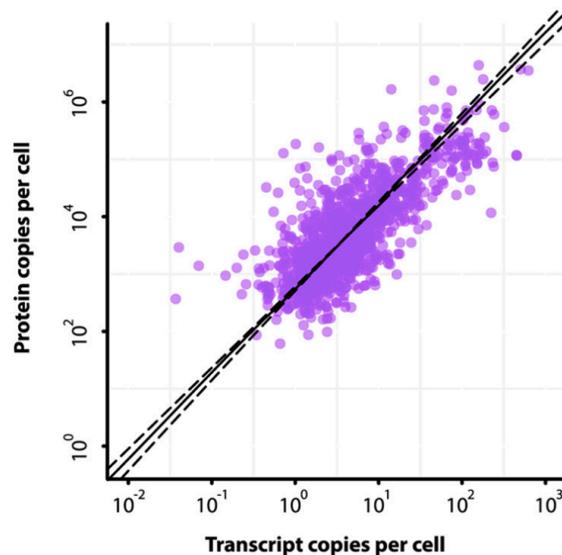


Figure 1. Corrélation entre le niveau de transcrits et le niveau de protéines
Graphe représentant la relation entre le protéome et le transcriptome pour environ 1 800 protéines/gènes chez *Saccharomyces cerevisiae* (Lawless et al., 2016).

De plus, il existe des variations d'expression très importantes en fonction des gènes. En effet, alors que certains gènes codent seulement pour quelques dizaines de copies de protéines par cellule, d'autres protéines ont un niveau d'expression très élevé, de l'ordre de millions de copies par cellule (Ghaemmaghami et al., 2003). Ces grandes variations d'abondance des ARN messagers et protéines dans une cellule sont

explicables, pour une grande partie, par les propriétés intrinsèques des transcrits, par exemple l'efficacité du promoteur associé ou encore la stabilité du transcrit.

Dans des conditions de stress, les cellules doivent s'adapter rapidement pour garantir leur survie. Les mécanismes d'adaptation cellulaire peuvent se traduire par des changements métaboliques, une réorganisation du cytosquelette, des modifications au niveau des activités enzymatiques. Mais la réponse majeure dépend de la variation de l'expression des gènes. Elle peut se traduire par des effets post-traductionnels, qui permettent une réponse rapide et immédiate. Mais également pendant la synthèse des ARN messagers *via* par exemple la régulation de la dynamique de la chromatine, de l'initiation et de l'élongation de la transcription, au niveau des modifications post-transcriptionnelles, de la stabilité des ARN messagers et de leur export dans le cytoplasme, permettant ainsi une réponse plus lente mais plus efficace sur le long-terme (de Nadal et al., 2011). A titre d'exemple, chez la levure, lors d'un stress, environ 600 gènes sont régulés négativement, ces gènes sont en général impliqués dans des processus liés à la croissance cellulaire, au métabolisme des ARN ou encore à la synthèse des protéines. En parallèle, parmi les 300 gènes qui sont fortement induits pendant un stress cellulaire, on retrouve notamment des gènes impliqués dans la défense contre le stress, la réponse au choc thermique et la dégradation des protéines (Causton et al., 2001; Gasch, 2007). Il est ainsi vital pour les cellules de maintenir efficacement un équilibre entre synthèse et dégradation des ARN messagers et protéines, modulable facilement, afin de garantir un niveau d'expression répondant aux besoins cellulaires en fonction de l'environnement.

Par ailleurs, il existe également des mécanismes de contrôle-qualité des ARN messagers et des protéines. Ces mécanismes ont été identifiés et agissent en général durant les étapes de synthèse et de maturation des ARN messagers et des protéines. Nous connaissons aujourd'hui, dans le cytoplasme, trois voies de contrôle-qualité reconnaissant chacune des types spécifiques de transcrits. Ces voies permettent de reconnaître et de dégrader les ARN messagers non-conformes ainsi que les peptides aberrants en cours de traduction qui leur sont associés. La dégradation de ces éléments aberrants est importante pour la vie cellulaire car d'une part, ils peuvent empêcher le bon fonctionnement de la cellule et être potentiellement toxiques en formant, par exemple, des agrégats protéiques (Richter et al., 2010; Holmes et al., 2014) et d'autre part, ils monopolisent la machinerie de traduction inutilement. Ainsi, le contrôle-qualité

de l'expression des gènes est un processus fondamental, très conservé au cours de l'évolution et nécessitant de nombreux mécanismes et facteurs protéiques qui ne sont pas systématiquement essentiels mais qui le deviendraient en cas de stress cellulaire affectant l'intégrité des ARN messagers ou des protéines.

Ces mécanismes de dégradation des transcrits cytoplasmiques, que ce soit pour la dégradation générale ou pour la dégradation des transcrits aberrants ont lieu co-traductionnellement (Pelechano et al., 2015; Schmidt et al., 2016).

Je vais donc, dans un premier temps, décrire les étapes de la traduction avant de développer la dégradation des ARN messagers classiques et aberrants ainsi que celle de leurs peptides correspondants.

II – Traduction

La traduction, le processus de synthèse des protéines, est une étape fondamentale de l'expression des gènes. Elle permet le décodage de l'information génétique portée par les ARN messagers pour produire les protéines correspondantes fonctionnelles grâce aux ribosomes. La traduction constitue un des mécanismes les plus conservés au cours de l'évolution, que cela soit au niveau de la structure du ribosome, des différentes étapes, des différents mécanismes mais également des facteurs impliqués dans ces mécanismes (Davidovich et al., 2009; revue Rodnina and Wintermeyer, 2009). Il s'agit d'un processus cyclique comportant quatre étapes principales : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage.

II. 1. Le ribosome

Les ribosomes sont les acteurs principaux de la traduction des ARN messagers en protéines, ils sont donc au cœur de l'expression des gènes. Ce sont des complexes ribonucléoprotéines, c'est-à-dire qu'ils sont composés d'ARN ribosomiques et de protéines ribosomales. Les ribosomes constituent l'un des éléments les plus conservés au cours de l'évolution, malgré les différences de poids moléculaire existant entre les procaryotes et les eucaryotes (respectivement 2,5MDa et 4MDa). La traduction est donc un mécanisme extrêmement optimisé. Le ribosome 80S possède deux sous-unités, une grande sous-unité 60S et une petite sous-unité 40S (respectivement 50S et 30S chez les procaryotes). La grande sous-unité 60S est constituée de 3 ARN ribosomiques [5S, 5,8S

et 28S (25S chez la levure)] et de 47 protéines RPL (pour « Ribosomal protein of the large subunit »), elle possède trois sites : « aminoacyl » ou « accepteur » (A), « peptidyl » (P) et « exit » (E) pouvant contenir des ARN de transfert, et le centre peptidyl-transférase où se déroule le transfert de la liaison covalente entre chaque ARN de transfert aminoacylé et le peptide en cours de synthèse. Elle possède également le tunnel de sortie des peptides nouvellement synthétisés (Sonenberg et al., 1977). La petite sous-unité 40S est composée d'un ARN ribosomique 18S et 33 protéines RPS (pour « Ribosomal protein of the small subunit »). Elle contient le sillon où passe l'ARN messager en cours de traduction et elle est la première des sous-unités recrutée sur l'ARN messager pendant l'étape d'initiation de la traduction (**Figure 2**).

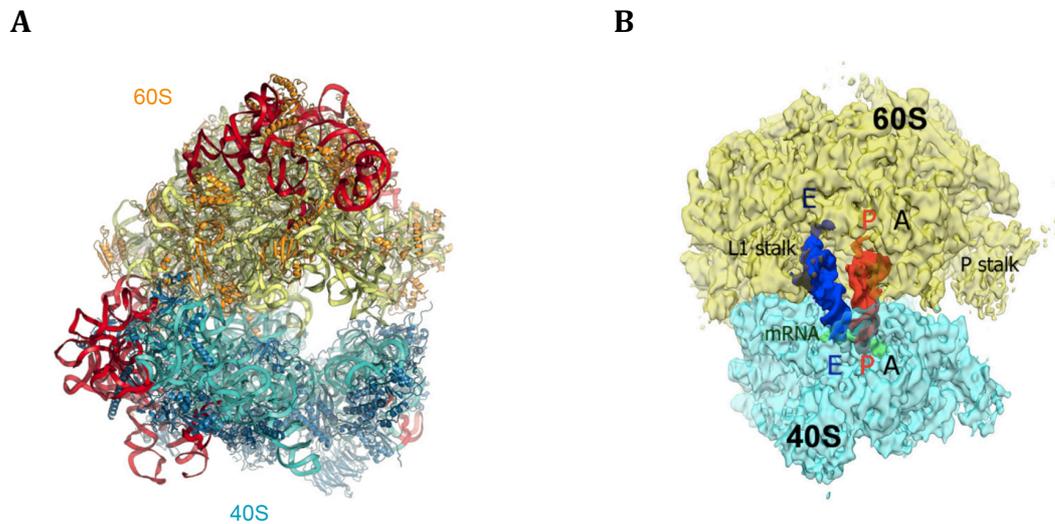


Figure 2. Structure du ribosome 80S chez *Saccharomyces cerevisiae*.

(A) Données obtenues par cristallographie : la sous-unité 60S est représentée en jaune avec les protéines en orange. La sous-unité 40S est représentée en bleu cyan avec les protéines en bleu foncé. Les segments d'expansion des ARN ribosomiques sont en rouge (adapté de Jenner et al., 2012). (B) Données obtenues par cryo-microscopie électronique : le ribosome est lié à deux ARN de transfert dans les sites E et P. La sous-unité 60S est représentée en jaune et la sous-unité 40S est représentée en bleu (Svidritskiy et al., 2014).

II. 2. Initiation de la traduction

La première étape d'initiation de la traduction consiste en l'assemblage de deux complexes ribonucléoprotéiques (revues Kapp and Lorsch, 2004; Jackson et al., 2010). Le premier complexe de pré-initiation, le 43S, est composé de la sous-unité 40S, du complexe ternaire eIF2-GTP-Met-ARN_t^{Met} et des protéines eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 (Levin et al., 1973) alors que le second complexe eIF4F est formé des protéines eIF4G-

eIF4A-eIF4E et eIF4B. Il s'assemble sur la coiffe à l'extrémité 5' des ARN messagers et permet l'étape d'activation de l'ARN messenger grâce au rapprochement entre la coiffe en 5' et la protéine Pab1 liée à la queue poly(A) en 3', qui conduit à la circularisation du transcrit. Ces deux complexes s'associent pour permettre l'interaction entre la coiffe en 5' de l'ARN messenger et la sous-unité 40S (Pisarev et al., 2008). Puis, les structures secondaires de l'ARN messenger sont déroulées par le complexe eIF4F et eIF4B (Marintchev et al., 2009). La sous-unité 40S peut alors procéder à une étape de « scanning » en parcourant le transcrit de l'extrémité 5' vers 3' jusqu'à atteindre le codon d'initiation AUG. Le complexe 48S composé de la sous-unité 40S ribosomale, de l'ARN messenger et des facteurs d'initiation de la traduction se forme sur ce codon AUG (Chaudhuri et al., 1997; Pestova et al., 1998). Les facteurs eIF5 et eIF5B-GTP sont alors recrutés et favorisent l'hydrolyse du GTP par eIF2, ce qui permet le recyclage des facteurs d'initiation de la traduction et l'association de la sous-unité 40S-ARN messenger avec la sous-unité 60S (Raychaudhuri et al., 1985; Pestova et al., 2000). Cette étape permet l'hydrolyse du GTP par eIF5B pour se dissocier du ribosome. Le ribosome 80S est alors compétent pour l'élongation de la traduction (Lorsch and Herschlag, 1999)(**Figure 3**).

Introduction

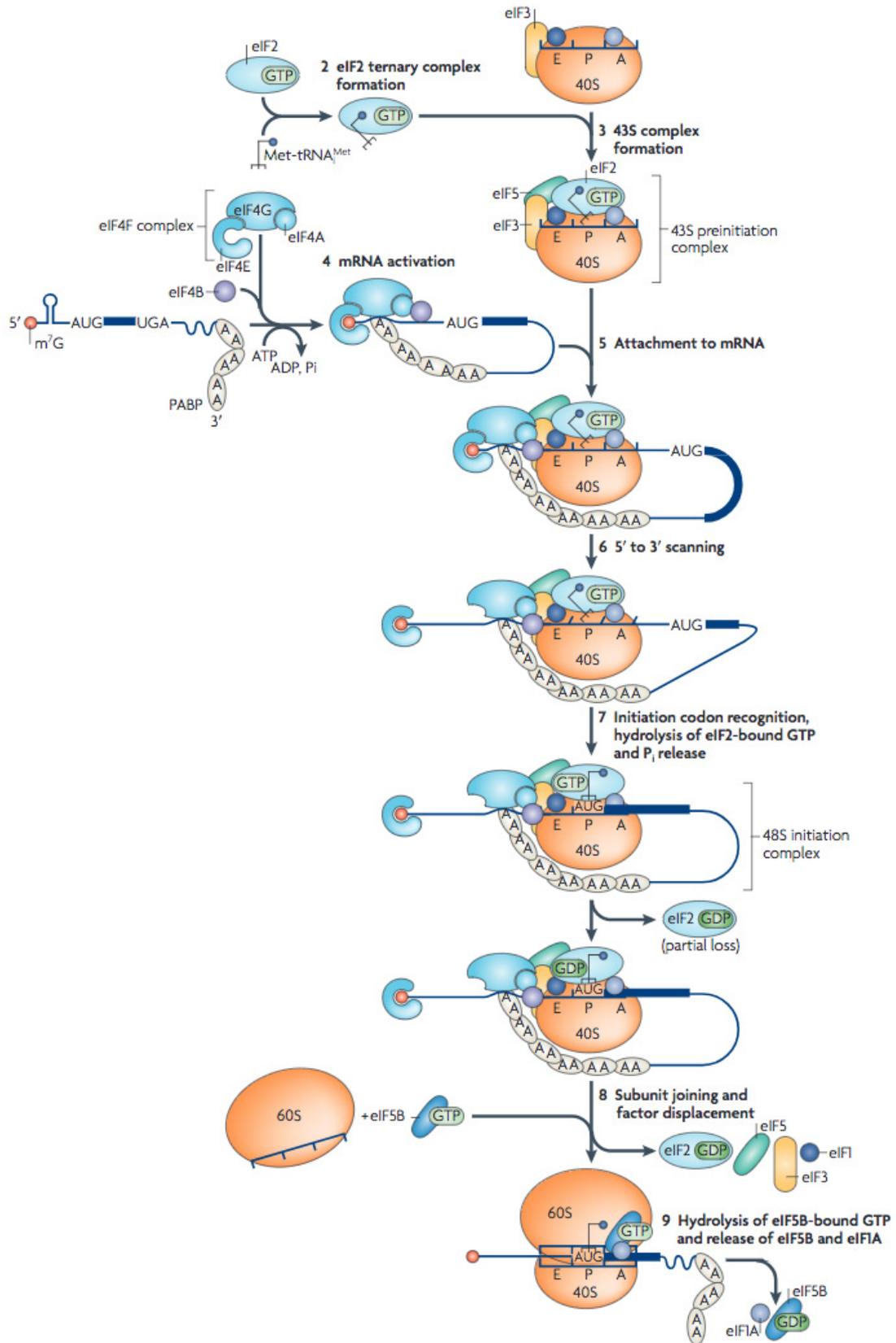


Figure 3. Schéma représentant l'initiation de la traduction.
(Adapté de Jackson et al., 2010)

II. 3. Elongation de la traduction

L'étape d'élongation de la traduction implique trois étapes : le décodage du codon en cours de traduction, la formation de la liaison peptidique et la translocation du complexe ARN de transfert-ARN messenger.

Au démarrage de la traduction, le ribosome 80S assemblé sur l'ARN messenger contient dans son site P un ARN de transfert initiateur Méthionine ($\text{Met-ARN}_{\text{t}}^{\text{Met}}$) et le codon AUG, alors que le site A contient le codon suivant et attend l'appariement de l'ARNt-aminoacyl correspondant. Cet appariement s'effectue grâce au facteur d'élongation de la traduction eEF1A qui interagit avec un ARN de transfert chargé de manière GTP-indépendante et guide cet ARN de transfert dans le site A du ribosome (Moon et al., 1972), induisant une hydrolyse de l'ATP par eEF1A permettant son propre recyclage.

Le centre peptidyl-transférase de la sous-unité 60S catalyse la formation de la première liaison peptidique entre la méthionine portée par l' $\text{ARN}_{\text{t}}^{\text{Met}}$ et l'acide aminé porté par l'ARN de transfert dans le site A.

L'étape suivante est la rotation des sous-unités ribosomiques appelée « ratcheting » (Frank and Agrawal, 2000). Elle permet le déplacement des ARN de transfert vers les états hybrides A/P et P/E respectivement. La GTPase eEF2 va hydrolyser le GTP pour stabiliser l'état hybride des ARN de transfert, puis un changement de conformation de eEF2 permettra la translocation des ARN de transfert et des ARN messagers à l'intérieur du ribosome en cours d'élongation (Gao et al., 2009). Le site E contiendra donc un ARN de transfert-acyl qui sera ensuite recyclé et le site P contiendra un ARN de transfert lié covalamment à la chaîne peptidique en cours de traduction appelé « peptidyl-ARN de transfert ». Enfin, le site A du ribosome sera de nouveau libre et positionné sur le troisième codon de l'ARN messenger pour accueillir le prochain ARN de transfert-aminoacyl (revue Dever and Green, 2012)(**Figure 4**).

L'élongation de la traduction suivra ensuite ce même schéma de manière cyclique jusqu'à ce que le ribosome rencontre un des trois codons de terminaison (UAA, UAG, UGA) à la fin de la séquence codante.

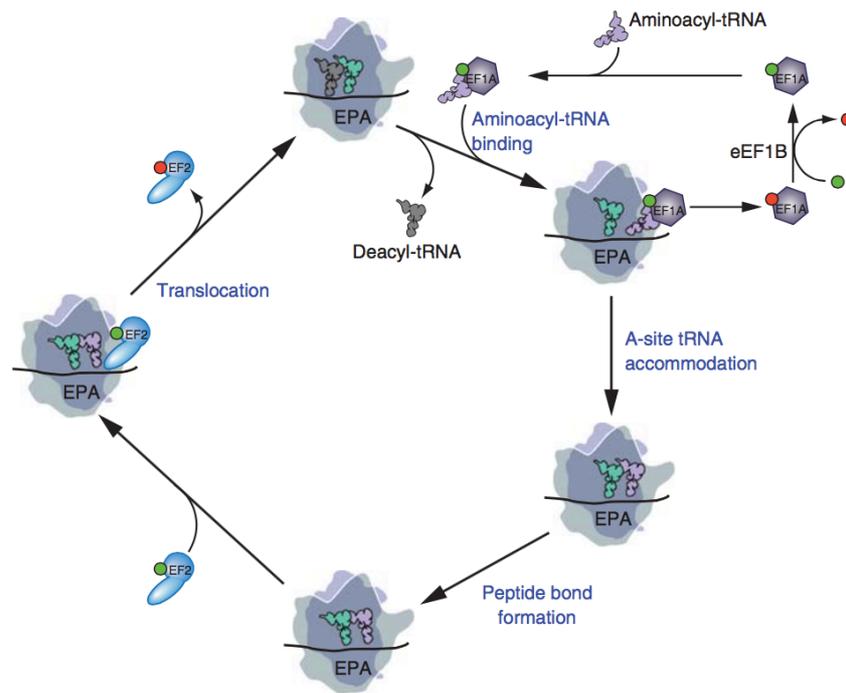


Figure 4. Schéma représentant l'élongation de la traduction.
(Dever and Green, 2012)

II. 4. Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes

La terminaison de la traduction est catalysée par les protéines eRF1 et eRF3 (Stansfield et al., 1995; Zhouravleva et al., 1995; Alkalaeva et al., 2006).

eRF1 est un homologue structural d'ARN de transfert. Elle possède trois domaines : le domaine N-terminal contient un motif NIKS nécessaire pour la reconnaissance du codon de terminaison grâce à des interactions du même type que codon : anticodon (Chavatte et al., 2002; Frolova et al., 2002), le domaine central appelé M est un analogue fonctionnel de la boucle acceptrice d'un ARN de transfert, il contient un motif GGQ qui est responsable de l'hydrolyse de peptidyl-ARN de transfert et est lié au niveau du centre peptidyl-transférase du ribosome pour permettre la libération du peptide nouvellement synthétisé (Frolova et al., 1999; Song et al., 2000), enfin, le domaine C-terminal facilite les interactions de eRF1 avec eRF3 (Merkulova et al., 1999; Cheng et al., 2009)

eRF3 est une GTPase dont la région C-terminale est importante pour la liaison avec les domaines M et C-terminal de eRF1 alors que la région N-terminale est peu conservée et non-essentielle pour sa fonction bien qu'il ait été montré qu'elle

interagissait avec les protéines Pab1 et Upf1 (Ter-Avanesyan et al., 1993; Hoshino et al., 1999; Ivanov et al., 2008).

Le complexe eRF1-eRF3-GTP se lie aux ribosomes contenant un codon STOP dans le site A. L'hydrolyse du GTP par eRF3 permet le positionnement du domaine N-terminal d'eRF1 près du codon STOP et le positionnement du domaine M près du centre peptidyl-transférase, permettant ainsi l'hydrolyse de la liaison peptidyl-ARN de transfert (Frolova et al., 1996; Alkalaeva et al., 2006). Le complexe eRF3-GDP est alors dissocié du ribosome alors que eRF1 est maintenu dans le site A (Pisarev et al., 2007).

Finally, the factor Rli1 (ABCE1 in mammals) is recruited to the complex 80S-eRF1, it will allow the dissociation of the 80S ribosome into two free ribosomal subunits 60S and 40S (Pisarev et al., 2010; Shoemaker and Green, 2011; Becker et al., 2012; Preis et al., 2014)(**Figure 5**). Once the subunits are separated, the mRNA and the deacetylated transfer RNA will be released from the 40S subunit thanks to the action of translation initiation factors eIF3, eIF1, eIF1A, eIF3j and eIF2D (Tma64, Tma20 and Tma22 in yeast)(Skabkin et al., 2010; Becker et al., 2012; Jackson et al., 2012).

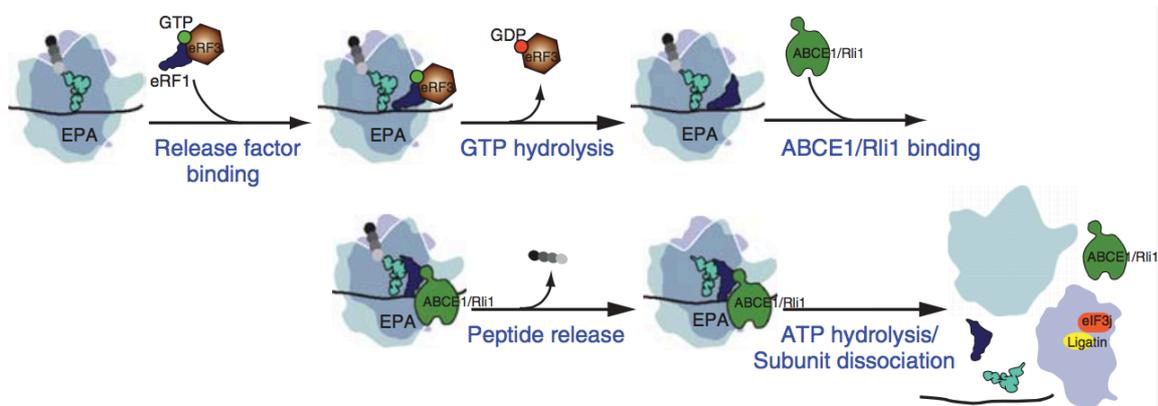


Figure 5. Schéma représentant la terminaison et le recyclage de la traduction.
(revue Dever and Green, 2012)

Rli1 est une protéine essentielle chez les eucaryotes, elle possède une fonction indispensable dans le recyclage des ribosomes (Pisarev et al., 2010; Barthelme et al., 2011; Shoemaker and Green, 2011) mais elle aurait également un rôle important dans l'assemblage des facteurs d'initiation de la traduction (Dong et al., 2004; Chen et al., 2006; Andersen and Leivers, 2007). L'initiation de la traduction et le recyclage des ribosomes seraient alors deux processus liés: un modèle proposé aujourd'hui suggérerait que les ARN messagers seraient potentiellement circularisés par

l'interaction entre PABP/Pab1 et eIF4G, permettant à la protéine Rli1, après la dissociation des deux sous-unités ribosomales de contribuer à la réinitiation de la traduction sur le même transcrit (Heuer et al., 2017; Rogers et al., 2017; Schuller and Green, 2017)(**Figure 6**). Rli1 serait donc un facteur crucial pour le recyclage des ribosomes et pour contrôler l'homéostasie des ribosomes dans les cellules.

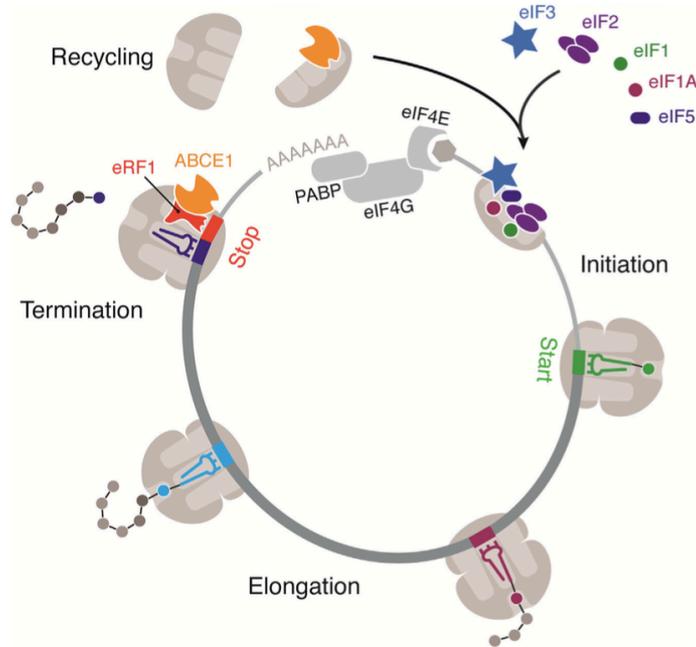


Figure 6. Circularisation de l'ARN messager et recyclage du ribosome.
(Schuller and Green, 2017)

II. 5. Réinitiation de la traduction

Nous avons vu précédemment que dans le cas d'une traduction canonique, les ribosomes étaient recyclés grâce à l'intervention des facteurs eRF1 et eRF3. Nous verrons également, dans un chapitre ultérieur, que la traduction d'un ARN messager aberrant enclenchera le recyclage des ribosomes par des paralogues de eRF1 et eRF3 : Dom34 et Hbs1. Il était donc difficile d'imaginer que les ribosomes puissent se trouver bloqués dans les régions 3'-UTR d'ARN messagers. Cependant, il a été montré récemment que les ribosomes 80S pouvaient s'accumuler au niveau de codons STOP et dans les régions 3'-UTR d'ARN messagers, lorsque le recyclage des ribosomes est affecté, par exemple lorsque *RLI1* est déplété. Ce phénomène serait même accentué lorsque la déplétion de *RLI1* est combinée avec la délétion du gène *DOM34* et il existerait également dans un contexte sauvage (Young et al., 2015)(**Figure 7**).

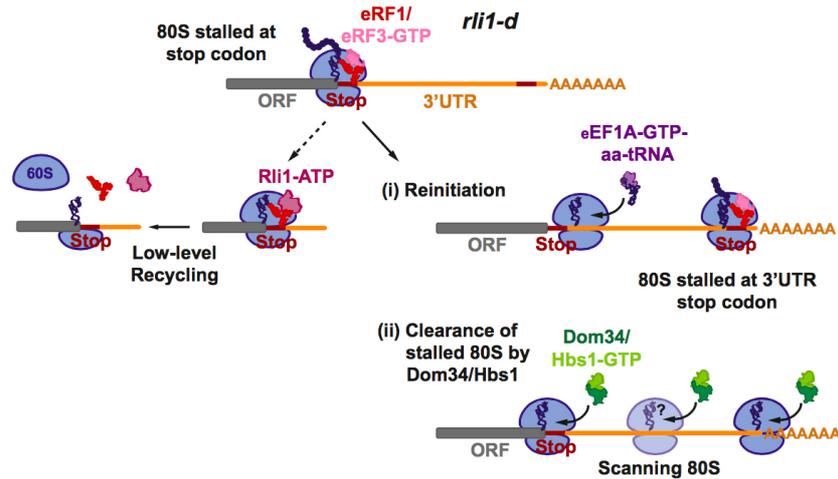


Figure 7. Schéma représentant la réinitiation des ribosomes en 3'-UTR.
(Young et al., 2015)

Les ribosomes-3'-UTR peuvent donc être de deux natures : (i) soit ils peuvent réinitier et redémarrer la traduction dans cette région habituellement non-traduite, même en l'absence de codon d'initiation AUG. Dans ce cas, la traduction pourra se terminer au prochain codon de terminaison rencontré, permettant ainsi une terminaison classique de la traduction, (ii) soit les ribosomes non-recyclés peuvent scanner la région 3'-UTR sans réinitier de traduction, dans ce cas, les ribosomes resteront bloqués sur le transcrite et des mécanismes de contrôle-qualité se mettront en place (Young et al., 2015).

III – Dégradation des ARN messagers classiques

Chez les eucaryotes, les ARN messagers passent par des étapes de maturation durant leur synthèse : ajout d'une coiffe m⁷G-triphosphate à leur extrémité 5', excision des introns par le processus d'épissage et ajout d'une queue poly(A) à leur extrémité 3'. Ces éléments ajoutés aux extrémités 5' et en 3' des ARN messagers ont un rôle important de protection contre la dégradation dans le noyau comme dans le cytoplasme. Cependant, les ARN messagers sont sujets à un « turnover » très rapide. En effet, il a été montré récemment que la demi-vie médiane des ARN messagers chez *Saccharomyces cerevisiae* est de deux minutes (Baudrimont et al., 2017). La stabilité des ARN messagers dépendrait donc d'éléments *cis* spécifiques contenus dans la séquence nucléotidique elle-même (LaGrandeur and Parker, 1999). En particulier, il a été montré que l'efficacité avec laquelle l'ORF est traduite, est directement corrélée avec la stabilité du transcrite

(Presnyak et al., 2015). Cet équilibre entre synthèse et dégradation a plusieurs rôles chez la levure, il permet de mettre en place un niveau de base de l'expression des ARN messagers. De plus, la rapidité de dégradation d'un ARN messager détermine directement la rapidité avec laquelle son niveau dans la cellule pourra être modulé en fonction des stimuli externes.

La dégradation classique des ARN messagers débute par une première étape de raccourcissement de la queue poly(A), appelée déadénylation (Muhlrad and Parker, 1992; Decker and Parker, 1993). Elle s'effectue par l'intermédiaire des complexes protéiques Pan2/Pan3 et Ccr4/Pop2/Not (Brown and Sachs, 1998; Tucker et al., 2001). Les ARN messagers sont ensuite dégradés selon deux voies différentes : une voie majeure faisant intervenir le complexe Dcp1/Dcp2, qui va éliminer la coiffe en 5' des ARN messagers, ce qui permet la dégradation à partir de cette extrémité 5' du transcrit par l'exonucléase Xrn1 (Hsu and Stevens, 1993; Muhlrad et al., 1994, 1995; Dunckley and Parker, 1999; van Dijk et al., 2002; Steiger et al., 2003). Une seconde voie, mineure, fait intervenir l'exosome cytoplasmique, assisté par le complexe SKI pour dégrader les ARN messagers à partir de l'extrémité 3' (revue Łabno et al., 2016)(**Figure 8**).

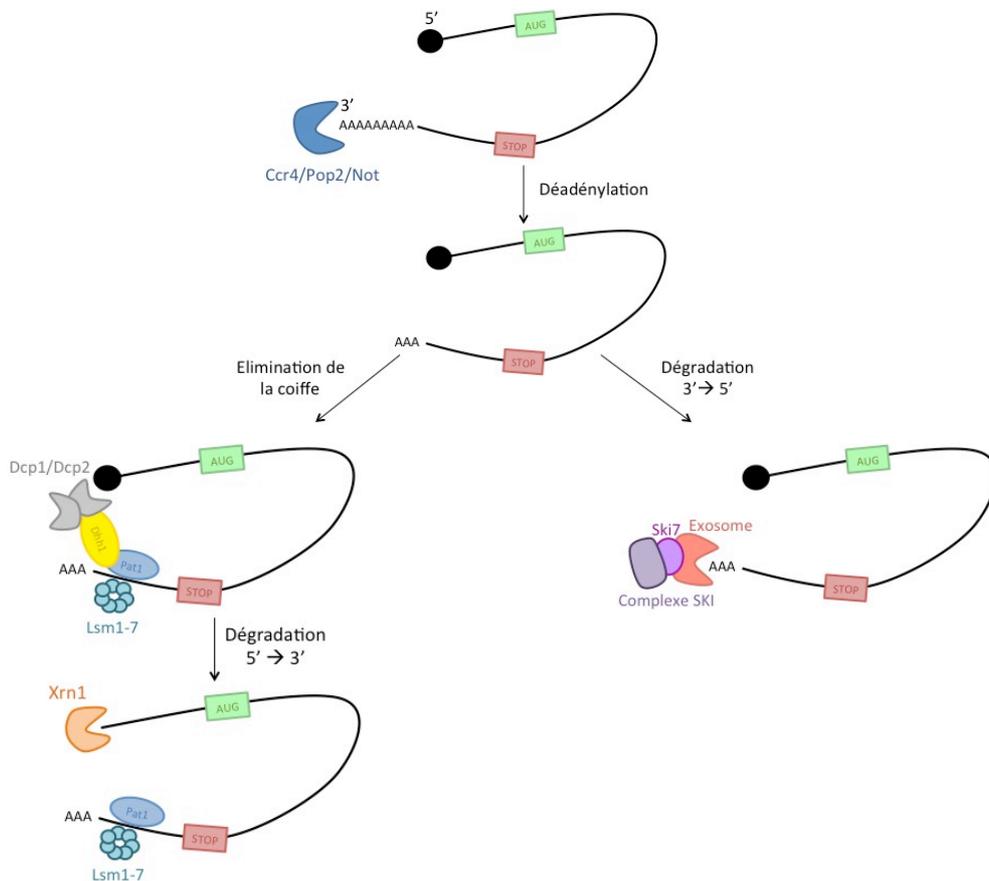


Figure 8. Schéma représentant la dégradation générale des ARN messagers

III. 1. Déadénylation

Il existe deux types de complexes responsables de la déadénylation de la queue poly(A) des ARN messagers.

Le complexe principal est le complexe Ccr4/Pop2/Not (Daugeron et al., 2001; Tucker et al., 2001). Il est organisé autour de la protéine plateforme Not1. Il est composé de Ccr4 et Pop2/Caf1, deux exonucléases 3'-5' et comporte également les protéines Caf40, Not2-5 et Caf130 (Denis and Chen, 2003). Ccr4 est la déadénylase principale du complexe. Son activité dépend de la présence de Mg²⁺ (Chen et al., 2002). Elle fait partie de la famille des EEP (exonuclease-endonuclease-phosphatase)(revue Wahle and Winkler, 2013) et interagit avec Pop2 *via* une région riche en leucine (Dupressoir et al., 2001). La déadénylase Pop2 fait partie de la famille des RNAses D ; elle aurait un rôle dans la déadénylation d'ARN messagers particuliers ou dans des conditions particulières. Not4 est une ubiquitine-ligase ; elle est associée avec son co-facteur Ubc4. Le rôle des protéines Not2, Not3, Not5, Caf40 et Caf130 demeure encore peu clair : elles pourraient être impliquées dans la déadénylation d'ARN messagers particuliers ou bien dans un rôle secondaire du complexe Ccr4/Pop2/Not durant l'initiation et l'élongation de la transcription (Qiu et al., 2004; Kruk et al., 2011).

Le complexe secondaire de déadénylation est composé des protéines Pan2 et Pan3 (Boeck et al., 1996). Pan2 constitue la sous-unité catalytique du complexe. L'activité de ce complexe est stimulée par sa liaison avec la protéine Pab1. En effet, grâce à son domaine PAM-2 (PABP interacting motif 2) situé dans sa région N-terminale, Pan3 se lie au domaine alpha-hélical en C-terminal de Pab1.

Il a été montré que la déadénylation par ces deux complexes se ferait de manière temporelle. En effet, le complexe Pan2/Pan3 dans un premier temps, commencerait la déadénylation de la queue poly(A) de 90 à 65 nucléotides environ selon la nature des ARN messagers. Dans un second temps, le complexe Ccr4/Pop2/Not poursuivrait la déadénylation jusqu'à obtenir une longueur de poly(A) d'environ 10-12 nucléotides. A ce stade, le complexe Pat1/Lsm1-7 se fixerait dans la région 3' des ARN messagers qui deviendraient alors de bons substrats pour l'étape d'élimination de la coiffe (Tharun and Parker, 2001; Chowdhury et al., 2007).

Le taux de déadénylation peut être contrôlé de trois manières. Premièrement, la liaison de la protéine Pab1 à la queue poly(A) stimule la déadénylation par le complexe

Pan2/Pan3 alors qu'elle inhiberait l'action du complexe Ccr4/Pop2/Not. Si l'initiation de la traduction est affectée, la liaison de Pab1 à la queue poly(A) peut être déstabilisée, ce qui aurait donc un impact sur la déadénylation. Deuxièmement, il existe des régulateurs de la déadénylation spécifiques à certains types d'ARN messagers. Ainsi, les protéines Puf1, Puf3, Puf4 et Puf5 (Olivas and Parker, 2000; Hook et al., 2007; Ulbricht and Olivas, 2008; Lee et al., 2010), Vts1 (Rendl et al., 2008), Cth1 et Cth2 (Pedro-Segura et al., 2008) permettent d'accélérer le processus de déadénylation grâce à un recrutement spécifique de déadénylases. Ces facteurs pourraient ainsi promouvoir la déadénylation de certaines classes d'ARN messagers. Enfin, la déadénylation peut être influencée par des stimuli environnementaux tels que l'hyperosmolarité, le choc thermique ou encore la carence en glucose (Hilgers et al., 2006)(**Tableau 1**).

Facteur protéique	Fonction
Ccr4/Pop2/Not	ARN déadénylase majeure Ccr4 : sous-unité catalytique principale, famille EEP Pop2/Caf1 : sous-unité catalytique secondaire, famille RNase D Not1 : protéine plateforme Not4 : Ubiquitine-ligase, cofacteur Ubc4 Not2, Not3, Not5, Caf40, Caf130 : protéines régulatrices
Complexe Pan2/Pan3	ARN déadénylase secondaire Pan2 : sous-unité catalytique qui dépend de Pab1, famille RNase D Pan3 : sous-unité régulatrice
Pab1	Protéine de liaison aux poly(A), Inhibe Ccr4, stimule Pan2
Puf1, Puf3, Puf4, Puf5, Vts1, Cth1, Cth2	Déadénylases spécifiques

Tableau 1. Protéines et complexes impliqués dans la déadénylation des ARN messagers.

III. 2. Dégradation 5' – 3'

Comme mentionné plus haut, la dégradation des ARN messagers à partir de l'extrémité 5' vers la 3' constitue la voie principale de dégradation. Elle s'effectue après l'étape de déadénylation et se déroule en deux étapes : l'élimination de la coiffe suivie de la dégradation par l'exoribonucléase Xrn1.

III. 2. A. Elimination de la coiffe

L'étape d'élimination de la coiffe à l'extrémité 5' des ARN messagers s'effectue par l'intermédiaire du complexe Dcp1/Dcp2. Cette étape est irréversible et va aussitôt conduire à la dégradation de l'ARN messager par l'exoribonucléase Xrn1. Dcp2 est la sous-unité catalytique du complexe (van Dijk et al., 2002; Steiger et al., 2003). Elle a besoin de nombreuses protéines régulatrices pour stimuler son activité : les protéines EDC (« *enhancer of decapping* ») ainsi que Dcp1, son co-facteur. Dcp2 est une hydrolase qui fait partie de la famille des pyrophosphatases Nudix [anciennement appelée « MutT family » (Bessman et al., 1996)]. Elle clive la coiffe pour libérer un ARN messager avec un 5' monophosphate et un m7GDP (Dunckley and Parker, 1999; van Dijk et al., 2002; Steiger et al., 2003). Dcp2 possède, dans sa région N-terminale, un domaine de régulation qui permet le recrutement de Dcp1 (She et al., 2006), le domaine médian correspond au domaine catalytique Nudix et, dans sa région C-terminale, un domaine est responsable de la liaison aux ARN (Piccirillo et al., 2003) et un autre domaine permet l'interaction de Dcp2 avec des protéines régulatrices du « *decapping* » telles que Edc3 ou Pat1 (Harigaya et al., 2010; He and Jacobson, 2015a). Dcp1 fait partie de la famille des protéines EVH (She et al., 2004), son interaction avec Dcp2 permet une activation de sa fonction de « *decapping* » (Deshmukh et al., 2008; She et al., 2008).

Des études structurales par cristallographie, SAXS et NMR ont montré qu'il existait une forme compacte et une forme étendue du complexe Dcp1-Dcp2, le passage d'une forme à l'autre dépendant du domaine de régulation de Dcp2 : le domaine de régulation positionné sur le domaine Nudix correspondant à la forme compacte (She et al., 2008; Valkov et al., 2016). De plus, un résidu tryptophane très conservé de Dcp2 a été défini comme un « *gardien* » de la structure du complexe, il régule la dynamique du complexe (Floor et al., 2012). Très récemment, pour la première fois, la structure cristallographique du complexe Dcp1-Dcp2 associé au produit du « *decapping* » m7GDP et à l'activateur Edc3 chez *Kluyveromyces lactis* a été résolue. Elle montre qu'Edc3, avec Dcp2, permet l'activation et la stabilisation du complexe Dcp1-Dcp2 sous sa forme compacte (Charenton et al., 2016).

Il a également été montré que cette étape d'élimination de la coiffe pouvait entrer en compétition avec l'initiation de la traduction. En effet, d'une part, il existe une compétition entre eIF4E et Dcp1 pour la liaison au niveau de la coiffe en 5' (Schwartz

and Parker, 2000) et d'autre part, la longueur de la queue poly(A) pourrait avoir une incidence sur le « decapping » : si la queue poly(A) est inférieure à 12 nucléotides, la protéine Pab1 ne peut s'y fixer, son interaction avec eIF4G est alors perdue et le « decapping » peut avoir lieu (Decker and Parker, 1993). Quand la queue de poly(A) est suffisamment longue, la protéine Pab1 peut s'y fixer (Sachs et al., 1987), favorisant la traduction et empêcherait la liaison du complexe Pat1/Lsm1-7 qui se lie préférentiellement aux ARN messagers déadénylés (Tharun and Parker, 2001; Tharun, 2009).

Seul, Dcp2 n'est pas actif. Il existe plusieurs protéines régulatrices EDC qui peuvent se fixer au complexe Dcp1/Dcp2 mais qui ont des mécanismes différents pour stimuler l'élimination de la coiffe : (i) Pat1 est un des éléments centraux du « decapping » ; il constitue une véritable plateforme pour le recrutement des protéines régulatrices Dhh1, Edc3 et les complexes Lsm1-7 et Dcp1/Dcp2 sur l'ARN messenger (Nissan et al., 2010; Chowdhury et al., 2014), (ii) Dhh1, Pat1 et Scd6 répriment directement la traduction en inhibant la fixation de la machinerie d'initiation de la traduction eIF4E/eIF4G sur les ARN messagers (Nissan et al., 2010), (iii) Pat1 et Edc3 aident au recrutement des différents acteurs du « decapping » (Badis et al., 2004; Decker et al., 2007; Nissan et al., 2010; Fourati et al., 2014), (iv) le complexe Lsm1-7, sous forme d'anneau, se lie au niveau de la queue poly(A) déadénylée et favorise l'interaction de Dcp2 avec l'ARN dont la coiffe doit être éliminée (Nissan et al., 2010).

Enfin, Xrn1 interagit avec les protéines régulatrices EDC, faisant un lien direct entre l'élimination de la coiffe et la dégradation des ARN de l'extrémité 5' vers le 3' par l'exoribonucléase Xrn1 (Nissan et al., 2010)(**Tableau 2**).

III. 2. B. Dégradation 5' – 3'

Après l'étape de « decapping », les ARN messagers sont dégradés par l'exoribonucléase Xrn1. C'est une protéine cytoplasmique très conservée chez les eucaryotes. Son activité exoribonucléase est Mg^{2+} -dépendante, elle permet de dégrader les ARN à partir d'une extrémité 5' libre vers l'extrémité 3' (Hsu and Stevens, 1993; Jones et al., 2012; Muhrad et al., 1994)

Bien que la première étape de dégradation des ARN soit une étape de déadénylation partielle qui intervient en 3' des ARN messagers, la voie de dégradation par Xrn1, qui débute par l'extrémité 5', reste la voie majeure, alors que celle qui fait

Intervenir la dégradation de 3' vers le 5' par l'exosome reste secondaire. Le fait que la voie 5'-3' soit privilégiée pourrait être dû au fait que la dégradation par Xrn1 n'affecte pas l'élongation des ribosomes en cours de traduction alors que la dégradation par l'exosome, progressant de 3' en 5', va rentrer en conflit avec la traduction lorsqu'elle va atteindre la région codante des ARN messagers, conduisant à la synthèse de protéines tronquées. Le fait qu'il ait été montré que ces deux voies de dégradation sont co-traductionnelles renforce cette hypothèse (Pelechano et al., 2015).

Xrn1 est également présent dans les structures cellulaires appelées « processing-bodies » [ou « P-bodies » (Sheth and Parker, 2003)]. Ce sont des centres de stockage cytoplasmiques où la dégradation des ARN messagers non-traduits aurait lieu. Les P-bodies contiennent également d'autres protéines impliquées dans la dégradation des ARN comme Dcp1, Dcp2, Pop2, Ccr4, Pan2 ou Pan3 (Kulkarni et al., 2010), montrant donc l'existence d'un système alternatif de répression de l'expression des gènes. Les ARN non-traduits sont ainsi transportés et mis à l'écart dans des P-bodies pour empêcher une traduction inutile (Dykxhoorn, 2005). Mais, il a été montré que ces ARN n'étaient pas systématiquement dégradés, il serait possible qu'ils soient de nouveau engagés dans des cycles de traduction (Bregues et al., 2005)(**Tableau 2**).

Facteur protéique	Fonction
Complexe Dcp1/Dcp2	Complexe responsable de l'élimination de la coiffe en 5' Dcp2 : sous-unité catalytique, famille Nudix Dcp1 : sous-unité régulatrice, famille EVH
Complexe Pan2/Pan3	ARN déadénylase secondaire Pan2 : sous-unité catalytique qui dépend de Pab1, famille RNase D Pan3 : sous-unité régulatrice
eIF4E/eIF4G	Facteurs d'initiation de la traduction Liaison au niveau de la coiffe en 5' Stimule la traduction, inhibe le « decapping »
Pat1	Protéine régulatrice du « decapping » Plateforme pour les EDC Inhibe la traduction et stimule Dcp2 Interagit avec le complexe Lsm1-7
Complexe Lsm1-7	Complexe régulateur du « decapping » Structure en tonneau Liaison au niveau de la queue poly(A) déadénylée Stimule Dcp2
Dhh1	Protéine régulatrice du « decapping » Famille ARN hélicase DExD/H box Inhibe la traduction

Edc3	Protéine de liaison aux ARN Participe au recrutement des EDC Se lie et stimule Dcp2
Scd6	Protéine de liaison aux ARN Inhibe la traduction en empêchant la liaison de eIF4G Interagit avec Dhh1, Dcp2 et Pat1
Xrn1	Exoribonucléase cytoplasmique 5'-3'

Tableau 2. Protéines et complexes impliqués dans l'élimination de la coiffe en 5' et la dégradation 5'-3' des ARN messagers.

III. 3. Dégradation 3' – 5'

La seconde voie de dégradation des ARN messagers ne nécessite pas l'étape d'élimination de la coiffe mais elle s'effectue également après la déadénylation. Elle fait intervenir l'exosome cytoplasmique au niveau de l'extrémité 3' des ARN messagers. L'exosome est un complexe très conservé au cours de l'évolution, il est composé de dix protéines principales, dont six membres de la famille des RNAses : Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46, Mtr3 (Liu et al., 2006), trois protéines interagissant avec les ARN : Rrp4, Rrp40 et Csl4 (Allmang et al., 1999). Ces neuf protéines, qui n'ont pas d'activité enzymatique, forment une structure en tonneau avec un tunnel central permettant aux ARN d'être guidés vers la sous-unité catalytique portée par Dis3/Rrp44. Cet assemblage est très conservé au cours de l'évolution et est appelé « exo-9-core » (Liu et al., 2006; Januszyk and Lima, 2010)(**Figure 9**). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la dixième protéine est l'unique sous-unité catalytique du complexe cytoplasmique : Dis3/Rrp44. Elle possède dans sa région N-terminale un domaine PIN (PilT N-terminus), possédant une activité endonucléolytique, puis deux domaines de liaison aux ARN CSD (cold-shock domain), un domaine RNB (RNase II ribonucléase) possédant une activité exonucléolytique et enfin un domaine S1 de liaison aux ARN (Lebreton et al., 2008; Schaeffer et al., 2009, 2011; Schneider et al., 2009; Chlebowski et al., 2013).

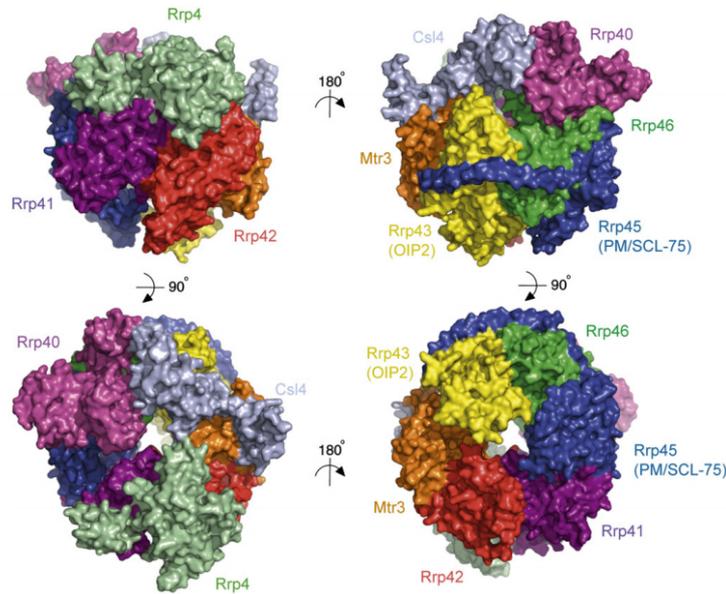


Figure 9. Structure cristallographique de l'exo-9-core de l'exosome.
(Liu et al., 2006)

La structure de l'exo-9-core associée à Dis3/Rrp44 a été révélée grâce à des travaux en cristallographie et de cryomicroscopie-électronique. L'exosome possède deux conformations possibles : une conformation qui permet aux ARN messagers non-structurés de passer à travers le tunnel de l'exo-9-core pour atteindre le site exoribonucléase de Dis3/Rrp44 (Wang et al., 2007; Bonneau et al., 2009; Malet et al., 2010; Makino et al., 2013, 2015; Liu et al., 2014) et une conformation pour des ARN messagers qui sont hautement structurés qui ne passent pas dans le tunnel de l'exo-9-core mais qui, grâce à une large rotation de Dis3/Rrp44, rentrent directement dans le domaine exoribonucléique de Dis3/Rrp44 (Bonneau et al., 2009; Makino et al., 2013, 2015, Liu et al., 2014, 2016)(**Figure 10**).

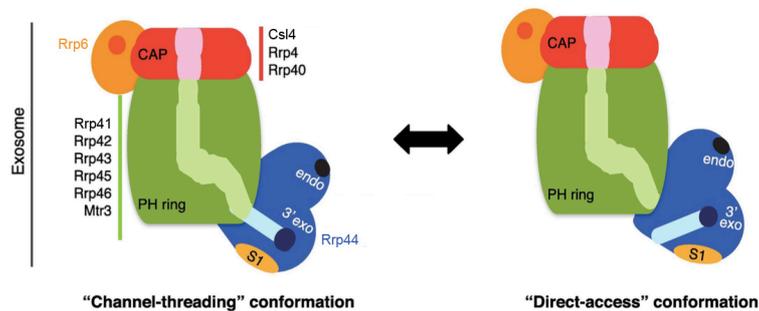


Figure 10. Représentation schématique des deux conformations de l'exosome
(adapté de Delan-Forino et al., 2017)

Il existe à la fois une forme cytoplasmique et une forme nucléaire de l'exosome. Dans le noyau, il est associé à différents facteurs : chez la levure, Rrp6, qui porte une

activité exonucléase 3'-5', Mpp6, Lrp1/Rrp47 et Mtr4, une hélicase trouvée en particulier en association avec le complexe TRAMP, qui possède une activité oligoadénylase portée par les facteurs Trf4 ou Trf5. La forme nucléaire de l'exosome joue un rôle dans la dégradation des ARN aberrants mais également dans la maturation des ARN ribosomiaux et des sno- et sn-ARN (Briggs et al., 1998; Mitchell et al., 2003; Milligan et al., 2008; livre Butler and Mitchell, 2011; revue Porrua and Libri, 2013). Dans le cytoplasme, l'exosome est assisté par le complexe SKI et la protéine Ski7 pour la dégradation des ARN canoniques et aberrants à partir de l'extrémité 3' (Anderson and Parker, 1998; van Hoof et al., 2000; Araki et al., 2001).

Le complexe SKI est très conservé et est impliqué dans de nombreuses voies cytoplasmiques comme le « turnover » des ARN messagers (Anderson and Parker, 1998; van Hoof et al., 2000; Araki et al., 2001), et les voies de surveillance des ARN messagers aberrants : le NonStop mRNA Decay (NSD), le NoGo mRNA Decay (NGD)(van Hoof et al., 2002) et, dans une moindre mesure, le Nonsense-Mediated Decay (NMD)(Mitchell and Tollervey, 2003). Le complexe SKI est composé de trois protéines différentes : Ski2, Ski3 et deux copies de Ski8 (Anderson and Parker, 1998; Brown et al., 2000; Synowsky and Heck, 2008). Des données récentes biochimiques et de cryo-microscopie électronique ont montré que le complexe SKI est associé, dans le cas de la dégradation des ARN messagers aberrants mais également canoniques, aux ribosomes *via* la sous-unité 40S ribosomale. Cette association se fait de préférence au niveau de particules ribosomales présentant une extrémité 3' d'ARN messager flottante (Schmidt et al., 2016)(**Figure 11**).

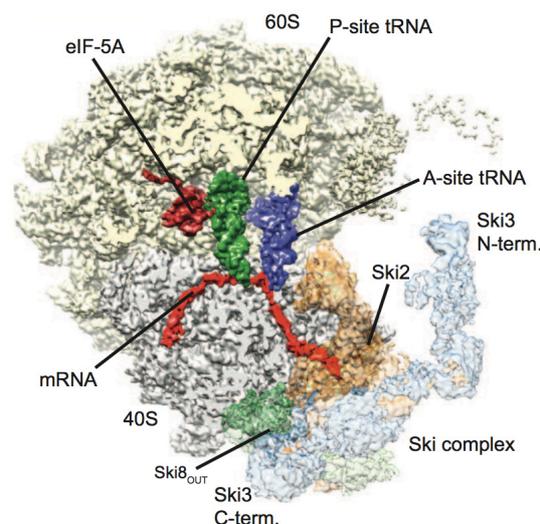


Figure 11. Structure obtenue par cryo-microscopie électronique du complexe SKI associé au ribosome 80S chez *Saccharomyces cerevisiae*.

(Schmidt et al., 2016)

De plus, la structure du complexe SKI est construite autour de Ski2. En effet les protéines Ski3 et Ski8 se placent en faisant en sorte que le domaine hélicase de Ski2 soit situé au centre, formant ainsi un tunnel et favorisant la liaison des ARN avec le complexe. Ce tunnel permet ensuite d'adresser correctement et sous forme simple brin les ARN messagers à dégrader à l'exosome cytoplasmique (Halbach et al., 2013)(**Figure 12**).

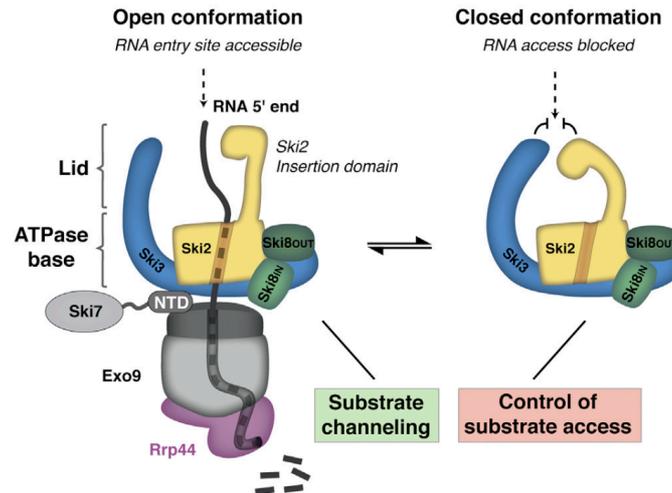


Figure 12. Adressage de l'ARN messager à dégrader à l'exosome cytoplasmique. Modèle proposé pour l'adressage des ARN messagers à la dégradation par l'exosome cytoplasmique (Exo9 en gris et Rrp44 en violet). Le domaine N-terminal de Ski3 et l'« arch domain » de Ski2 contrôlerait l'accès aux ARN messagers (adapté de Halbach et al., 2013).

Ski2, homologue de l'hélicase nucléaire Mtr4, est la sous-unité catalytique du complexe SKI. Son extrémité N-terminale est nécessaire pour son interaction avec les protéines Ski3 et Ski8 (Wang et al., 2005) alors que son extrémité C-terminale contient le cœur catalytique de l'hélicase comprenant un domaine d'insertion capable de se lier aux ARN et un domaine hélicase de la famille DExH (Halbach et al., 2012). Elle est nécessaire pour éliminer les protéines présentes sur les ARN dont les structures secondaires doivent être ouvertes.

Ski8 contient des répétitions WD40 (un motif de 40 acides aminés se terminant généralement par un tryptophane-aspartate) et Ski3 contient des répétitions TPR (tetratricopeptide repeat), un motif de 34 acides aminés organisé en hélices alpha répétées interagissant avec les répétitions WD40. Ski3 et Ski8 participent à la structure du complexe SKI et régulent les activités ATPase et hélicases de Ski2 (Halbach et al., 2013).

Ski7 ne fait pas directement partie du complexe SKI mais il est impliqué dans la dégradation des ARN messagers (van Hoof et al., 2000). En tant qu'homologue structural d'eRF3, il avait été dans un premier temps suggéré que la protéine Ski7 avait la capacité à se lier au site A vide du ribosome bloqué sur un ARN messenger NonStop (van Hoof et al., 2002) mais il a ensuite été démontré que Ski7 pouvait se lier à la fois au complexe SKI et à l'exosome ; Ski7 formerait donc un pont entre ces deux complexes (Araki et al., 2001)(Figures 12 et 13)(Tableau 3).

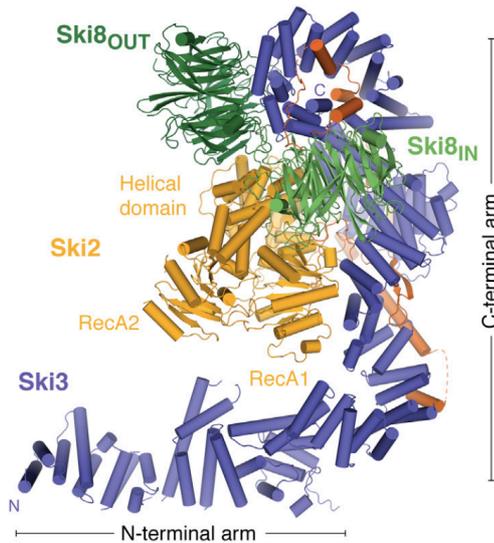


Figure 13. Structure du complexe SKI

Structure cristallographique du complexe SKI. Ski3 est représentée en bleu, les deux sous-unités de Ski8 (« in » et « out ») en vert et Ski2 en jaune. (Halbach et al., 2013)

Facteur protéique	Fonction
Exosome	Rrp41-43, Rrp45-46, Mtr3 : protéines de la famille des RNases Rrp4, Rrp40, Csl4 : trois protéines de liaison aux ARN Dis3/Rrp44 : Sous-unité catalytique avec des domaines exoribonucléase et endoribonucléase Structure en tonneau Impliqué dans la dégradation des ARN messagers canoniques et aberrants
Rrp6, Mtr4, Mpp6, Lrp1/Rrp47	Protéines associées à l'exosome nucléaire Impliqué dans le « processing » des ARN et la dégradation des ARN aberrants nucléaires
Complexe SKI	Ski2 : famille ATPase et ARN hélicase DExH Ski8 : contient des répétitions WD40 Ski3 : contient des répétitions TPR Ski8 et Ski3 : protéines régulatrices des activités ATPase et hélicase de Ski2, participent à la structure du complexe SKI Impliqué dans la dégradation des ARN messagers canoniques et aberrants NSD et NGD

Ski7	Protéine pont entre le complexe SKI et l'exosome Impliqué dans la dégradation des ARN messagers canoniques et aberrants NSD et NGD
------	---

Tableau 3. Protéines et complexes impliqués dans la dégradation 3'-5' des ARN.

IV – Dégradation des ARN messagers aberrants

Malgré un premier niveau de contrôle-qualité dans le noyau, des ARN messagers indésirables peuvent être exportés dans le cytoplasme. Que cela soient des produits aberrants ou des produits de la transcription dite « pervasive », ils peuvent être reconnus par la machinerie de traduction et donner des produits toxiques pour la vie de la cellule et monopoliser inutilement la machinerie de traduction. Des contrôle-qualités cytoplasmiques vont reconnaître et éliminer ces ARN. En ce qui concerne les ARN messagers, nous connaissons aujourd'hui trois types de transcrits aberrants : tout d'abord, les ARN messagers contenant un codon de terminaison de la traduction précoce appelés transcrits Non-Sens. Ils ont été observés la première fois par (Losson and Lacroute, 1979) et ont été appelés transcrits Non-Sens par (Leeds et al., 1991). Ensuite, les transcrits ne possédant pas de codon de terminaison en phase avec la traduction appelés transcrits Non-Stop ont été décrits par (Frischmeyer et al., 2002; van Hoof et al., 2002) puis enfin, les transcrits contenant un élément de séquence ou de structure secondaire entraînant le blocage de la traduction pendant l'étape d'élongation appelés transcrits no-go (Doma and Parker, 2006). Ces transcrits sont respectivement reconnus et dégradés par trois mécanismes de contrôle-qualité : le « Nonsense-Mediated mRNA Decay », le « Non-Stop mRNA Decay » et le « No-Go mRNA Decay » (revue Shoemaker and Green, 2012).

IV. 1. Nonsense-mediated decay (NMD)

Le NMD a été décrit pour la première fois chez *Saccharomyces cerevisiae* comme étant un système dégradant les ARN messagers avec un codon de terminaison de la traduction précoce (PTC)(Leeds et al., 1991). La présence de ce PTC peut être le résultat de mutations génomiques non-sens ou d'erreurs lors de la transcription (Losson and Lacroute, 1979; Brown, 1989; Wagner and Lykke-Andersen, 2002). D'autres transcrits NonSense contenant un PTC ont été décrits, comme les transcrits ayant une longue

séquence 3'-UTR (Muhlrad and Parker, 1999; Kebaara and Atkin, 2009; Deliz-Aguirre et al., 2011; Zaborske et al., 2013), les transcrits avec un site d'initiation de la traduction alternatif donnant une terminaison précoce (Welch and Jacobson, 1999), les transcrits mal-épissés possédant un intron contenant un codon STOP en phase (He et al., 1993; Sayani et al., 2008) ou encore les transcrits possédant une ORF en amont du site canonique d'initiation de la traduction (une uORF en amont du codon AUG)(Ruiz-Echevarría and Peltz, 2000). Chez la levure, il a été montré récemment qu'une fraction majeure de substrats du NMD résultait d'événements alternatifs d'initiation de la transcription des ARN messagers produisant des isoformes dont le codon d'initiation AUG n'est pas le codon d'initiation de la région codante du gène (Arribere and Gilbert, 2013; Malabat et al., 2015). Enfin, une autre source majeure de substrats du NMD est constituée des transcrits non-codants « pervasifs » cytoplasmiques (XUT et SUT)(Malabat et al., 2015; Wery et al., 2016).

Les substrats du NMD sont reconnus par des protéines conservées durant l'évolution, les protéines Upf1, Upf2 et Upf3 (Leeds et al., 1991, 1992; Peltz et al., 1993; Cui et al., 1995).

Upf1 appartient à la superfamille I des ARN hélicases, elle possède deux domaines majeurs : un domaine riche en cystéines et en histidines (domaine CH) situé dans la région N-terminale et un domaine hélicase situé dans la région C-terminale (Altamura et al., 1992; Chakrabarti et al., 2011). Ces domaines sont indispensables pour l'activation du NMD (Weng et al., 1996a, 1996b). Upf1 constitue la protéine-clef du NMD, Upf2 et Upf3 régulant la fonction de Upf1 (Chamieh et al., 2008).

La protéine Upf2 interagit avec le domaine CH de Upf1 et avec le motif de reconnaissance des ARN (RRM) de Upf3. Au sein du complexe, Upf2 permet de faire le pont entre Upf1 et Upf3 (He et al., 1997; Kadlec et al., 2004; Chamieh et al., 2008; Clerici et al., 2009) et permet l'activation de la fonction hélicase de Upf1 (Chamieh et al., 2008; Chakrabarti et al., 2011).

La fonction de Upf3 n'est pas très décrite dans la littérature, néanmoins on sait que c'est un régulateur important de Upf1 et donc du NMD (Chamieh et al., 2008). Elle possède également un domaine de liaison aux ARN de type RNP (Kadlec et al., 2004).

Chez les mammifères, Upf1, l'élément central du complexe, existe sous deux conformations en fonction de sa liaison ou non avec Upf2 : en absence de Upf2, Upf1 est sous forme fermée car son propre domaine CH et son domaine hélicase interagissent

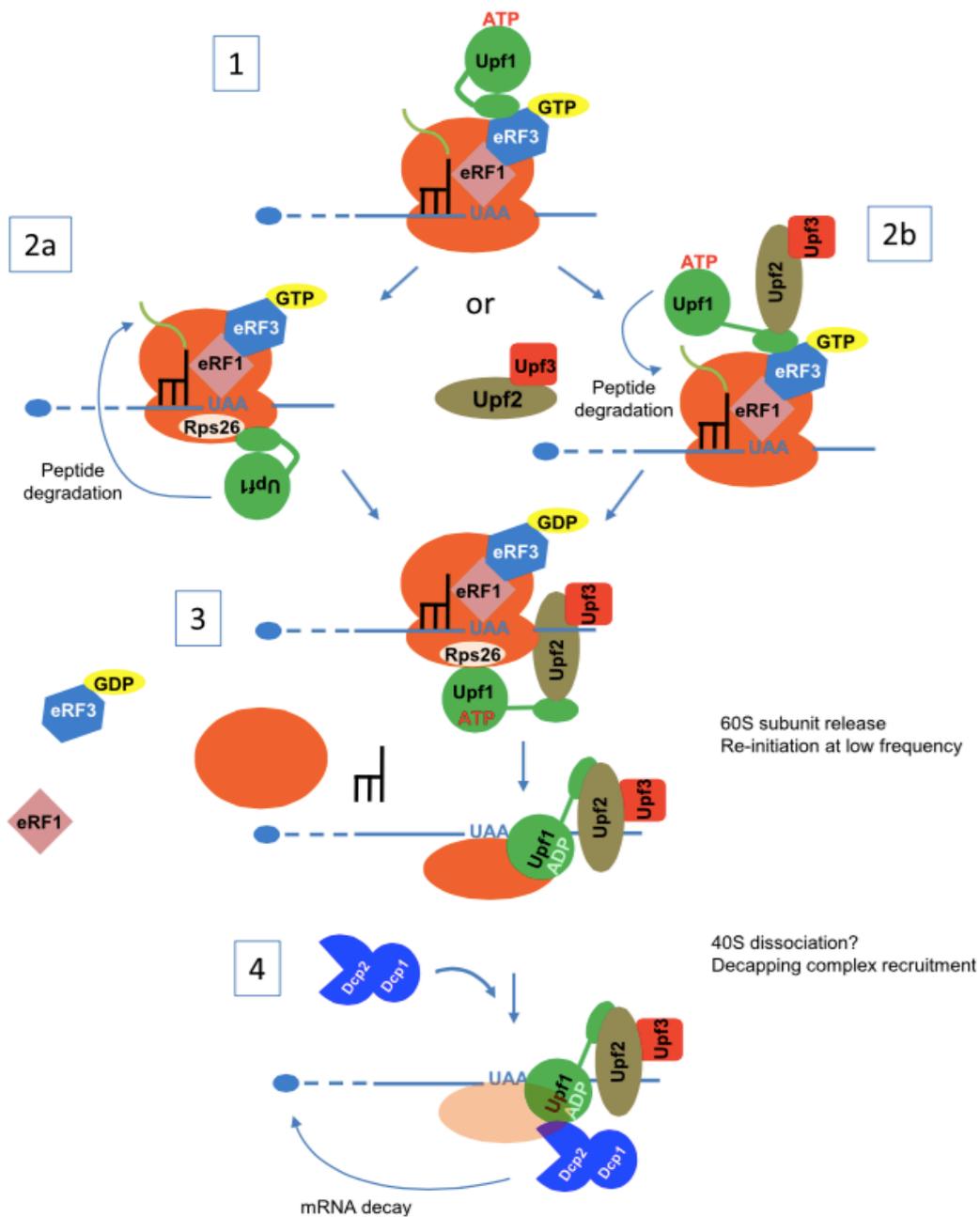
entre eux, les activités ATPase et hélicase de Upf1 vont diminuer en conséquence. Alors qu'en présence de Upf2, Upf1 est sous forme ouverte entraînant une augmentation de ses activités ATPase et hélicase (Chamieh et al., 2008; Chakrabarti et al., 2011).

Le NMD et la traduction sont deux processus liés, en effet, la reconnaissance du PTC par la machinerie de traduction est une condition requise pour l'activation du NMD (Zhang et al., 1997; Gaba et al., 2005). Les protéines Upf1-3 vont interagir avec les « release factors » eRF1 et eRF3 (respectivement Sup45 et Sup 35 chez la levure), c'est cette interaction qui va permettre le recrutement de la machinerie du NMD et l'activation de ses différents mécanismes (Czaplinski et al., 1998). Dans le modèle actuel, l'interaction de Upf1 avec eRF3 va permettre le recrutement de Upf1 sous une forme inactive dans le complexe de terminaison de la traduction, puis Upf1 sera activé grâce au recrutement de Upf2 et Upf3 (Chamieh et al., 2008).

Dans un premier temps, des études avaient montré que l'initiation du processus de NMD était due à la longueur du 3'-UTR des transcrits (Kebaara and Atkin, 2009). Les transcrits avec un long 3'-UTR étant en général plus sensibles au NMD que les autres, il y aurait une compétition pour la reconnaissance du PTC et la terminaison de la traduction entre Upf1 et la protéine Pab1 qui se lie à la queue poly(A) (Singh et al., 2008). Cela donna lieu au modèle du « faux 3'-UTR » (Amrani et al., 2004). Cependant, il a été montré récemment que l'activation du NMD par une longue séquence 3'-UTR n'est effective que pour des transcrits dont l'ORF est courte et non pour de longues ORF (Decourty et al., 2014).

Par ailleurs, il a été montré que la terminaison de la traduction dans le cas d'un PTC était moins efficace que dans un cas canonique, permettant ainsi à Upf1 de reconnaître ce PTC (Amrani et al., 2004). Cette différence d'efficacité pourrait être expliquée par un recrutement plus lent des facteurs de terminaison et donc par une composition de facteurs ou une structure du mRNP pouvant être reconnue par Upf1. Les ARN messagers possédant un PTC vont subir une répression de leur traduction (Muhlrad and Parker, 1999). Les activités ATPase et hélicase de Upf1 vont ensuite permettre de stimuler la dissociation et le recyclage des ribosomes et facteurs de terminaison associés à ces ARN (Franks et al., 2010; Serdar et al., 2016). Enfin, les transcrits aberrants seront principalement dégradés *via* les mécanismes de « decapping » impliquant les protéines Dcp1 et Dcp2 puis la dégradation de l'extrémité 5' vers 3' par l'exonucléase Xrn1 (Muhlrad and Parker, 1994; He and Jacobson, 2001,

2015b). Si le « decapping » ou la dégradation du 5' vers le 3' sont bloqués ou inefficaces, les substrats NMD s'accumulent dans les P-bodies (Sheth and Parker, 2006). Un mécanisme alternatif, indépendant du « decapping » a également été décrit : les transcrits peuvent être déadénylés puis dégradés par l'exosome cytoplasmique de l'extrémité 3' vers le 5' lorsque la voie 5' est affectée (Mitchell and Tollervey, 2003; Takahashi et al., 2003 ; voir aussi, dans la section résultats, mes observations sur les substrats du complexe SKI)(Figure 14).



IV. 2. Non-stop decay (NSD) et No-go decay (NGD)

Deux autres types d'ARN messagers aberrants ont été décrits dans le cytoplasme. Observés pour la première fois chez la levure, les ARN messagers ne contenant pas de codon STOP en phase avec le codon d'initiation de la traduction sont appelés ARN messagers Non-Stop (Frischmeyer et al., 2002; van Hoof et al., 2002). Il en existe deux types : ceux possédant une queue poly(A) et ceux n'en possédant pas. La plupart des ARN messagers aberrants non-stop sont le résultat d'une terminaison précoce du transcrit due à des sites cryptiques de polyadénylation, c'est-à-dire que celle-ci s'effectue dans la région codante, avant le codon de terminaison de la traduction (Graber et al., 1999; Frischmeyer et al., 2002; Oszolak et al., 2010). Ils peuvent aussi être dus à des mutations génomiques ou à des erreurs lors de la transcription au niveau du codon de terminaison de la traduction, ou également à des événements de « readthrough » (Baudin-Baillieu et al., 2014). Les ARN messagers sans queue poly(A) peuvent résulter d'une coupure endonucléolytique dans la région codante donnant lieu à des intermédiaires de dégradation (Doma and Parker, 2006; Tsuboi et al., 2012; Matsuda et al., 2014)(**Figure 15**).

Les ARN messagers No-Go ont d'abord été étudiés chez la levure, ils possèdent une structure secondaire ou une séquence nucléotidique capable de bloquer les ribosomes pendant l'étape d'élongation de la traduction (Doma and Parker, 2006)(**Figure 15**). D'autres éléments tels que des codons rares ou par exemple la dépurination de l'ARN messager par une enzyme virale peuvent déclencher la voie NGD (Gandhi et al., 2008). Le NGD possède donc un rôle important dans l'élimination de ces ARN messagers aberrants, des peptides naissants tronqués en résultant. Mais un autre rôle important du NGD pourrait aussi être de protéger la cellule d'ARN messagers ayant été rendus aberrants car exposés à des dommages chimiques ou à des radiations (Doma and Parker, 2006; Harigaya and Parker, 2010).

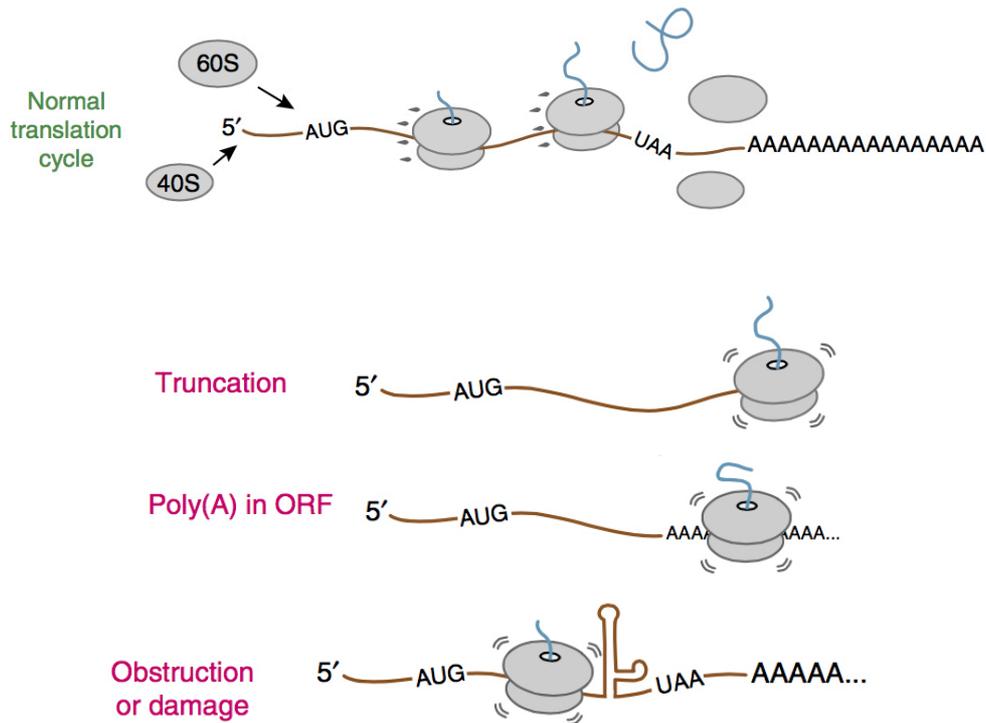


Figure 15. Représentation schématique des types de transcrits NSD et NGD.
(Adapté de Brandman and Hegde, 2016)

Ces différents types d'ARN messagers aberrants peuvent entraîner la synthèse de protéines non-fonctionnelles car tronquées ou allongées par une traduction de la région 3'-UTR. Il est donc important d'éliminer ces protéines aberrantes car elles sont potentiellement toxiques pour la cellule. De plus, la traduction étant un des processus les plus coûteux en énergie dans la cellule, les ARN messagers aberrants doivent être rapidement éliminés et les ribosomes bloqués doivent être pris en charge pour être recyclés. Ce sont les mécanismes de contrôle-qualité « Non-Stop mRNA Decay » et « No-Go mRNA Decay » qui prennent en charge ces événements aberrants. Bien que les substrats de ces voies soient différents, la plupart des facteurs impliqués dans ces voies de dégradation sont identiques.

Dans le cas où les ARN messagers Non-Stop sont polyadénylés, les ribosomes en cours de traduction vont traduire le transcrit jusqu'à atteindre la queue poly(A). La traduction de cette queue poly(A) va générer une queue poly-lys à l'extrémité C-terminale du peptide naissant. Il a été montré que la traduction de la queue poly(A) entraînait un blocage du ribosome dû à l'interaction électrostatique entre les résidus lysines chargés positivement et le tunnel de sortie du ribosome chargé négativement (Lu and Deutsch, 2008; Ito and Chiba, 2013; Wilson et al., 2016). Les ARN messagers No-Go

peuvent bloquer de la même façon l'élongation de la traduction au sein de la région codante lorsque le ribosome rencontre des séquences riches en codons codant pour des acides aminés chargés (Doma and Parker, 2006). Pour mieux comprendre cet arrêt de la traduction, des études avec des gènes rapporteurs contenant des répétitions de nucléotides ont montré que l'incorporation d'un minimum de douze codons lysine, arginine ou tryptophane pouvait déclencher le blocage du ribosome (Ito-Harashima et al., 2007; Dimitrova et al., 2009).

En plus de ces éléments en *cis* qui causent l'inhibition de la traduction, il existe des facteurs agissant en *trans* qui sont indispensables pour reconnaître les ribosomes bloqués et pour déclencher le processus de contrôle-qualité des peptides (**voir chapitre V**) : la protéine associée à la particule 40S Asc1 mais également les protéines du complexe RQT (« RQC-trigger ») décrit récemment (Matsuo et al., 2017; Sitron et al., 2017).

Les premières étapes de la reconnaissance du ribosome bloqué ne sont pas encore bien connues. Néanmoins, nous savons que le complexe composé des protéines Hbs1 et Dom34, homologues structuraux respectifs de eRF3 et eRF1 (Doma and Parker, 2006; Atkinson et al., 2008; Graille et al., 2008), reconnaît le site A vide du ribosome bloqué. Dom34 possède une structure similaire à celle d'un ARN de transfert, ce qui lui permet de se lier au site A vide quelque soit le codon en cours de traduction (Shoemaker et al., 2010; Becker et al., 2011; Hilal et al., 2016). Hbs1 est une GTPase traductionnelle qui est recrutée par Dom34 sur le ribosome bloqué. L'hydrolyse du GTP par Hbs1 permet un changement conformationnel de Dom34, Hbs1 est alors recyclé alors que Rli1 sera recruté pour dissocier le ribosome 80S en deux sous-unités individuelles, permettant ainsi le recyclage du ribosome (Chen et al., 2010; Shoemaker et al., 2010). Finalement, la présence d'un codon STOP dans le site A du ribosome ou non, va entraîner le recrutement des facteurs canoniques eRF1 et eRF3 ou des facteurs impliqués dans le NSD et le NGD Dom34 et Hbs1 : Dom34 ne possédant pas le motif GGQ important pour libérer le peptide naissant et le domaine NIKS impliqué dans la reconnaissance du codon STOP, éléments qui sont présents chez eRF1 (Frolova et al., 1999; Chavatte et al., 2002).

A proximité du ribosome bloqué, l'intervention d'une endonucléase non caractérisée pour le moment permettrait une coupure endonucléolytique de l'ARN

messenger aberrant pour donner lieu à un fragment 5' ne possédant pas de queue poly(A) (devenant alors un substrat NSD potentiel) et à un fragment 3' (Doma and Parker, 2006; Atkinson et al., 2008; Harigaya et al., 2010; Shoemaker and Green, 2012; Tsuboi et al., 2012). Ce mécanisme serait un moyen rapide pour la cellule de dégrader le transcrit aberrant, court-circuitant ainsi les étapes de « decapping » en 5' et de déadénylation en 3'. Aujourd'hui, des études sont encore en cours pour déterminer si le complexe Dom34-Hbs1 aurait un rôle important dans cette coupure endonucléolytique (Doma and Parker, 2006; Passos et al., 2009; Kuroha et al., 2010; Chen et al., 2010; Tsuboi et al., 2012). En revanche, il a été montré que Asc1, l'E3 ubiquitine ligase Hel2 et Slh1 pourraient avoir un rôle dans cette coupure endonucléolytique du transcrit aberrant (Sitron et al., 2017).

Parallèlement au recrutement de Dom34-Hbs1, le complexe SKI va reconnaître les ribosomes bloqués et s'associer au niveau de la petite sous-unité 40S du ribosome, proche du tunnel d'entrée des ARN messagers. De plus, il a été montré que le complexe SKI, se lierait de préférence à des ribosomes possédant une extrémité 3' d'ARN messagers flottante (Schmidt et al., 2016). L'exosome cytoplasmique sera ensuite recruté au niveau de cette extrémité 3' des ARN messagers par l'intermédiaire de la protéine Ski7, qui constitue un pont entre le complexe SKI et l'exosome cytoplasmique (Benard et al., 1999; Araki et al., 2001; Frischmeyer et al., 2002; van Hoof et al., 2002; Doma and Parker, 2006). La conformation du complexe SKI formant un tunnel en son sein favorise la liaison avec des ARN messagers et pourrait permettre à l'hélicase Ski2 d'ouvrir les structures secondaires des ARN pour ensuite adresser le substrat sous forme simple brin à l'exosome cytoplasmique pour sa dégradation (Halbach et al., 2012). Après reconnaissance du ribosome bloqué, intervention des protéines Dom34-Hbs1, du complexe SKI, coupure endonucléolytique, dissociation des sous-unités ribosomales, et recrutement de l'exosome, les transcrits aberrants sont enfin dégradés, d'une part par l'exoribonucléase Xrn1 à partir des extrémités 5' et d'autre part par l'exosome cytoplasmique à partir des extrémités 3' (Doma and Parker, 2006).

V – Dégradation des peptides naissants aberrants

La traduction de protéines aberrantes issues des différents ARN messagers décrits précédemment peut être délétère pour la cellule : d'une part, parce que les ribosomes traduisant des peptides aberrants doivent être rapidement recyclés pour

effectuer des cycles de traduction normaux ; et d'autre part, parce que les protéines raccourcies ou allongées en résultant peuvent provoquer des pertes ou gains de fonction potentiellement toxiques pour la cellule. Elles peuvent également être mal-structurées et former des agrégats dans la cellule. Il est donc important de détecter ces protéines déficientes et de les dégrader rapidement.

Comme décrit dans le chapitre précédent, la traduction est d'abord inhibée par les éléments en *cis*, contenus dans les ARN messagers eux-mêmes et par des facteurs protéiques en *trans* qui ont été décrits récemment. Des travaux très récents ont mis en évidence que l'E3 ubiquitine-ligase Hel2 avec Ubc4 seraient responsables de l'ubiquitination de la sous-unité 40S ribosomale. De plus, un nouveau complexe appelé RQT (pour « RQC-trigger ») a été défini comme étant composé des protéines Hel2/Rqt1, Slh1/Rqt2, Cue3/Rqt3 et yKR023W/Rqt4. Cette étape d'ubiquitination et ce complexe RQT sont indispensables pour la reconnaissance des ribosomes bloqués sur les ARN messagers aberrants et pour déclencher le processus de contrôle-qualité par le complexe RQC (Matsuo et al., 2017; Sitron et al., 2017).

La dissociation des ribosomes bloqués nécessite ensuite la présence des facteurs Dom34, Hbs1 et Rli1. Ils permettent de séparer les deux sous-unités ribosomales (Shoemaker et al., 2010; Shoemaker and Green, 2011) mais ne permettent pas l'extraction du peptide naissant aberrant.

Le complexe RQC interviendra alors sur la particule 60S ribosomale bloquée sur son peptide aberrant. Il est composé des protéines Ltn1, Rqc1, Rqc2 et est lié à l'ATPase Cdc48 et ses co-facteurs Ufd1 et Npl4 (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013).

Le premier composant du complexe RQC à avoir été identifié et caractérisé est Ltn1 (connu auparavant sous le nom de Rkr1 et dont l'homologue chez les mammifères est la Listerin), il s'agit d'une E3 ubiquitine-ligase (Braun et al., 2007; Wilson et al., 2007; Chu et al., 2009) qui se lie à la sous-unité 60S bloquée et recrute une enzyme « E2 ubiquitin-conjugating » grâce à son domaine RING situé dans la région C-terminale. Elle est responsable de la polyubiquitination des peptides naissants aberrants (Bengtson and Joazeiro, 2010; Shao and Hegde, 2014). D'autres E3 ubiquitine-ligases sont également impliquées dans le contrôle-qualité des protéines aberrantes comme la sous-unité du complexe de déadénylation Not4 qui partage des substrats communs avec Ltn1 (Dimitrova et al., 2009; Matsuda et al., 2014; Preissler et al., 2015).

Ce sont les travaux dans les groupes de Jonathan Weissman et Micheline Fromont-Racine qui ont mis en évidence l'existence du complexe RQC, l'un en effectuant un crible pour trouver des mutants chez la levure qui déclenche la réponse Hsf1 dans des conditions de stress (Brandman et al., 2012) et l'autre grâce à un crible effectué chez la levure permettant la recherche de mutants synthétiques létaux avec des mutants du complexe SKI impliqué dans la dégradation des ARN messagers aberrants (Defenouillère et al., 2013). Dans ces différents travaux, des mutants de délétion *ltn1Δ*, *rqc1Δ* et *rqc2Δ* avaient été mis en évidence et des purifications biochimiques utilisant ces facteurs en tant qu'appâts avaient révélé des liens physiques entre ces derniers, la particule 60S, Cdc48 et ses co-facteurs Ufd1 et Npl4.

Rqc2 possède une structure en « cerise-double » avec les extrémités N et C-terminales associées à la particule 60S, proche de l'interface avec la particule 40S, ces domaines étant reliés par un domaine « coil-coiled » associé au domaine N-terminal de Ltn1 (Lyumkis et al., 2014; Shao et al., 2015; Shen et al., 2015). Rqc2 est un facteur important pour l'association de Ltn1 avec la particule 60S bloquée, le domaine RING en C-terminal de Ltn1 étant situé à proximité du tunnel de sortie des peptides (Shao and Hegde, 2014; Doamekpor et al., 2016). Ainsi, Rqc2 est également important pour la polyubiquitination des peptides aberrants par Ltn1 (Defenouillère et al., 2013; Shao et al., 2015). Récemment, il a été montré que, en parallèle de la polyubiquitination du peptide aberrant par Ltn1, la protéine Rqc2 était capable de se lier à la particule 60S bloquée pour recruter des ARN de transfert Alanine (AGC) et Thréonine (AGT) permettant ainsi de réinitier la traduction en l'absence de particule 40S et de matrice ARN et permettant donc l'allongement du peptide aberrant avec des acides aminés Alanine et Thréonine en C-terminal. Ces ajouts sont appelés CAT-tails pour « C-terminal Alanine-Threonine tails » (Shen et al., 2015). Il avait été proposé que ces CAT-tails pourraient agir comme un degon. Cependant, il semblerait maintenant que cette traduction sans matrice serve principalement à faciliter l'extraction des peptides aberrants du ribosome bloqué par Cdc48. En effet, il vient d'être montré que l'ajout de ces CAT-tails est important pour pousser les lysines hors du tunnel de sortie et les rendre accessibles pour leur ubiquitination par Ltn1 (Kostova et al., 2017). Il a également été montré que bien que ces CAT-tails ne soient pas indispensables pour le contrôle-qualité par le complexe RQC, ils sont en revanche essentiels pour déclencher la

réponse Hsf1 (Brandman et al., 2012; Shen et al., 2015; Choe et al., 2016; Defenouillère et al., 2016; Yang et al., 2016).

Rqc1 est la protéine la moins bien caractérisée du complexe RQC. Il n'a pas été possible d'obtenir une structure de Rqc1 (Lyumkis et al., 2014; Shen et al., 2015), probablement parce qu'elle est capable d'adopter de multiples conformations quand elle est liée à la particule 60S. Nous savons néanmoins qu'après la polyubiquitination du peptide aberrant par Ltn1, Rqc1 est essentielle pour le recrutement de l'hexamère Cdc48 à la particule 60S bloquée (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013), elle pourrait donc être un adaptateur structural de Cdc48 pour sa liaison avec la particule 60S bloquée et l'assisterait ainsi dans l'extraction et l'escorte efficaces du peptide aberrant vers le protéasome pour sa dégradation (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013; Verma et al., 2013).

Il a été observé récemment que les cellules dans lesquelles *RQC1* était absent accumulaient des formes de très haut poids moléculaire détectables en Western Blot au niveau du « stacking » des gels de polyacrylamide. Cela correspondrait à des formes agrégées de peptides aberrants que l'on peut également observer en absence de Ltn1 (Choe et al., 2016; Defenouillère et al., 2016; Yonashiro et al., 2016). Lorsque la déplétion de Cdc48 est associée à la délétion de facteurs indispensables pour sa liaison à la particule 60S, Rqc1 ou Ltn1, on observe une accumulation plus importante de ces agrégats, ce qui signifie que ces agrégats seraient dus à un défaut au niveau de la liaison de Cdc48 à la particule 60S bloquée. De plus, ces agrégats sont strictement liés à l'ajout de CAT-tails. En effet, la délétion de *RQC1* combinée à la délétion de *RQC2*, n'accumule plus d'agrégats protéiques. Ces agrégats pourraient donc constituer un maillon vers le déclenchement de la réponse Hsf1 (Defenouillère et al., 2016). De manière à mieux caractériser ces agrégats protéiques, ces derniers ont été analysés par spectrométrie de masse. Cette étude a permis de révéler la présence de facteurs importants pour l'homéostasie des protéines comme les co-chaperonnes Sis1, Sgt2, Ssa1, Ssa2 ou encore Hsp42, Hsp82 ou l'ubiquitine (Choe et al., 2016; Defenouillère et al., 2016). Ces protéines sont également des constituants de l'agrésome (Wang et al., 2009), ce qui suggère que si les peptides aberrants ne sont pas pris en charge correctement par le complexe RQC, il existe d'autres mécanismes demandant l'intervention de protéines chaperonnes et autres facteurs de recrutement du protéasome qui permettent d'agir en amont pour les éliminer (Johnston et al., 1998).

L'existence de cet agrésome avait d'abord été démontrée en utilisant un gène rapporteur dérivé de l'exon 1 de la protéine Huntingtin (Htt) qui contient des expansions polyglutamines formant des corps d'inclusion cytoplasmiques responsables de la maladie de Huntington (Wang et al., 2009). Ces agrégats cytoplasmiques sont transportés par Cdc48 vers l'agrésome, permettant ainsi de les compartimenter pour limiter leur toxicité dans la cellule (Saarikangas and Barral, 2016). Il a également été montré que Ltn1 était impliquée dans la formation, la polyubiquitination, et l'élimination des corps d'inclusion formés lors de la maladie de Huntington (Yang et al., 2016).

En plus du rôle dans le cytoplasme, il a été montré que le complexe RQC pouvait cibler des protéines aberrantes associées à la membrane du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie pour les extraire des ribosomes bloqués grâce à Dom34 et Hbs1 et ainsi les envoyer à la dégradation par le protéasome (Izawa et al., 2012; Crowder et al., 2015; von der Malsburg et al., 2015).

L'hexamère Cdc48 forme un complexe avec ses co-facteurs Ufd1 et Npl4 grâce à son domaine N-terminal (Bebeacua et al., 2012). Son rôle avait d'abord été déterminé par des études sur la dégradation des protéines associées à la membrane du réticulum endoplasmique (ERAD) où le complexe Cdc48-Ufd1-Npl4 reconnaît, grâce au N-terminal de Ufd1, les substrats ubiquitylés (Ye et al., 2003). Après la reconnaissance de ces substrats, Cdc48 hydrolyse l'ATP pour produire l'énergie nécessaire pour extraire la protéine défectueuse bloquée dans la membrane du réticulum endoplasmique (Rape et al., 2001), elle escorte ensuite cette protéine vers le protéasome pour sa dégradation (Richly et al., 2005). Le complexe Cdc48-Ufd1-Npl4 agirait, avec le complexe RQC, de façon similaire avec les peptides aberrants bloqués durant la traduction (Defenouillère et al., 2013; Verma et al., 2013).

Le complexe RQC a été observé, très récemment, associé aux peptides aberrants dans les fractions légères de gradient de polysomes, en plus des fractions 60S. Il pourrait donc exister un complexe RQC indépendant du ribosome pendant l'escorte des peptides aberrants au protéasome après extraction du ribosome. Dans cette même étude, lors d'une purification de Rqc1, un nouveau facteur, Tom1, a été observé dans le complexe RQC « léger ». Tom1 aurait un rôle important dans le contrôle-qualité et l'homéostasie des protéines en interagissant avec le complexe RQC léger et les peptides aberrants et

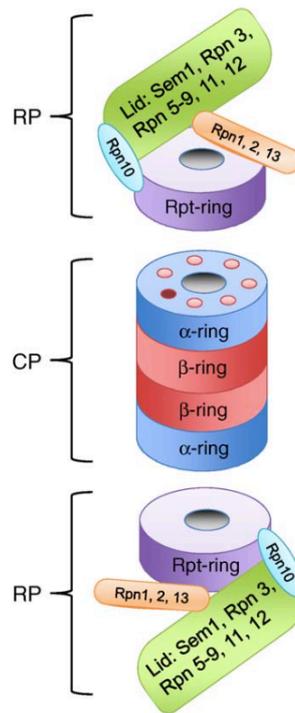


Figure 17. Structure du protéasome.
(Bedford et al., 2010)

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance du complexe RQC pour maintenir l'homéostasie des protéines grâce à une protéolyse efficace des peptides aberrants en cours de traduction par le protéasome.

VI – Formation d'agrégats protéiques et toxicité

Pour le bon fonctionnement de la cellule, les protéines nouvellement synthétisées doivent adopter une structure tri-dimensionnelle bien définie appelée également conformation native. Elles acquièrent cette conformation au cours de leur traduction passant ainsi par différents intermédiaires structuraux non-fonctionnels avant d'obtenir leur forme native. Les protéines défectueuses ou aberrantes traduites sont plus susceptibles de s'agréger, formant potentiellement des agrégats protéiques toxiques qui doivent être pris en charge et dégradés rapidement (revues Dobson, 2003; Jahn and Radford, 2005).

Pour empêcher l'accumulation des protéines aberrantes, la cellule a mis en place un système de contrôle-qualité des protéines composé de protéines chaperonnes et co-chaperonnes capables de détecter et réassembler les protéines et des compartiments

cellulaires vers lesquels les protéines défectueuses peuvent être transportées, stockées et agrégées permettant une dégradation ciblée efficace et pour limiter leur expansion (Goldberg, 2003; Hartl and Hayer-Hartl, 2009).

Le contrôle-qualité peut s'adapter en fonction du degré de dommages subit par les protéines en ajustant le niveau d'expression des chaperonnes et protéases induit par le stress. Les différentes causes de l'agrégation des protéines peuvent être classées en au moins quatre types :

- les protéines peuvent contenir des mutations affectant leur conformation,
- les protéines subissent des défauts pendant leur synthèse (une erreur de traduction par exemple) entraînant la mauvaise incorporation d'un résidu et donc un mauvais assemblage des complexes protéiques,
- les protéines peuvent subir des stress environnementaux tel qu'un choc thermique ou un stress oxydatif,
- les protéines peuvent s'agréger pendant le vieillissement des cellules.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les protéines défectueuses ayant subi un choc thermique s'agrègent sous forme de foci de tailles très variables dispersés dans le noyau ou le cytoplasme. La protéine chaperonne Hsp104 et ses co-facteurs Ssa1 et Ydj1 vont reconnaître les agrégats protéiques et permettre à ces différentes protéines de retrouver leur conformation native, les rendant ainsi à nouveau fonctionnelles (Parsell et al., 1994). Les agrégats protéiques de ce type n'ont donc pas besoin d'être dégradés montrant ainsi la réversibilité de ce type de stress traductionnel.

D'autres protéines défectueuses agrégées ne peuvent pas être prises en charge par Hsp104 pour retrouver leur conformation native ; elles incluent : les protéines ayant subi des dommages oxydatifs (Nyström, 2005), les protéines polyubiquitinylées pour leur adressage au protéasome (Kaganovich et al., 2008), les protéines amyloïdogéniques telles que les prions (Edskes et al., 1999), et les protéines contenant des expansions polyglutamines telles que la protéine Huntingtin qui possède 103 résidus glutamine dans son premier exon (Krobitsch and Lindquist, 2000; Meriin et al., 2002). Ces protéines peuvent être agrégées de différentes manières ; trois compartiments cellulaires cytoplasmiques ont été identifiés :

- le compartiment juxtanucléaire de contrôle-qualité (JUNQ), qui est adjacent à la membrane nucléaire, accumule transitoirement des protéines polubiquitinylées destinées à être dégradées par le protéasome (Kaganovich et al., 2008).
- le dépôt des protéines insolubles (IPOD), situé à la périphérie de la vacuole, stocke principalement des protéines agrégées et non ubiquitinylées comme les protéines sensibles à la carbonylation et les protéines amyloïdogéniques (Kaganovich et al., 2008).

Malgré la distinction entre ces deux compartiments cellulaires, il n'y a pas de frontière stricte entre l'adressage au JUNQ ou à l'IPOD. En effet, une même protéine, en fonction de son état d'ubiquitination peut être adressée vers l'un ou l'autre des compartiments. Par exemple, l'inhibition de certaines E2 ubiquitine-ligases va conduire à l'adressage des agrégats vers l'IPOD alors que sous forme polyubiquitinylées elles seront adressées vers le JUNQ. Ce modèle suggère que ces compartiments pourraient stocker les protéines agrégées provisoirement lorsque le protéasome est saturé pour limiter la toxicité cellulaire et pour optimiser leur dégradation ensuite (Kaganovich et al., 2008; revue Tyedmers et al., 2010).

- Il existe également dans le cytoplasme une forme particulière de corps d'inclusion appelé agrésome (Johnston et al., 1998; García-Mata et al., 1999). Il n'est pas présent en permanence dans la cellule, il se forme lors de l'expression de protéines particulières telle que la CFTR impliquée dans la mucoviscidose (Johnston et al., 1998) ou lors d'une inhibition du protéasome. L'agrésome est localisé à la périphérie de l'enveloppe nucléaire proche du centre d'organisation des microtubules (MTOC). Il contient principalement des protéines ubiquitinylées agrégées, séquestrées grâce à la formation d'une cage de filaments de vimentine. Ces protéines défectueuses sont reconnues par Bmh1 et transportées grâce au réseau de microtubules vers l'agrésome où des chaperonnes et protéines responsables du recrutement du protéasome permettent, soit le repliement correct de ces protéines, soit leur dégradation. Parmi les protéines associées à l'agrésome, les chaperonnes et co-chaperonnes telles que Sis1, Sgt2 et Hsp42 ont été mises en évidence, ainsi que des facteurs de recrutement du protéasome tels que Dsk2 ou encore Cdc48 et ses co-facteurs Ufd1 et Npl4 (Funakoshi et al., 2002; Wang et al., 2009).

Cependant, l'élimination des protéines défectueuses n'est pas limitée à l'activité du protéasome, elles peuvent également être adressées aux lysosomes pour être éliminées par autophagie notamment pour les protéines possédant des expansions polyglutamines (Lu et al., 2014).

L'ensemble de ces données montre donc que la formation d'agrégats protéiques n'est pas une conséquence incontrôlée d'un stress protéotoxique mais que ces compartimentations d'agrégats constituent des réponses cellulaires bien organisées et spécifiques permettant d'éviter l'accumulation de protéines défectueuses dans le cytoplasme et d'optimiser leur élimination grâce à des systèmes faisant intervenir le protéasome et les lysosomes.

Objectif de la thèse

Mon laboratoire d'accueil s'intéresse aux mécanismes de contrôle-qualité aussi bien cytoplasmique que nucléaire. Il fut l'un des premiers à avoir découvert et caractérisé le complexe RQC, impliqué dans la reconnaissance et la dégradation des peptides naissants aberrants Non-Stop (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). Il a également été montré tout récemment que lorsque le complexe RQC était défectueux, les peptides aberrants formaient des agrégats toxiques pour la cellule. J'ai participé à la finalisation de ces travaux qui étaient en cours lorsque je suis arrivée. Cette étude a fait l'objet d'une publication dans la revue « Journal of Biological Chemistry » en 2016 (Defenouillère et al., 2016) dont je suis 2^{ème} auteur. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Partie 4**.

Plusieurs facteurs protéiques liés génétiquement ou physiquement au complexe RQC avaient été identifiés avant mon arrivée. Afin de mieux comprendre ces processus de contrôle-qualité, j'ai entrepris, durant mes trois années de thèse, la caractérisation de trois facteurs.

J'ai étudié dans un premier temps la protéine Jlp2. Ce candidat avait été retenu car il avait montré des liens de létalité synthétique avec Ltn1, l'E3 ubiquitine-ligase du complexe RQC. J'ai pu montrer que Jlp2 avait non seulement des liens de létalité synthétique avec les autres membres du complexe RQC mais également avec les membres du complexe SKI ainsi qu'avec la protéine Ski7. Cependant, malgré ces liens génétiques forts, les tests fonctionnels effectués n'ont pas pu montrer de rôle évident de Jlp2 dans la dégradation des peptides naissants aberrants Non-Stop. De plus, malgré mes efforts de mises au point, les analyses biochimiques que j'ai effectuées n'ont pas permis d'identifier de partenaires protéiques associés à Jlp2 ayant un lien avec la dégradation des peptides aberrants Non-Stop. La difficulté à purifier les complexes associés à Jlp2 a rendu l'étude de la protéine Jlp2 très compliquée. Ce premier projet a dû être suspendu pour le moment. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Partie 1**.

Ensuite, j'ai participé à l'étude d'un facteur ayant un lien physique avec la protéine Rqc1, nous l'avons appelé Tac4 pour Translation-Associated-Component 4. Tac4 est une ARN hélicase putative, associée aux polysomes. Grâce à des expériences de CRAC (« UV-crosslinking and analysis of cDNA »), nous avons pu définir plus

précisément que Tac4 est associée avec la particule ribosomale 40S, au niveau de l'ARN ribosomique 18S, soit proche du tunnel d'entrée des ARN messagers, comme son homologue putatif DHX29 (Hashem et al., 2013). Il a été montré par ailleurs que DHX29 facilite *in vitro* l'initiation de la traduction et le « scanning » des ARN messagers dont les régions 5'-UTR sont très structurées (Pisareva et al., 2008). Or nos résultats préliminaires de CRAC ont montré que Tac4 interagissait plutôt avec les 3'-UTR des ARN messagers et non avec les 5'-UTR. Récemment le groupe de Rachel Green (Young et al., 2015) a montré que les ribosomes mal recyclés par la protéine Rli1 pouvaient réinitier une traduction à partir de régions 3'-UTR d'ARN messagers. Tac4 pourrait donc avoir un rôle dans cette réinitiation de la traduction. Nos premières observations sont très encourageantes mais la poursuite de ce travail nécessite encore des développements techniques et des analyses bioinformatiques encore en cours. Les résultats obtenus sont présentés dans la **Partie 2**.

Enfin, je me suis intéressée aux étapes précoces de la dégradation des ARN messagers et des peptides naissants aberrants Non-Stop, c'est-à-dire avant la dissociation du ribosome bloqué. Mon laboratoire d'accueil a montré récemment, en collaboration avec les groupes d'Elena Conti et de Roland Beckmann, que le complexe SKI était lié préférentiellement aux ribosomes contenant un ARN messager dont l'extrémité 3' dépasse (Schmidt et al., 2016). Une purification biochimique de la protéine Ski3 a été effectuée afin de mieux caractériser ce complexe. Ceci a permis de mettre en évidence un nouveau facteur que nous avons nommé Ska1 pour SKI-associated factor 1. Des analyses biochimiques supplémentaires ont pu montrer que Ska1 fait partie d'un sous-ensemble du complexe SKI. Les tests fonctionnels n'ont ensuite pas établi de rôle pour Ska1 dans la dégradation des messagers et peptides naissants aberrants Non-Stop. En revanche, Ska1 semblerait intervenir dans la dégradation générale à partir de l'extrémité 3' des ARN messagers, en association avec le complexe SKI et l'exosome. Or nous savons que le complexe SKI est associé aux ribosomes (Schmidt et al., 2016) alors que la région 3'-UTR est majoritairement dépourvue de ribosomes. Nos résultats présentés en **Partie 3** montrent que Ska1 pourrait être l'élément expliquant cette contradiction. Un article est actuellement bien finalisé cependant quelques expériences supplémentaires, en collaboration avec le laboratoire de Roland Beckmann, devrait nous permettre de soumettre dans un journal à haut facteur d'impact.

Résultats

I – Jlp2, un nouveau candidat dans la dégradation des peptides et ARN messagers aberrants Non-Stop ?

I. 1. Données initiales.

Le complexe RQC, composé des facteurs Rqc1, Rqc2, Ltn1, Cdc48 et de ses cofacteurs Ufd1 et Npl4, a été découvert et caractérisé en 2012/2013 (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). Ces découvertes récentes ont permis de mieux nous faire comprendre comment se déroulait la dégradation des peptides aberrants en cours de traduction. Cependant, des analyses sont encore nécessaires pour, d'une part, connaître le rôle précis des facteurs que l'on sait aujourd'hui impliqués dans ce processus et d'autre part, découvrir d'autres facteurs pouvant être associés à cette voie de surveillance. J'ai intégré le laboratoire d'Alain Jacquier en 2014 dans le but d'analyser de nouveaux facteurs qui semblent associés aux protéines du complexe RQC et donc potentiellement impliqués dans les voies de contrôle-qualité NSD et NGD.

Initialement, des cribles génétiques GIM (Genetic Interacting Mapping) ont été réalisés. Ces cribles, mis au point dans notre laboratoire, permettent l'identification d'interactions fonctionnelles, qu'elles soient synthétiques létales, qu'elles entraînent une croissance ralentie des cellules ou qu'elles soient épistatiques, entre un mutant de délétion d'un gène cible et une collection systématique de mutants de délétion couvrant le génome de *Saccharomyces cerevisiae* ou des mutants DamP pour les gènes essentiels (Decourty et al., 2008). Des cribles GIM avec une souche délétée de l'E3 ubiquitine-ligase du complexe RQC : *ltn1Δ* (Defenouillère et al., 2013) ont été effectués. Le graphique obtenu pour deux cribles est présenté (**Figure 18**). Chaque point correspond à un mutant de délétion ou un mutant Damp associé avec la délétion de *LTN1*. Les points autour du zéro correspondent à une absence d'interaction génétique entre *ltn1Δ* et les mutants de la banque testés. Alors que les valeurs négatives correspondent à des double-mutants pour lesquels la croissance est plus affectée qu'attendu par la simple somme des effets des simples mutants. Plus la valeur est éloignée du zéro, plus la croissance est affectée négativement. Ainsi, nous avons mis en évidence une interaction fonctionnelle de type létalité synthétique entre *LTN1* et *JLP2* (**Figure 18A**). Le même type de cribles génétiques GIM a été effectué avec la souche *jlp2Δ* et a confirmé cette

létalité synthétique entre *JLP2* et *LTN1* (Quentin Defenouillère, données non publiées, Figure 18B).

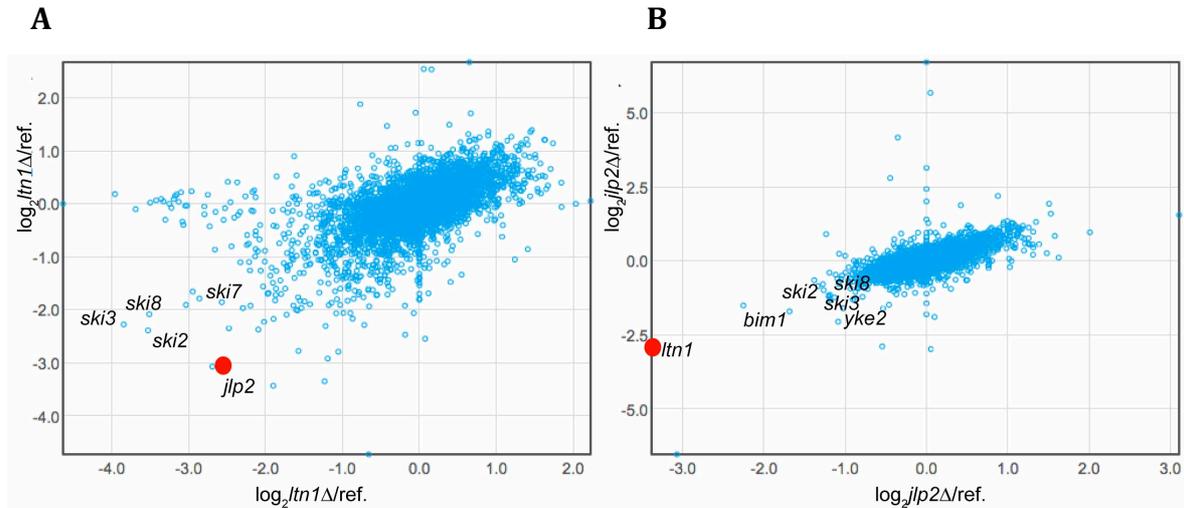


Figure 18. Cribles génétiques GIM montrant le lien fonctionnel entre *JLP2* et *LTN1*. Cribles GIM avec *ltn1Δ* (A) et *jlp2Δ* (B). Ce graphique représente l'abondance relative de chaque double-mutant issu du croisement avec le gène d'intérêt par rapport au gène de référence. Chaque point représentant un mutant de délétion de la collection systématique. Les valeurs négatives correspondent aux double-mutants ayant une croissance plus affectée qu'attendu par comparaison avec une culture de référence dans laquelle le mutant de la banque a été combiné avec une délétion sans phénotype.

Pour valider les interactions fonctionnelles observées entre *JLP2* et *LTN1*, les simples et doubles mutants de délétion ont été analysés à l'aide de tests de croissance sur un milieu riche YPGlu (ou YPD). Dans ces conditions, la croissance des quatre souches testées n'est pas affectée. Cependant, la méthode utilisée pour les cribles génétiques nécessite de cultiver les cellules dans un milieu sélectif comprenant un mélange de deux antibiotiques affectant la traduction (la kanamycine et la nourseothricine). Il avait précédemment été observé au laboratoire que les mutants du complexe SKI présentaient des interactions génétiques avec des mutants du complexe RQC dans les cribles (et inversement) mais pas sur boîte, en absence d'antibiotique. En revanche, l'ajout d'hygromycine B, un antibiotique affectant la fidélité de la traduction et favorisant le « readthrough » au niveau des codons STOP, permet de reproduire sur boîte l'effet synergique des double-mutants par rapport aux simple-mutants (Defenouillère et al., 2013). J'ai donc reproduit les tests sur boîte sur un milieu contenant de l'hygromycine B. On observe que la délétion de *JLP2* seule n'affecte pas la croissance de la cellule en présence d'hygromycine B, alors que la délétion de *LTN1*

milieu Magic Medium –URA et un milieu Magic Medium –URA contenant de l’Hygromycine B (60µg/ml). Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours.

1. 2. Structure de Jlp2.

Jlp2 est une petite protéine cytoplasmique de 208 acides aminés conservée au cours de l’évolution (**Figure 21A**). Elle possède un domaine DUF814 (Domain of unknown function) qui n’a pas encore été caractérisé. Il contiendrait, dans la région N-terminale, un domaine DNAJ correspondant à un domaine chaperon (Walsh et al, 2004) et un domaine NFACT-R capable de se lier aux ARN (Burroughs and Aravind, 2014)(**Figure 21B**).

A

Alignement de séquences JLP2 (ORF : YMR132c)

H. sapiens, M. musculus, A. thaliana, D. melanogaster, C. elegans, S. cerevisiae.

```

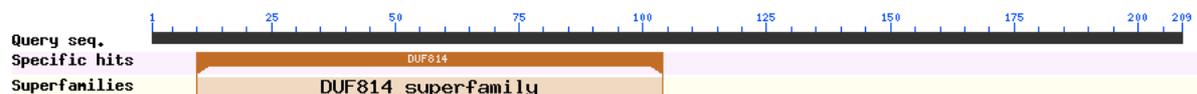
H.s. MVFYFTSSS--VNSAYTIYMGKDKYENEDLLIKYGPED--IWFHVDKLSSAHVYLRRLHKG
M.m. MVFYFTSSS--VNSSTYTIYMGKDKYENEDLLIKYGPED--IWFHVDKLSSAHVYLRRLHKG
A.t. MVFYFKAR--PDAGDYTIYMGKDKYENEDLLIKYGPED--VWFHVDKLSSAHVYLRRLHKG
D.m. MVFYFKSN--VQEFAMLYMCRDKYENEDLLIKYGPED--VWFHVDKLSSAHVYLRRLHKG
C.e. MYLKESSN--TTNEFTMIYMGKDKYENEDLLIKYGPED--VWFHVDKLSSAHVYLRRLHKG
S.c. MVFYFESKPTES--TPYQIVMGKDKYENEDLLIKWSYRELNYVWFHADKYSSEGHVYLRRLRPN

H.s. E-NIEDIEKEVLMDCARLVKANSIQGCKMNNVNVVYTPWSNLKKTADMDVGCIGFHRCKD
M.m. E-KIEDIEKEVLMDCARLVKANSIQGCKMNNVNVVYTPWSNLKKTADMDVGCIGFHRCKD
A.t. Q-SFDDISEGVLEDCAQLVKANSIQGNKVNNDVVYTPWSNLKKTASMDVGOVGFHNSKM
D.m. Q-TIDDIETVLEDAQLKANSIQGNKVNNDVVYTPWSNLKKTADMDVGCIGFHRCKD
C.e. M-TIDDIETVLEDAQLKANSIQGNKVNNDVVYTPWSNLKKTADMDVGOVGFHNSKM
S.c. EKTIDDIETVLEDAQLKANSIQGNKVNNDVVYTPWSNLKKTADMDVGCIGFHRCKD

H.s. VKIVTVERKVNIEINRLEKTR-VERFPDLAAEKGRDRERNEKKAQIQEMKREKEEMK
M.m. VKIVTVERKVNIEINRLEKTR-LEKFPDLAAEKGRDRERNEKKAQIQEMKREKEEMK
A.t. VRTIRVERKVNIEINRLEKTR-VERTPDLRAEADVNAEAEKKAQIHLREKREKEEDRL
D.m. VRRIRLEKRVNIEINRLEKTR-VERFPDLAAEKGRDRERNEKKAQIQEMKREKEEMK
C.e. VKHTVPTKRVNIEINRLEKTR-RKDDIYKEDRDARDAERKQIKLEQERKREKEMK
S.c. CRKMECGARDNKLINRLEKTRVLEFNNVEELNFAKKTAKNGDFVNYESNRNLIIEEK

H.s. KRREMDELRSYSSLMRVENMSSNODGNDSD-----DDFM
M.m. KRREMDELRSYSSLMRVENMSSNODGNDSD-----DDFM
A.t. EKPROSELRYSKGLMVTDKMTSNKPIASNSKSLQLELDDFM
D.m. QRELEAELRSYASLQKSENMTNYDAGNES-----DDFM
C.e. AQNEKKRIEGLDWDWDAGATTRNVDVPGN-----LSDDFM
S.c. LRKVAKNQKKNKQSKDEVTDMMQLEV-----
    
```

B



C

```

RQC2 FEKYSWFISSEGLVMMGKSPAETDQIYS-KYTEDDDIYM-SNSFNS-HVWIK--NPEKT
sp|P40206|JLP2_YEAST --EY-----STPYQIVMGKDKYENEDLLIKWSYRELNYVWFHADKYSSEGHVYLRRLRPNKKT
RQC2 --EVPNTLMQAGILCMSSSEAWSK----KISSSPWCFKKNVSKFDGSDNSIL
sp|P40206|JLP2_YEAST IDDIETVLEDAQLKANSIQGNKVNNDVVYTPWSNLKKTADMDVGCIGFHRCKD-----
    
```

Figure 21. Séquence et alignements de Jlp2

(A) Alignement de séquence de *JLP2* avec les homologues d’autres espèces (B) Position du DUF814 de *Jlp2* (C) Alignement du DUF de *Jlp2* avec le DUF de *Rqc2*.

De plus, un alignement de séquence de Jlp2 a montré que celui-ci possédait un domaine DUF814 en commun avec Rqc2 (**Figure 21C**). Jlp2 pourrait donc avoir un rôle similaire à Rqc2 dans la voie de dégradation des peptides aberrants.

1. 3. Analyse de données dans la littérature.

Au-delà de cette létalité synthétique entre *JLP2* et *LTN1*, d'autres résultats issus de la littérature laissaient penser que Jlp2 avait un rôle dans les voies de surveillance NSD/NGD. Des cribles de chimiogénomiques ont été effectués chez Novartis (Hoepfner et al., 2014). Durant ces cribles, environ 1 800 composés chimiques ont été testés sur une collection de mutants de délétion chez *Saccharomyces cerevisiae*. La sensibilité relative de chacun de ces mutants par rapport aux différents composés chimiques a été analysée, ce qui a permis ensuite de regrouper les mutants en fonction de leurs profils de réponses à la gamme des composés testés. Les mutants répondant de la même façon dans les mêmes conditions chimiques sont ainsi prédits comme intervenant dans des voies physiologiques communes. Ainsi, nous avons pu voir que la souche mutante *jlp2Δ* a un profil d'interaction chimiogénomique similaire aux souches mutantes pour des gènes du complexe RQC (*LTN1*, *RQC1* et *RQC2*), des gènes du complexe SKI (*SKI2*, *SKI3* et *SKI8*), le gène *SKI7* ainsi que les gènes codant pour les protéines reconnaissant initialement le ribosome bloqué sur les peptides aberrants (*SLH1*, *HEL2* et *YKR023W*). Les cribles effectués avec les souches mutantes des gènes cités précédemment contiennent dans leur groupe le mutant de délétion du gène *JLP2*. Ainsi, ces résultats montrent également des liens fonctionnels entre la protéine Jlp2 et les différents membres du complexe RQC (Ltn1, Rqc1 et Rqc2), du complexe SKI (Ski2, Ski3, Ski8) et Ski7. De plus, les composés chimiques affectant la croissance de ces souches mutantes sont la cycloheximide et l'anisomycine, connues toutes deux pour bloquer la synthèse protéique (**Figure 22**), suggérant que *JLP2* serait lié à la traduction, avec les complexes RQC, SKI et *SLH1*, *HEL2*, *YKR023W*.

<i>JLP2</i>		<i>LTN1</i>		<i>RQC1</i>		<i>RQC2</i>	
gene	correlation	gene	correlation	gene	correlation	gene	correlation
VMS1	0,62	JLP2	0,46	MBF1	0,4	JLP2	0,35
VMS1*	0,54	VMS1	0,44	JLP2	0,39	LTN1	33
MBF1	0,49	MBF1	0,43	LTN1	0,37	VMS1*	0,32
LTN1	0,46	VMS1*	0,38	VMS1*	0,35	SKI8*	0,28
SKI8*	0,44	RQC1	0,37	RQC2	0,27	RQC1	0,27
RQC1	0,39	RQC2	0,33	SLH1	0,27	YML002W	0,25
SLH1	0,38	SLH1	0,31	SKI8*	0,26	PRS5	0,24
RQC2	0,35	PRS5	0,29	VMS1	0,26	VMS1	0,24
SKI7	0,33	PTR2	0,27	YKR023W	0,23	REX4	0,24
YKR023W	0,32	SIN3	0,27	HEL2	0,21	MBF1	0,23
SKI3	0,32	HXT12	0,26				
SKI8	0,31	YKR023W	0,26				
HEL2	0,3						
SKI2	0,3						

B

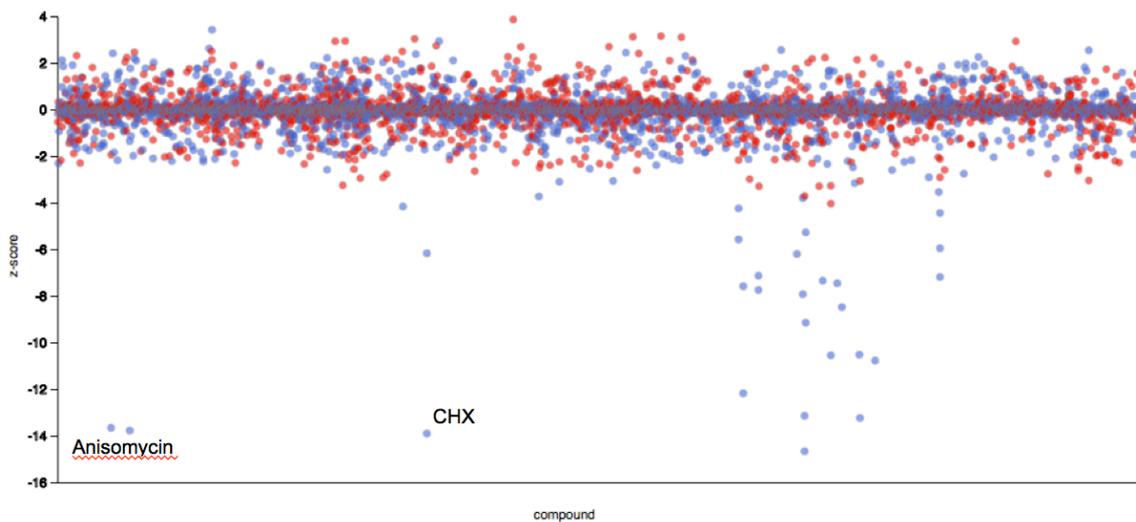


Figure 22. Cribles chimiogénomiques (Hoepfner et al., 2014)

A) Valeurs indiquant les mutants ayant des comportements les plus proches de chaque mutant considéré (*Jlp2*, *Ltn1*, *Rqc1* et *Rqc2*). Les protéines des complexes RQC (en rouge) et SKI (en bleu) et les protéines de « préconditionnement » à la dégradation (en vert).

B) Graphe indiquant les composants chimiques (axe des x) testés ayant le plus fort effet sur la croissance du mutant *jlp2Δ* (axe y). Les points bleus correspondent aux expériences réalisées dans les souches homozygotes pour les délétions et les points rouges pour les souches hétérozygotes pour les délétions.

Pour valider les liens fonctionnels observés chez Novartis et pour étendre les résultats des cribles génétiques (voir la **partie « Résultats - I. 1. »**), j'ai effectué des tests

de croissance sur milieu contenant de l'hygromycine B avec des mutants de délétion simples et doubles combinant les délétions de *JLP2* avec les délétions des gènes *LTN1*, *RQC1*, *RQC2*, *SKI3* ou *SKI7*. La croissance des simple-mutants ne semble pas être affectée par la présence d'hygromycine B, sauf pour les mutants *ltn1Δ* et *ski3Δ* dont la croissance est ralentie. En revanche, tous les double-mutants testés présentent une croissance affectée en présence d'hygromycine B (**Figure 23**). Ces résultats confirment donc que Jlp2 possède des liens fonctionnels avec les facteurs du complexe RQC, du complexe SKI, ainsi qu'avec la protéine Ski7.

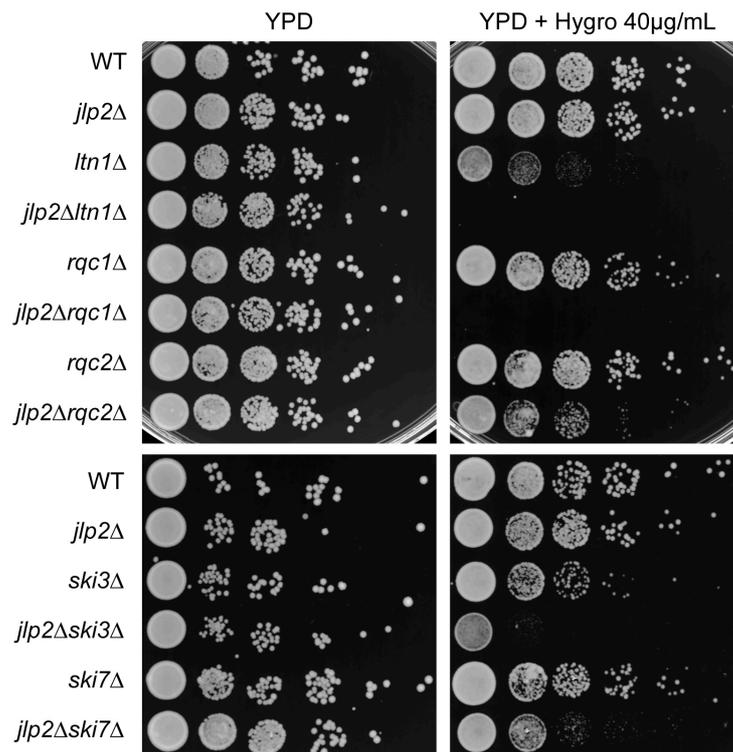


Figure 23. Test de croissance montrant les liens fonctionnels entre Jlp2 et les protéines des complexes RQC et SKI.

Dilutions en série de cultures de souches WT, *jlp2Δ*, *ltn1Δ*, *rqc1Δ*, *rqc2Δ*, *ski3Δ*, *ski7Δ*, *jlp2Δltn1Δ*, *jlp2Δrqc1Δ*, *jlp2Δrqc2Δ*, *jlp2Δski3Δ* et *jlp2Δski7Δ* ont été déposées sur milieu YPGlu et YPGlu+40 µg/ml d'Hygromycine B. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours.

1. 4. *JLP2* : un rôle dans le NSD ?

Les liens fonctionnels entre *JLP2* et les membres des complexes RQC et SKI étant très forts, j'ai testé le rôle de Jlp2 dans les voies de surveillance NSD et NGD. Les souches de référence que nous utilisons, BY4741 ou BY4742, possèdent un marqueur d'auxotrophie *his3Δ1*. En l'absence de complémentation par un gène HIS3 fonctionnel,

ces souches sont donc incapables de croître sur un milieu dépourvu d'histidine. Les souches WT (BY4741), *jlp2Δ*, *ltn1Δ* et *jlp2Δltn1Δ* ont été transformées avec un plasmide pAV188 exprimant une forme aberrante du gène *HIS3* : *His3-NonStop* et possédant un marqueur d'auxotrophie *URA3*, utilisé pour sélectionner les souches transformées par le plasmide (Frischmeyer et al., 2002; van Hoof et al., 2002). Des tests de croissance sous forme de stries ont été effectués sur un milieu -URA mais contenant de l'histidine. Comme attendu, la croissance d'aucune des souches contenant le plasmide pAV188 n'est affectée sur ce milieu (-URA). En revanche, sur un milieu -HIS, la croissance de la souche WT est très affectée. En effet, dans cette souche de référence présentant une voie de dégradation des peptides aberrants NonStop fonctionnelle, la protéine traduite à partir du gène *HIS3-NonStop* est rapidement dégradée. La souche *jlp2Δ* se comporte comme la souche sauvage WT, montrant donc que la délétion de *JLP2* seule ne semble pas avoir de conséquences détectables sur la voie de dégradation des peptides NonStop. En revanche, et comme attendu, la souche *ltn1Δ* est peu affectée par l'absence d'histidine car la voie de dégradation des peptides aberrants est affectée par la délétion de *LTN1*, la protéine aberrante *His-NonStop* est alors stabilisée et peut compléter le marqueur d'auxotrophie *his3Δ1*. La croissance de la souche double-mutante *jlp2Δltn1Δ* semble similaire à celle de la souche simple-mutante *ltn1Δ* (Figure 24). Ces tests montrent donc que la délétion de *JLP2*, qu'elle soit seule ou en absence de *LTN1*, n'a pas d'effet, détectable par ce test, sur la voie de dégradation des protéines NonStop.

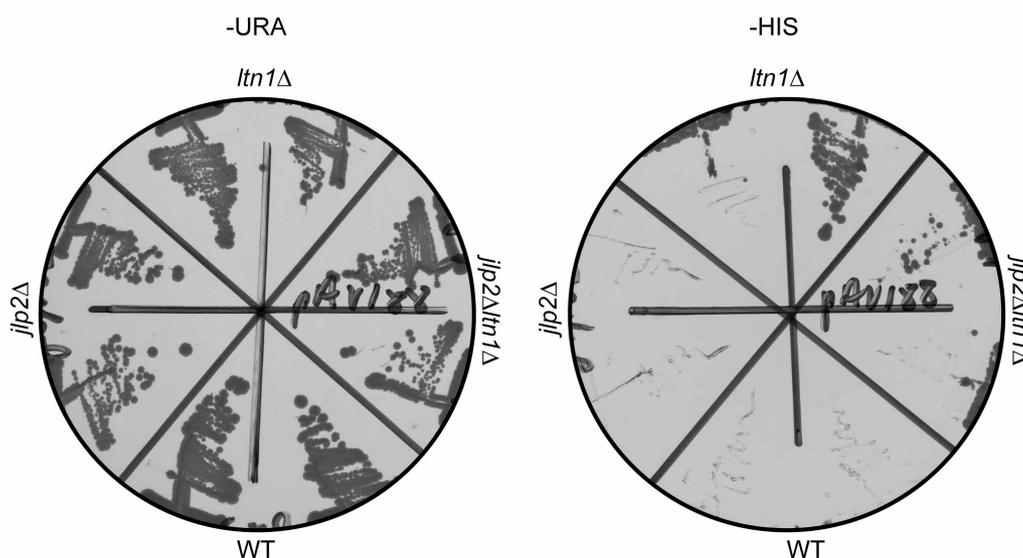


Figure 24. *Jlp2* ne semble pas avoir de rôle dans la voie NSD.

Dépôts en stries de cultures de souches WT, *jlp2Δ*, *ltn1Δ* et *jlp2Δltn1Δ* exprimant le plasmide pAV188 sur un milieu -URA et -HIS. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours.

Ces tests étant seulement qualitatifs, j'ai effectué des tests quantitatifs et fonctionnels de manière à pouvoir observer des effets plus faibles.

J'ai étudié le devenir d'une protéine aberrante TAP-NonStop dans différents mutants de délétion sur trois niveaux: (i) est-ce que les peptides aberrants sont accumulés? (ii) Sachant que Rqc2 est responsable de l'ajout des CAT-tails, est-ce que Jlp2 pourrait avoir un rôle dans ce processus? (iii) Rqc1 empêchant l'accumulation des agrégats de protéines aberrantes quand Rqc2 est actif, Jlp2 serait-il impliqué dans cette fonction?

J'ai transformé les souches WT, *jlp2Δ*, *ltn1Δ*, *rqc1Δ*, *rqc2Δ*, ainsi que les double-mutants avec *jlp2Δ* correspondants, avec un plasmide pAV184 exprimant la forme protéique aberrante TAP-NonStop sous contrôle du promoteur GAL (Defenouillère et al., 2013). Après induction en milieu YPGal, les protéines de ces souches ont été extraites et le devenir des protéines TAP-NonStop a été analysé par Western Blot à l'aide d'un anticorps reconnaissant l'étiquette protéine A (PAP). Dans un premier temps, j'ai pu voir qu'il y a très peu d'accumulation de TAP-NonStop dans les souches WT et *jlp2Δ* contrairement aux souches simple-mutantes ou double-mutantes où la délétion d'un des gènes exprimant un facteur du complexe RQC entraîne une accumulation de TAP-NonStop. De plus, la délétion de *JLP2* associée à celles de *RQC1*, *RQC2* ou *LTN1* ne semble pas avoir d'effet supplémentaire sur l'accumulation de TAP-NonStop (**Figure 25A et 25B**). Dans un deuxième temps, alors que les souches délétées de *RQC2* ne montrent pas la bande représentant les TAP-NonStop comportant les extensions CAT, nous pouvons cependant les observer dans toutes les souches contenant *RQC2*, même lorsque *JLP2* est délété (**Figure 25A et 25B**). Dans un dernier temps, les agrégats protéiques sont observables dans les souches délétées de *RQC1* ou *LTN1*. Lorsque la délétion de *RQC1* ou de *LTN1* est combinée à la délétion de *JLP2*, il semblerait que l'accumulation d'agrégats protéiques soit légèrement plus importante (**Figure 25A et 25B**). Jlp2 pourrait donc avoir un rôle avec Ltn1 et Rqc1 pour limiter la formation des agrégats protéiques.

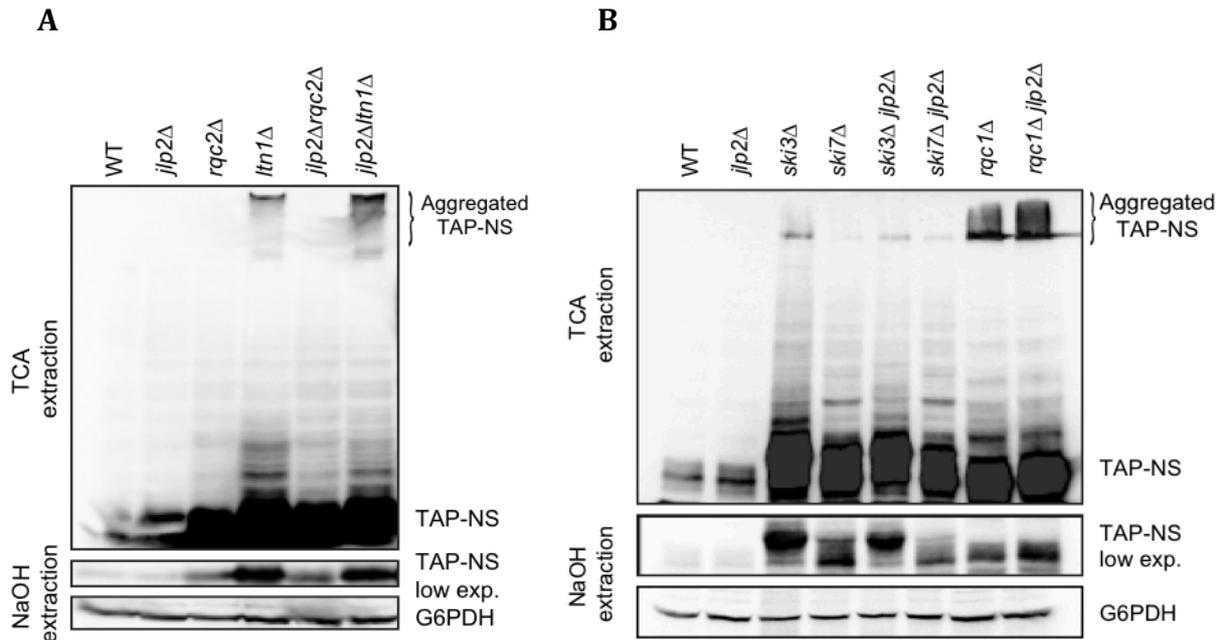


Figure 25. Jlp2 n'a pas de rôle évident dans la voie NSD.

Extraits cellulaires totaux obtenus par la méthode NaOH ou TCA des souches WT, *jlp2Δ*, *rqc2Δ*, *ltn1Δ*, *jlp2Δrqc2Δ* et *jlp2Δltn1Δ* (A) ou WT, *jlp2Δ*, *ski3Δ*, *ski7Δ*, *jlp2Δski3Δ*, *jlp2Δski7Δ*, *rqc1Δ* et *rqc1Δjlp2Δ* (B). Ces extraits ont migrés dans un gel de polyacrylamide à 10% puis analysés par Western Blot avec un anticorps PAP. Un contrôle de charge a été effectué avec un anticorps anti-G6PDH.

De la même manière, j'ai transformé les souches *ski3Δ*, *ski7Δ* et les double-mutantes combinées avec *jlp2Δ* avec le plasmide exprimant les protéines aberrantes TAP-NonStop. Les observations précédentes par rapport à l'accumulation de TAP-NonStop et les formes TAP-NonStop avec CAT-tails sont les mêmes dans ces souches. La délétion de *JLP2* associée à celles de *SKI3* ou *SKI7* ne semble pas avoir d'effet supplémentaire sur l'accumulation de TAP-NonStop ou sur l'ajout de CAT-tails.

Jlp2 ne semblerait donc avoir aucun rôle dans la dégradation des protéines aberrantes TAP-NonStop ou l'ajout de CAT-tails en C-terminal des peptides aberrants, en revanche il pourrait être impliqué avec Ltn1 et Rqc1 dans la prévention de la formation des agrégats protéiques.

1. 5. Effet de la surexpression de JPL2

J'ai construit un gène rapporteur pCM190-*JLP2* dans lequel le gène *JLP2* est sous contrôle du promoteur tet07 afin de tester l'effet de la surexpression de *JLP2*. Par ailleurs, un alignement de la séquence de *JLP2* avec la séquence de Rqc2 a montré que ces deux facteurs possèdent le domaine DUF814 en commun (Figure 21C). Possédant

un domaine commun, est-ce que Jlp2 pourrait partager une fonction avec Rqc2 dans la voie de dégradation NSD/NGD ou dans une autre voie ? Ces deux facteurs peuvent-ils entrer en compétition pour leur fonction ? Pour répondre à ces questions : si Jlp2 et Rqc2 partagent une même fonction, la surexpression de *JLP2* pourrait avoir une incidence sur l'activité de Rqc2. J'ai donc transformé le plasmide pCM190-*JLP2* dans la souche sauvage WT et également dans des souches délétées de *RQC2*. Ces tests de croissance sur milieu sans hygromycine B ne montrent aucun phénotype, indiquant que la surexpression de *JLP2* n'a pas d'effet détectable sur la croissance des cellules (**Figure 26**). Sur un milieu en présence d'hygromycine B, la surexpression de *JLP2* ne permet pas de restaurer une croissance qui serait affectée par les différentes délétions testées, sauf dans le cas de la délétion simultanée des gènes *RQC2* et *SKI2*. Mais les différences de phénotype que nous pouvons observer ici sont trop faibles pour pouvoir réellement conclure. Les résultats présentés ici montrent que l'on ne peut pas mettre en évidence par ces tests si Jlp2 a un rôle de complémentation ou de compétition avec Rqc2.

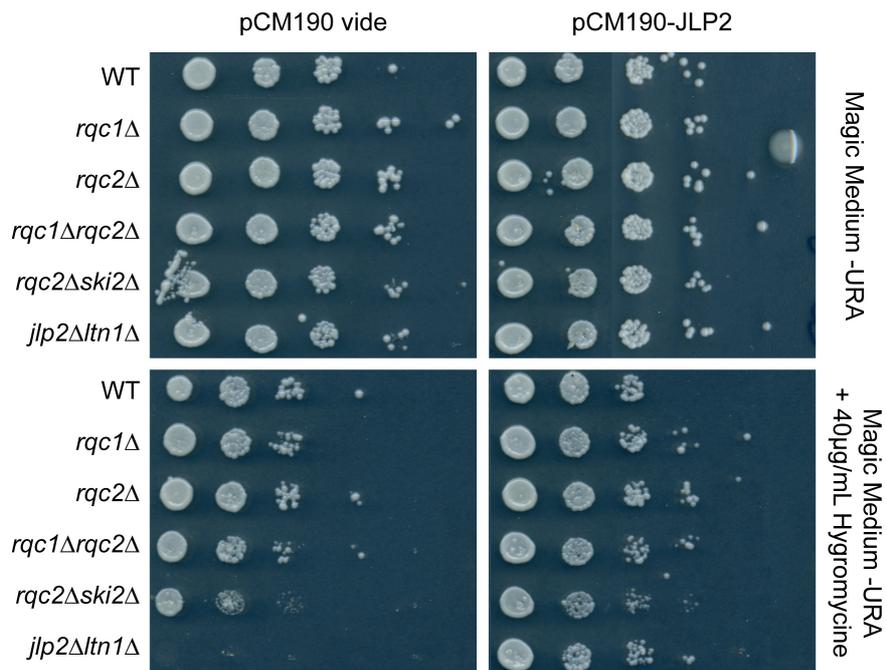


Figure 26. La surexpression de Jlp2 ne compense pas l'absence de Rqc2.

Dilutions en série de cultures de souches WT, *rqc1Δ*, *rqc2Δ*, *rqc1Δrqc2Δ*, *rqc2Δski2Δ* et *jlp2Δltn1Δ* ont été déposées sur milieu Magic Medium -URA et Magic Medium -URA+40 µg/ml d'Hygromycine B. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours.

Rqc2 étant responsable de l'ajout des CAT-tails aux peptides naissants aberrants, et la formation des agrégats protéiques dépendant de l'ajout de ces CAT-tails, nous avons testé si Jlp2 pouvait partager un rôle avec Rqc2 dans ces mécanismes. J'ai extrait

les protéines des souches étudiées précédemment préalablement transformées avec les plasmides pTAP-NonStop et pCM190-*JLP2* et observé par Western Blot si la surexpression de *JLP2* pouvait avoir une incidence sur les extensions CAT aux peptides aberrants en l'absence de Rqc2 et donc former des agrégats protéiques. Comme attendu, nous pouvons observer une accumulation d'agrégats protéiques dans les extraits de la souche *rqc1Δ* alors qu'il n'y en a pas dans les souches WT, *rqc2Δ* et *rqc1Δrqc2Δ*, malgré la surexpression de *JLP2* (**Figure 27**). Jlp2 ne semble donc pas avoir de rôle compensatoire avec Rqc2 pour l'ajout des CAT-tails.

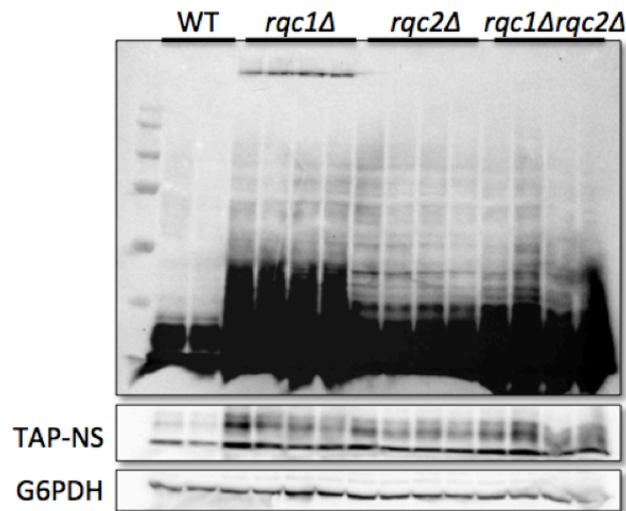


Figure 27. La surexpression de *JLP2* n'a pas d'effet sur l'ajout d'extensions CAT par Rqc2.

Extraits cellulaires totaux préparés à partir de souches WT, *rqc1Δ*, *rqc2Δ* et *rqc1Δrqc2Δ* transformés avec les plasmides pTAP-NonStop et pCM190-Jlp2. Ces extraits ont migrés dans un gel de polyacrylamide à 10% puis analysés par Western Blot avec un anticorps PAP. Un contrôle de charge a été effectué avec un anticorps anti-G6PDH. Un temps d'exposition de la membrane plus court a également été analysée.

1. 6. Jlp2 n'est pas associé aux ribosomes

La voie de surveillance des peptides naissants aberrants Non-Stop étant associée aux ribosomes et le complexe RQC intervenant sur la particule 60S ribosomale lors de la dégradation de ces peptides aberrants (Defenouillère et al., 2013), j'ai testé si Jlp2 pouvait être associé aux ribosomes ou à l'une de ses sous-unités grâce à des gradients de polysomes et des purifications biochimiques. J'ai, dans un premier temps, testé la fonctionnalité de l'étiquette TAP fusionnée à *JLP2*. Pour cela, les souches WT, *ltn1Δ*, Jlp2-TAP et Jlp2-TAP/*ltn1Δ* ont été cultivées sur un milieu YPGlu contenant de l'hygromycine

B. Alors que les souches WT, *ltn1Δ* et Jlp2-TAP poussent sur ce milieu, la souche Jlp2-TAP/*ltn1Δ* meurt. Ce phénotype de croissance correspond à celui d'une souche *jlp2Δltn1Δ*, la fusion Jlp2-TAP n'est donc pas fonctionnelle. J'ai alors construit la fusion Jlp2-3FLAG. L'étiquette 3FLAG étant plus petite que l'étiquette TAP elle pourrait moins déstabiliser la protéine ou ses interactions. En effet, un test de croissance a été effectué sur un milieu YPGlu contenant de l'hygromycine B et nous avons observé que la souche Jlp2-3FLAG pousse comme les souches WT, *jlp2Δ*, *ltn1Δ* ou Jlp2-3FLAG/WT alors que *jlp2Δltn1Δ* meurt (**Figure 28**). La fusion 3FLAG semble donc fonctionnelle.

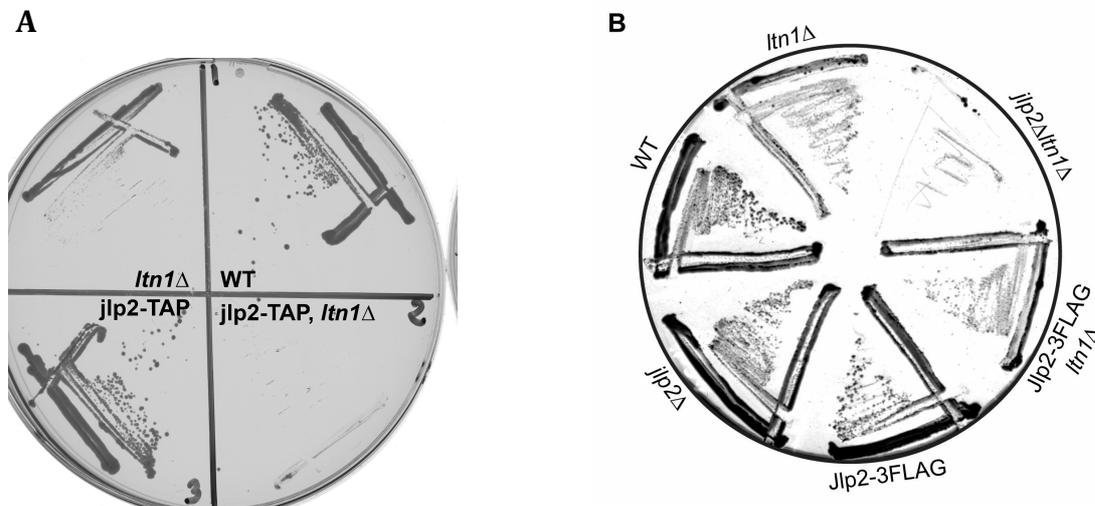


Figure 28. Test de fonctionnalité des étiquettes TAP et 3FLAG fusionnées à Jlp2. (A) Dépôts en stries de cultures de souches WT, Jlp2-TAP, *ltn1Δ* et Jlp2-TAP/*ltn1Δ* sur un milieu YPGlu+Hygromycine B. (B) Dépôts en stries de cultures de souches WT, *jlp2Δ*, *ltn1Δ*, Jlp2-3FLAG, Jlp2-3FLAG/*ltn1Δ* et *jlp2Δltn1Δ* sur un milieu YPGlu+Hygromycine B. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours.

Pour tester l'interaction entre Jlp2 et les ribosomes, j'ai cultivé une souche exprimant Jlp2-3FLAG dans des conditions normales, dans un mutant de délétion *ltn1Δ* ou encore en présence d'hygromycine B pour affecter la traduction. J'ai ensuite extrait les protéines totales de ces cultures et fait sédimenter les extraits dans un gradient de sucrose permettant de séparer les composants cellulaires en fonction de leur coefficient de sédimentation et donc de séparer les particules 40S et 60S, le ribosome 80S et les polysomes. Nous avons pu observer que Jlp2 co-sédimente avec aucun des éléments du ribosome, elle se trouve dans les fractions légères du gradient de polysomes non

associée aux ribosomes, quelque soit la condition étudiée (**Figure 29**). Jlp2 ne serait donc pas associé au complexe RQC lorsque celui-ci est associé à la particule 60S.

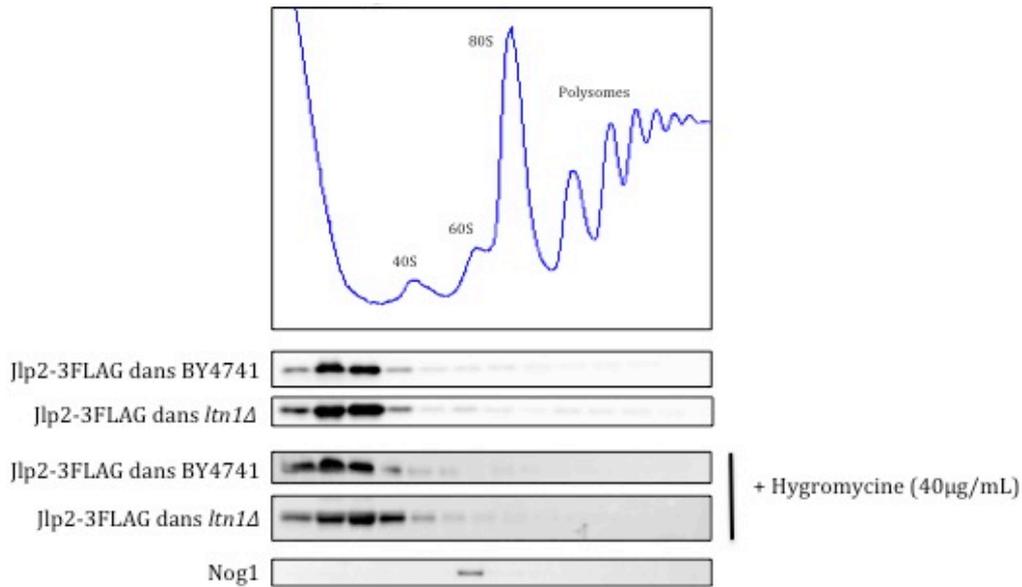


Figure 29. Jlp2 n'est pas associé aux ribosomes

Les extraits totaux ont été préparés à partir de différentes cultures d'une souche exprimant Jlp2 avec une étiquette 3FLAG. Ils ont ensuite été séparés dans un gradient de sucrose (10-50%). Les fractions du gradient obtenues sont déposées dans un gel de polyacrylamide 10% puis transféré sur une membrane de nitrocellulose par Western Blot. Jlp2 a ensuite été révélé avec un anticorps anti-FLAG et un anticorps anti-Nog1 a été utilisé pour révéler les pics contenant la particule 60S.

1. 7. Recherche de partenaires protéiques de Jlp2

Pour comprendre le rôle que pourrait avoir Jlp2, il est important de savoir si ce dernier agit au sein d'un complexe et avec quels facteurs il interagit. Pour répondre à cette question, des analyses biochimiques ont été effectuées dans trois souches différentes : WT, Jlp2-3FLAG (dans des conditions sauvages) et Jlp2-3FLAG/*ltn1Δ*. J'ai purifié Jlp2 *via* son étiquette 3FLAG avec des anticorps anti-FLAG couplés à des billes magnétiques. Les protéines purifiées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Une analyse semi-quantitative des complexes Jlp2-3FLAG ou Jlp2-3FLAG/*ltn1Δ* a été effectuée en comparaison avec une souche sauvage qui a subi le même traitement et qui révèle le bruit de fond de l'expérience. On peut observer que les protéines co-purifiées sont en quantité faible en comparaison avec l'appât Jlp2 (axe des ordonnées) indiquant que la co-purification est de faible efficacité. Cependant, on peut observer un léger enrichissement des protéines du complexe régulateur 19S du protéasome et les huit

protéines composant le complexe CCT. De plus, de façon intéressante, lorsque la purification de Jlp2-3FLAG est effectuée dans des conditions où *LTN1* est délété, ces protéines ne sont plus enrichies (**Figure 30B et 30C**), suggérant une interaction avec le protéasome dépendante de Ltn1. En revanche, le complexe RQC n'a pas été trouvé. Le lien entre Jlp2 et le complexe CCT reste à confirmer (voir **Partie « Discussion et Perspectives »**).

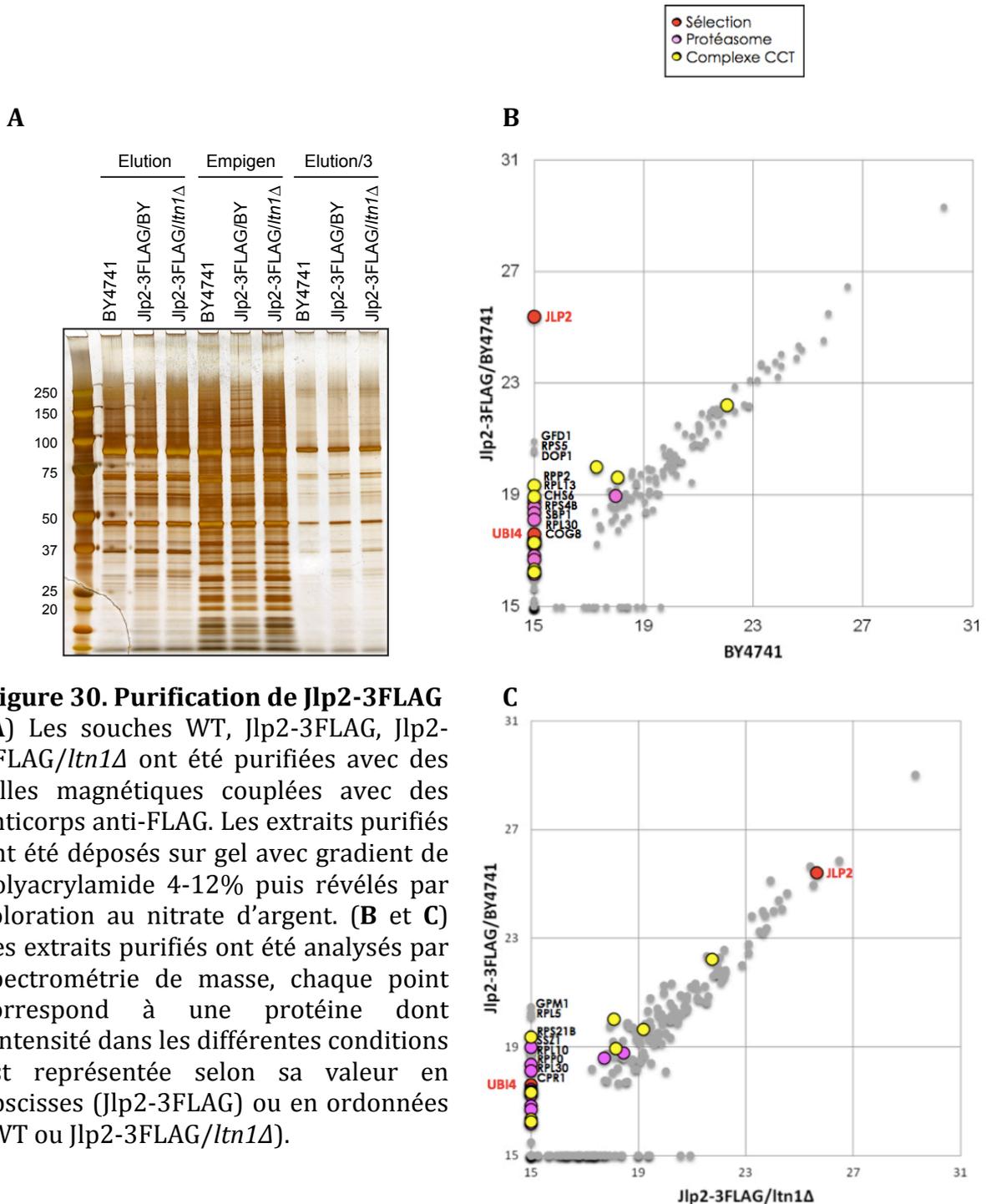


Figure 30. Purification de Jlp2-3FLAG
(A) Les souches WT, Jlp2-3FLAG, Jlp2-3FLAG/*ltn1*Δ ont été purifiées avec des billes magnétiques couplées avec des anticorps anti-FLAG. Les extraits purifiés ont été déposés sur gel avec gradient de polyacrylamide 4-12% puis révélés par coloration au nitrate d'argent. **(B et C)** Les extraits purifiés ont été analysés par spectrométrie de masse, chaque point correspond à une protéine dont l'intensité dans les différentes conditions est représentée selon sa valeur en abscisses (Jlp2-3FLAG) ou en ordonnées (WT ou Jlp2-3FLAG/*ltn1*Δ).

1. 8. Conclusions

Nous avons pu montrer dans cette première partie que Jlp2 possède des liens fonctionnels très forts avec les complexes RQC et SKI. Malgré ces liens fonctionnels, nous n'avons pas pu mettre en évidence de rôle de Jlp2 dans les voies de surveillance NSD.

Les résultats préliminaires de purifications biochimiques montrent une association de Jlp2 avec les protéines de la sous-unité 19S du protéasome. Cependant, le degré de copurification est faible et malheureusement les analyses biochimiques ne peuvent pas être reproduites facilement en raison d'une potentielle instabilité de la version étiquetée de Jlp2, dans les différentes conditions que nous avons testées, rendant donc la suite de cette étude difficile.

Le lien biochimique que nous avons observé avec les protéines composant le complexe CCT (**Figure 30**) ainsi que le lien fonctionnel entre Jlp2 et avec les protéines Bim1 (protéine associée aux microtubules) et Yke2 (sous-unité du complexe Prefoldin GimC)(**Figure 18**) restent encore à explorer (voir **Partie « Discussion et Perspectives »**).

II – TAC4, un nouveau candidat dans la réinitiation de la traduction dans le 3'-UTR des ARN messagers ?

II. 1. Données initiales.

II. 1. a. Tac4 interagit physiquement avec Rqc1

Toujours dans l'optique d'identifier de nouveaux facteurs liés au complexe RQC et donc à la voie de surveillance NSD/NGD, un crible double-hybride utilisant Rqc1 comme appât a permis de mettre en évidence le deuxième facteur que j'ai étudié durant ma thèse. Cette méthode permet de mettre en évidence une interaction physique entre une protéine appât, ici Rqc1, et une ou plusieurs protéines proies.

Ainsi, nous avons pu montrer que Rqc1 interagissait, selon le test utilisé pour le crible double-hybride, avec un facteur non caractérisé pour le moment que nous avons appelé Tac4 pour « Translation-associated component 4 » (**Figure 31**).

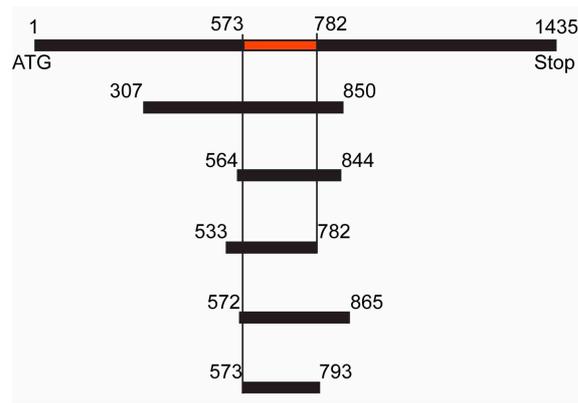


Figure 31. Rqc1 interagit en double-hybride avec un domaine de Tac4

Le crible 2H réalisé selon (Fromont-Racine et al., 1997) avec Rqc1 comme appât a sélectionné 17 clones contenant 5 fusions différentes de Tac4 délimitant un domaine d'interaction commun. Les chiffres représentent la position des AA.

Une recherche d'homologie de séquences a permis de déterminer que la protéine DHX29 chez les mammifères serait l'homologue putatif de Tac4. De façon intéressante, DHX29 et la Listerin (homologue de Ltn1 chez les mammifères) ont été co-purifiés, *in vitro*, lors de tests de reconstitution du complexe minimal nécessaire pour la polyubiquitination des peptides aberrants (Shao and Hegde, 2014). Ces éléments suggéraient donc que Tac4 pouvait avoir un rôle avec Rqc1 dans la voie de surveillance NSD/NGD.

DHX29 est une protéine hélicase impliquée, selon des analyses *in vitro*, dans l'initiation de la traduction pour des ARN messagers possédant une séquence 5'-UTR ayant une structure secondaire complexe (Pisareva et al., 2008). Elle contient dans sa région N-terminale un domaine hélicase central et contient dans sa région C-terminale un domaine HA associé au domaine hélicase et un domaine OB. Des données de cryo-microscopie électronique ont montré que les domaines hélicase central et C-terminal interagissent près de l'hélice h16 du ribosome alors que les parties distales sont proches du tunnel d'entrée des ARN messagers (Hashem et al., 2013)(**Figure 32**). Il existe également des points de contact entre DHX29 et les sous-unités eIF3a, eIF3b et eIF3i (des Georges et al., 2015; Pisareva and Pisarev, 2016). Pour le moment, le rôle de DHX29 durant l'initiation de la traduction n'est pas encore bien connu, néanmoins, il semblerait qu'elle permette le remodelage du complexe ribosomal pendant l'étape de « scanning » du codon d'initiation AUG et permettrait également de débobiner les structures secondaires des ARN messagers très structurés. DHX29, seule, n'est pas une hélicase processive.

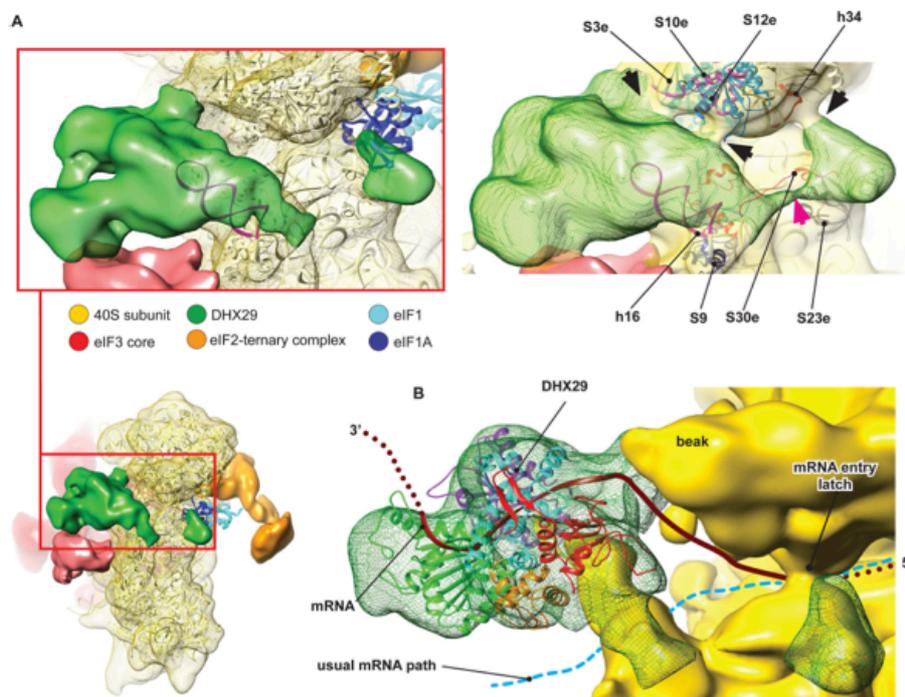


Figure 32. DHX29 se lie au niveau de l'hélice h16 de l'ARN ribosomique 18S. Données obtenues par cryo-microscopie électronique montrant DHX29 (en vert) qui se lie au niveau de l'hélice h16 (en rose)(Hashem et al., 2013).

II. 1. b. Structure de Tac4.

Tac4 est une protéine de 1 435 acides aminés qui possède dans sa région N-terminale un domaine UBA, capable de se lier aux chaînes de polyubiquitines et impliqué dans la voie de dégradation ubiquitine/protéasome ainsi qu'un domaine RWD-like qui ressemble à la structure contenue dans les E2 ubiquitine-ligase. A partir de la région centrale, Tac4 possède un domaine hélicase qui contient également le site de liaison à Rqc1. Un alignement protéique de Tac4 avec d'autres ARN hélicases de la famille DEAH montre que la séquence de ce domaine de Tac4 est très conservée : les acides aminés mais également les distances entre les différents domaines sont également conservées (**Figure 33**). Tac4 serait donc une ARN hélicase putative appartenant à la famille DEAH, famille d'hélicases responsable de l'ouverture des appariements des acides nucléiques (hélice double brin de l'ADN, structures secondaires et tertiaires des ARN) et impliquée dans des voies telles que la transcription, l'épissage des pré-ARN messagers, la biogenèse des ribosomes, le transport nucléocytoplasmique, la traduction, la dégradation des ARN messagers (revue Cordin et al., 2006).

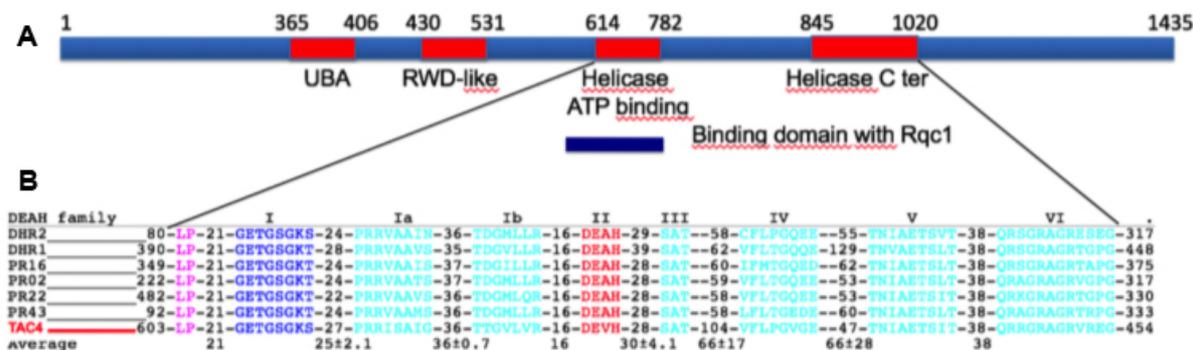


Figure 33. Séquence et alignement de Tac4.

(A) Schéma de la structure de Tac4. (B) Alignement de séquence de Tac4 avec d'autres ARN hélicase de la famille DEAH (par Kyle Tanner).

II. 1. c. Tac4 est associé aux ribosomes.

Les liens double-hybride montrent un lien physique entre Tac4 et Rqc1, lui-même lié à la grande sous-unité 60S ribosomale. En revanche, l'homologue putatif de Tac4, DHX29, est associé à la petite sous-unité ribosomale 40S. Ces deux observations étant contradictoires, un gradient de polysomes a été effectué afin de déterminer comment sédimenter Tac4. Les protéines totales d'une souche exprimant Tac4 avec une étiquette

TAP ont été extraites puis séparées dans un gradient de sucrose. Ainsi, les fractions analysées sur Western Blot nous montrent que Tac4 co-sédimente préférentiellement avec le pic de ribosomes 80S mais également avec la particule 40S et les polysomes (**Figure 34**).

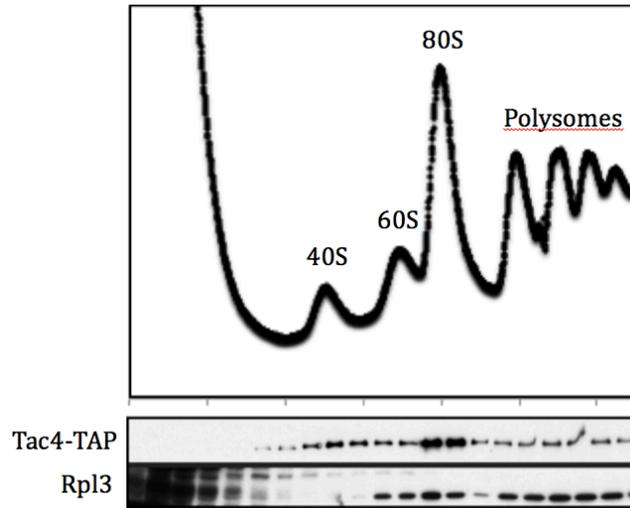


Figure 34. Tac4 est associé à la particule 40S ribosomale et aux ribosomes.

Les extraits totaux ont été préparés à partir de la culture d'une souche exprimant Tac4 avec une étiquette TAP. Ils ont ensuite été séparés dans un gradient de sucrose (10-50%). Les fractions du gradient obtenues sont déposées dans un gel de polyacrylamide 10% puis transféré sur une membrane de nitrocellulose par Western Blot. Tac4 a ensuite été révélé avec un anticorps anti-TAP puis un anticorps anti-Rpl3 a été utilisé pour révéler les pics contenant la particule 60S ribosomale.

Des purifications biochimiques ont été effectuées avec une souche exprimant Tac4-TAP afin de déterminer avec quels autres facteurs Tac4 interagissait. Sachant que Tac4 interagit avec le ribosome, des purifications avec Rpl16a-TAP ont été réalisées en parallèle pour comparaison. Après la purification grâce à des billes magnétiques couplées à des immunoglobulines G (IgG), les extraits purifiés sont analysés par spectrométrie de masse. Lorsque l'on compare la purification de Tac4-TAP avec la souche WT, on peut observer un enrichissement légèrement plus important des facteurs de la sous-unité 40S (points verts) par rapport à la sous-unité 60S (points bleus). D'autres facteurs (points rouges) sont également significativement enrichis, la plupart d'entre eux étant des facteurs liés aux ribosomes et à la traduction comme Sup35, Rbg1, Rli1, Zuo1, Sro9 ou encore Pab1 (**Figure 35A**). Pour vérifier l'enrichissement de la sous-unité 40S par rapport à la 60S, nous avons comparé la purification de Tac4-TAP avec celle de Rpl16a-TAP. Le léger enrichissement des facteurs de la sous-unité 40S dans la purification de Tac4-TAP est toujours visible. Cette représentation permet également de

mettre en évidence les facteurs protéiques qui sont associés à Tac4 et probablement avec la petite sous-unité 40S (**Figure 35B**). Tac4 serait donc associé à la particule 40S, aux ribosomes et à des protéines en lien avec la traduction. Il est à noter que Rqc1 n'a pas été retrouvé dans les purifications biochimiques.

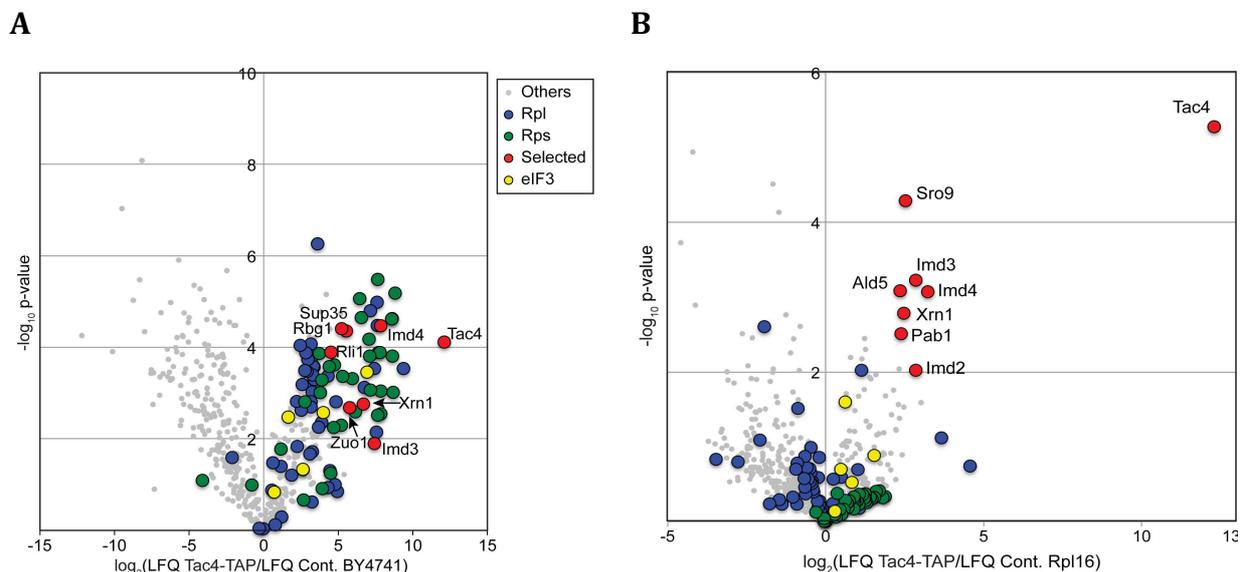


Figure 35. Purification de Tac4-TAP

Trois purifications indépendantes pour les souches WT, Tac4-TAP et Rpl16-TAP ont été effectuées et analysées par spectrométrie de masse. Elles ont permis d'obtenir cette représentation en volcano-plot. Chaque point correspond à une protéine identifiée et quantifiée (**A**) la purification de Tac4-TAP a été comparé avec une souche sauvage (**B**) la purification de Tac4-TAP a été comparé avec la purification de Rpl16a-TAP

Lorsque j'ai rejoint ce sujet, nous savions donc que Tac4 était lié au ribosome, avec une préférence pour la 40S et non pour la 60S. Nous étions donc confrontés à un paradoxe, ou bien Tac4 était l'homologue fonctionnel de DHX29 et engagé dans l'initiation de la traduction, ou bien Tac4, par son lien avec Rqc1, était impliqué dans les voies de dégradation NSD/NGD. Tac4 possédant un domaine de liaison à l'ARN j'ai entrepris, d'une part une expérience de CRAC afin de déterminer les ARN associés à Tac4, et d'autre part, essayé d'obtenir des mutants de Tac4 ayant un phénotype de croissance.

II. 2. Données obtenues lors de ma thèse

II. 2. a. Recherche de phénotype de croissance.

J'ai tout d'abord testé la croissance de mutants de délétion de *TAC4* sur un milieu riche YPGlu et sur un milieu YPGlu contenant de l'hygromycine B. Dans ces conditions, la

croissance des souches n'est pas affectée (**résultats non présentés**). Différents mutants de délétion de *TAC4* combinés avec la délétion de gènes du RQC ou du complexe SKI n'ont également montré aucun phénotype de croissance (**résultats non présentés**).

J'ai alors testé l'effet de la surexpression de *TAC4*. Pour cela j'ai construit un plasmide dans lequel *TAC4* est sous contrôle d'un promoteur tet07 (plasmide pCM190).

Le gène *TAC4* est donc surexprimé en milieu YPGlu. En revanche, il est éteint en présence de Doxycycline. Sur ces deux milieux, la croissance des cellules n'est pas affectée (**Figure 36**), la surexpression de *TAC4* n'a donc pas d'influence sur la croissance cellulaire. J'ai alors entrepris la construction d'une version mutée de *TAC4* (*tac4-mut*) où la séquence DEVH dans le domaine hélicase (en rouge sur la **Figure 33**) est remplacée par DQVH. Un effet dominant négatif a déjà été décrit pour d'autres hélicases avec ce type de mutation ponctuelle. Dans ce cas, sur un milieu YPGlu+DOX, où l'expression de la protéine mutante est inhibée, la croissance n'est pas affectée. En revanche, on peut observer, sur un milieu YPGlu-DOX, une inhibition de la croissance due à la surexpression de *tac4-mut* (**Figure 36**). La surexpression de *tac4-mut*, qui a un effet sur la croissance des cellules, est donc dominante négative.

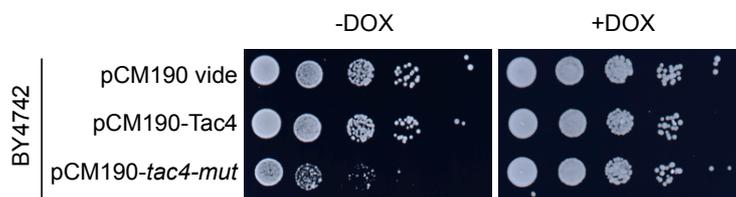


Figure 36. Test de croissance de la surexpression de *tac4Δ*

Des dilutions en série de cultures de souches WT contenant le plasmide pCM190 vide, le plasmide pCM190-Tac4 surexprimant Tac4 et le plasmide pCM190-*tac4mut* surexprimant une version mutée de Tac4 ont été déposées sur milieu YPGlu -DOX et YPGlu +DOX. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours.

II. 2. b. Liaison de Tac4 avec la particule 40S et les ARN messagers.

Sachant que Tac4 est une protéine hélicase putative, qu'elle est potentiellement homologue avec la protéine hélicase DHX29 chez les mammifères, il serait donc très probable que Tac4 soit également liée à des séquences ARN. Pour tester cette hypothèse, avec l'aide de Gwenaël Badis-Bréard, des expériences préliminaires de CRAC (une variante de la technique de CLIP adaptée aux protéines étiquetées chez la levure) ont été effectuées avec une version de Tac4 fusionnée avec une étiquette CRAC, qui est dérivée

du TAP. Cette méthode permet l'identification de séquences ARN liées à une protéine d'intérêt grâce à des liaisons covalentes formées, entre la protéine et les ARN qu'elle contacte, lors d'une exposition des cellules aux UV. Les ARN associés à Tac4-CRAC ont été extraits, amplifiés par PCR et séquencés. Des analyses bioinformatiques ont pu mettre en évidence des enrichissements spécifiques d'ARN liés à Tac4-CRAC. Notamment, un enrichissement très important de fragments d'ARN recouvrant une partie de l'ARN ribosomique 18S a pu être observé (**Figure 37A**). Plus précisément, ces fragments correspondent à l'hélice h16 de l'ARN ribosomique 18S (en orange sur la **Figure 37B**). D'après des données de structure, cette hélice se situe au niveau du tunnel d'entrée des ARN messagers du ribosome (**Figure 37B**).

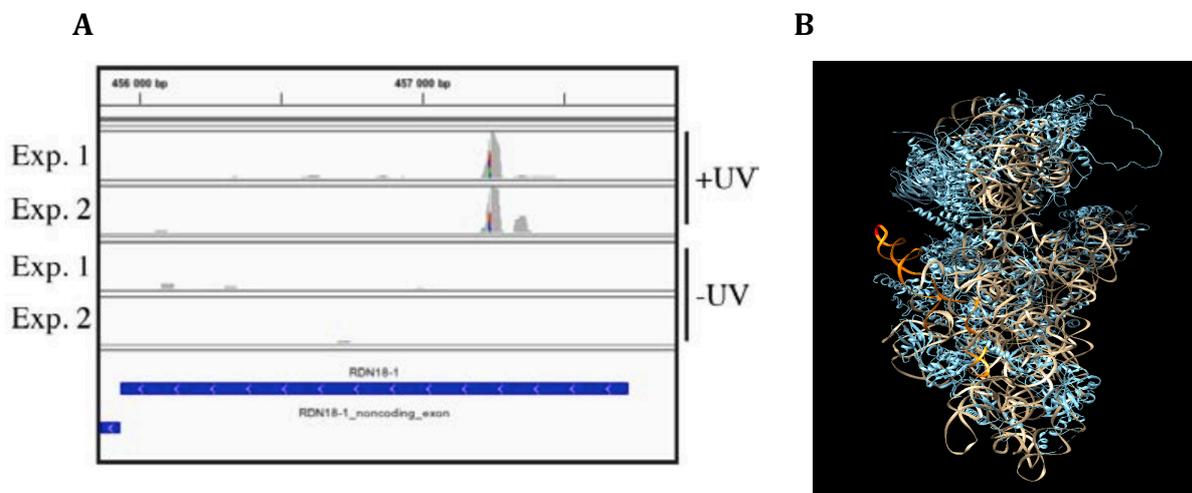


Figure 37. Tac4 se lie au niveau de l'hélice h16 de l'ARN ribosomique 18S

Données obtenues par la méthode de CRAC. Les cellules sont soumises ou non à un traitement aux UV, ce traitement permettant de lier covalamment les liaisons existantes entre une protéine et des séquences ARN. Les ARN associés à la protéine Tac4-CRAC sont extraits, amplifiés, séquencés et analysés. **A)** Capture d'écran de l'application IGV permettant de visualiser les fragments d'ARN enrichis lors de cette expérience (en gris). **B)** Vue de l'hélice h16 sur la structure tridimensionnelle de la sous-unité 40S du ribosome. L'image a été obtenue le logiciel Chimera (Pettersen et al., 2004) en utilisant les données de structure de (Ben-Shem et al., 2011). L'hélice h16 est indiquée en orange et le point de cross-link est en rouge.

Ces résultats de liaison entre Tac4 et la particule 40S ribosomale sont similaires avec les interactions décrites entre DHX29 et la sous-unité 40S (Hashem et al., 2013)(**Figure 32**). Ces observations sont donc tout à fait en accord avec l'hypothèse que Tac4 serait l'homologue chez la levure de DHX29 chez les mammifères.

Il a été montré que DHX29 est capable *in vitro* de stimuler l'initiation de la traduction d'ARN messagers possédant des 5'-UTR très structurés. Nous nous attendions donc à voir, en dehors de l'interaction avec la sous-unité 40S ribosomale, des interactions avec les régions 5'-UTR des ARN messagers. Or, dans nos résultats préliminaires de CRAC, il semblerait que Tac4 soit lié au niveau des régions 3'-UTR. En effet, il n'y a pas d'enrichissement de fragments aux alentours du codon d'initiation AUG de la traduction dans des conditions +UV alors que nous pouvons observer un pic représentant l'enrichissement de fragments aux alentours du codon de terminaison de la traduction (**Figure 38**). Ceci suggère donc que Tac4 serait plutôt lié au niveau des régions 3'-UTR des ARN messagers contrairement à DHX29.

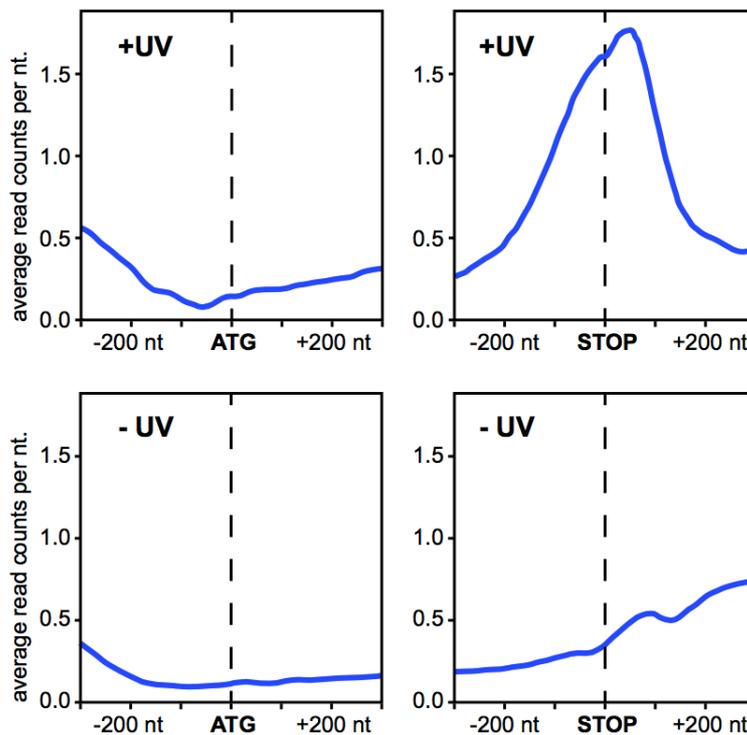


Figure 38. Tac4 se lie au niveau des 3'-UTR des ARN messagers

Données obtenues par la méthode de CRAC. L'enrichissement de fragments ARN amplifiés à partir des séquences associées à Tac4-CRAC a été analysé au niveau du codon d'initiation de la traduction et au niveau du codon de terminaison pour toutes les ORF connues chez *Saccharomyces cerevisiae*.

II. 3. Conclusions

Les résultats que nous avons pour le moment suggèrent que Tac4 serait une protéine hélicase dont l'homologue chez les mammifères est DHX29. Comme cette dernière, Tac4 se lie au niveau de l'hélice h16 de l'ARN ribosomique 18S, proche du

tunnel d'entrée des ARN messagers. Il a été montré que DHX29 peut, *in vitro*, jouer un rôle dans l'initiation de la traduction, favorisant l'assemblage du ribosome pendant l'étape de « scanning » du codon d'initiation et permettant d'ouvrir les structures secondaires d'ARN messagers dont le 5'-UTR est très structuré (Pisareva and Pisarev, 2016). En revanche, nos résultats préliminaires de CRAC semblent montrer que Tac4 est préférentiellement lié au niveau des régions 3'-UTR. Récemment, l'équipe de Rachel Green a montré que les ribosomes 80S qui ne sont pas correctement recyclés peuvent atteindre le 3'-UTR des messagers, que cela soit en l'absence de Dom34 ou Hbs1 mais également dans des conditions sauvages (Young et al., 2015)(**Figure 39**). Selon ces études, il existerait deux populations de ribosomes accumulés en 3'-UTR : (i) des ribosomes non-recyclés qui scannent l'ARN messenger sans réinitier la traduction et qui nécessitent l'intervention des facteurs Dom34/Hbs1 pour être recyclés comme dans un cas de NSD ou NGD et (ii) des ribosomes capables de réinitier la traduction à partir de n'importe quel codon et qui sont ensuite éliminés par les facteurs de terminaison classiques au prochain codon de terminaison rencontré. Une hypothèse attractive, qui réconcilierait les différentes observations, serait que Tac4 est requis pour la réinitiation de cette deuxième population de ribosomes non-recyclés normalement au codon STOP.



Figure 39. Schéma de la réinitiation de la traduction en l'absence de Rli1.
(Young et al., 2015)

L'ensemble de ces éléments semble nous diriger vers un modèle où Tac4 pourrait avoir un rôle dans cette réinitiation de la traduction à partir des régions 3'-UTR d'ARN

messagers. Mais la méthode de CRAC, au niveau expérimental et au niveau bioinformatique, demandant encore de nombreuses mises au point à effectuer, nous avons décidé de mettre de côté ce projet pour étudier un autre facteur dont les données préliminaires étaient plus avancées et nécessitant des travaux que nous maîtrisons au sein du laboratoire.

III – Un nouveau sous-complexe SKI impliqué dans la dégradation des transcrits dépourvus de ribosome

Mon laboratoire d'accueil, en collaboration avec les groupes d'Elena Conti et de Roland Beckmann, a montré récemment que le complexe SKI a une forte affinité avec les ribosomes dont l'extrémité 3' de l'ARN messager dépasse (Schmidt et al., 2016). Cette association est cohérente avec le rôle du complexe SKI associé aux ribosomes durant la voie de surveillance NSD puisque cette voie est dépendante de la traduction et dégrade les ARN avec un ribosome bloqué à l'extrémité 3'. Mais cette association n'est pas cohérente avec le rôle du complexe SKI dans la dégradation générale des ARN messagers. En effet, avant la dégradation de la région codante contenant les ribosomes, la région 3'-UTR normalement dépourvue de ribosomes doit également être dégradée par l'exosome assisté du complexe SKI.

Dans la dernière partie de ma thèse, j'ai étudié le mécanisme d'action du complexe SKI afin d'essayer de lever ce paradoxe.

III. 1. Ska1, un nouveau facteur associé à une sous-population du complexe SKI.

Pour comprendre le rôle du complexe SKI, nous avons effectué une purification d'affinité en utilisant une souche exprimant une version de Ski3 avec une étiquette TAP. Les facteurs purifiés avec Ski3-TAP ont été, dans un premier temps, analysés par SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (**Figure 1A** dans Zhang et al., en cours) puis identifiés par spectrométrie de masse (**Figures 1B et 1C** dans Zhang et al., en cours). Comme attendu, les protéines les plus enrichies durant la purification de Ski3-TAP par rapport à une souche de référence WT ne possédant pas de protéine étiquetée, sont les protéines du complexe SKI lui-même. On retrouve Ski2 et Ski8 en plus de Ski3. Un deuxième groupe de protéines a été enrichi, il est composé essentiellement de protéines faisant partie de l'exosome. Dans ce groupe, nous avons pu également mettre en évidence la protéine Ski7 mais aussi un nouveau facteur exprimé par le gène *YKL023W* que nous avons nommé Ska1 pour « SKI-associated component 1 ». Le troisième groupe identifié correspond aux protéines ribosomales de la petite et la grande sous-unité avec un enrichissement légèrement plus important pour les protéines de la particule 40S, Xrn1 faisant également partie de ce groupe (**Figure 1B** dans Zhang et al., en cours).

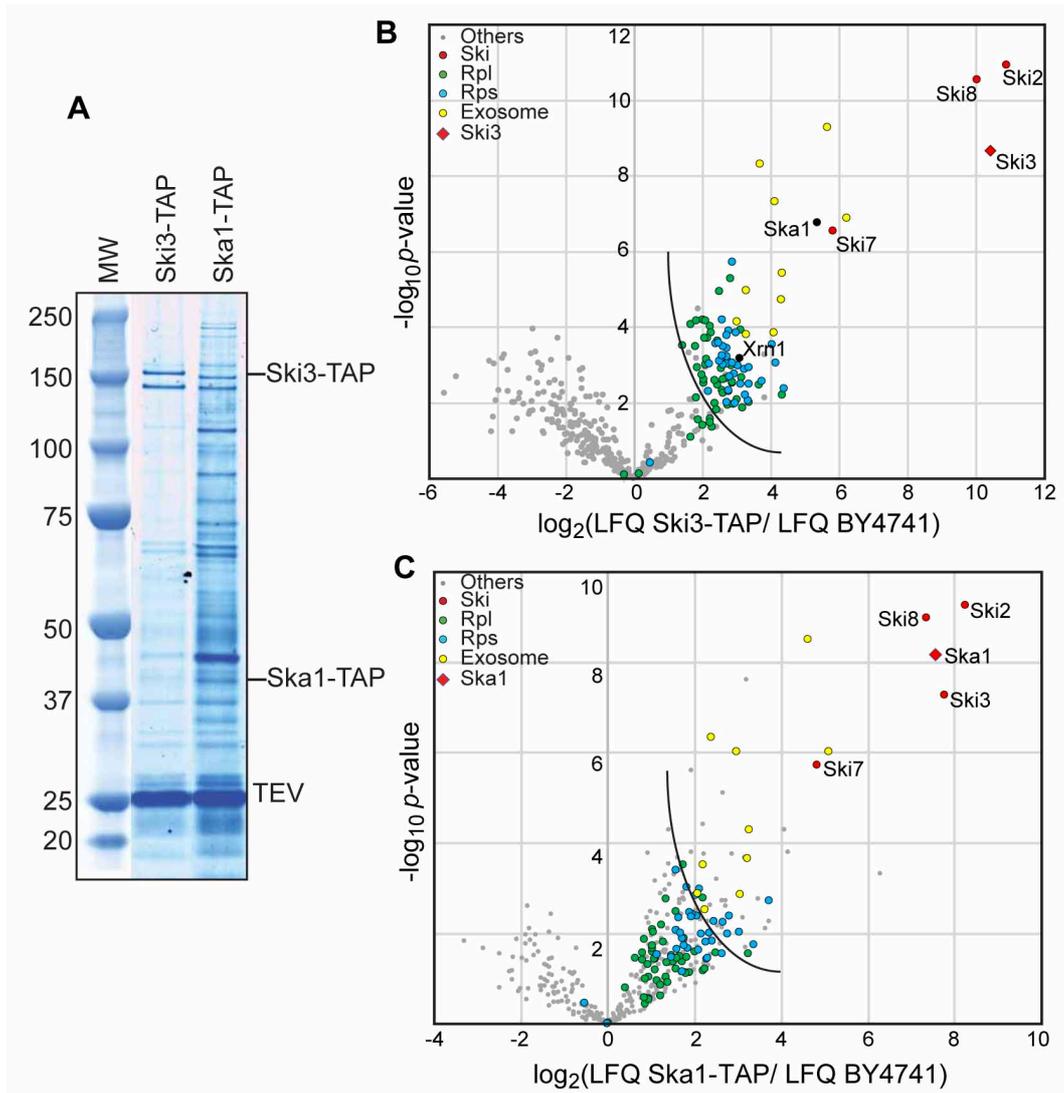


Figure 1. Ska1 est associé au complexe SKI.

Purification d'affinité de Ski3-TAP et Ska1-TAP comme appât et BY4741 comme contrôle. (A) Les éluats TEV ont été séparés sur un gel gradient de polyacrylamide (4 à 12%) puis révélés par bleu de Coomassie (B) Volcanotplot de la purification de Ski3-TAP comparée à la purification de la BY4741 (C) Volcanotplot de la purification de Ska1-TAP comparée à la purification de la BY4741.

Pour valider l'interaction entre les protéines Ski3 et Ska1, nous avons utilisé une souche exprimant une version étiquetée Ska1-TAP pour effectuer des purifications biochimiques. La fonctionnalité des protéines Ski3 et Ska1 fusionnées avec l'étiquette TAP a été testée en combinaison avec un mutant *dcp2-degdon*, le degdon en présence d'auxine (IAA) va éliminer la protéine Dcp2. Nous avons pu observer que la souche *dcp2-degdon* contenant la fusion Ski3-TAP ne présente pas une croissance plus affectée que la souche simple-mutante *dcp2-degdon* que cela soit sur un milieu YPGlu contenant ou non de l'auxine alors que la souche *dcp2-degdon/ski3Δ* meurt. Concernant Ska1-TAP, la

croissance de la souche *dcp2-degron* contenant la fusion Ska1-TAP semble plus affectée que la souche simple-mutante *dcp2-degron* bien que moins affectée que le double mutant *dcp2-degron/ska1Δ* (**Figure S1** dans Zhang et al., en cours). L'ensemble de ces tests nous montrent donc que la fusion Ski3-TAP est bien fonctionnelle alors que la fusion Ska1-TAP ne l'est que partiellement.

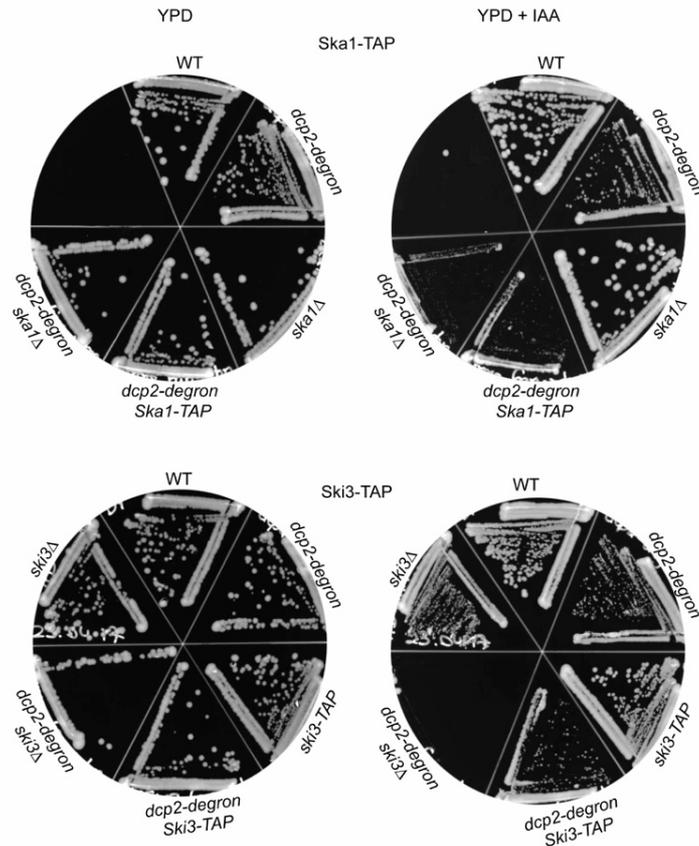


Figure S1. Test de fonctionnalité des fusions Ski3-TAP et Ska1-TAP.

Dépôts en stries de cultures de la souche sauvage WT, des simple-mutants *dcp2-degron*, *ska1Δ*, *Ska1-TAP*, *ski3Δ*, *Ski3-TAP* et des double-mutants *dcp2-degron/ska1Δ*, *dcp2-degron/Ska1-TAP*, *dcp2-degron/ski3Δ* et *dcp2-degron/Ski3-TAP* sur milieu YPGlu et YPGlu+IAA. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours.

Les analyses en spectrométrie de masse de la purification d'affinité de Ska1-TAP montrent que le complexe associé à Ska1 est très similaire à celui de Ski3 : les protéines les plus enrichies étant les protéines Ski2, Ski3 et Ski8, le deuxième groupe comportant des protéines faisant partie de l'exosome avec Xrn1 et Ski7 et le troisième groupe étant les protéines ribosomales bien que ce dernier enrichissement soit moins important que celui observé lors de la purification d'affinité de Ski3-TAP (**Figure 1C** dans Zhang et al., en cours). De plus, l'abondance relative des protéines dans une souche sauvage a été étudiée à partir de données de protéomique provenant du laboratoire de Mathias Mann,

la comparaison des 4 077 protéines identifiées chez la levure montre que le niveau d'expression de Ska1 est moins important que celui des protéines du complexe SKI et de l'exosome (**Figure 2** dans Zhang et al., en cours).

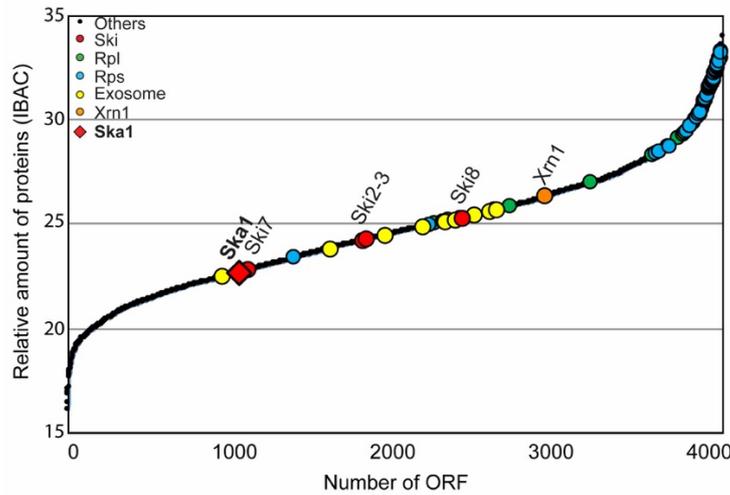


Figure 2. Abondance relative de chaque protéine chez *Saccharomyces cerevisiae*. Chaque point représente une protéine identifiée (en rouge, le complexe SKI ; en jaune, l'exosome ; en bleu, les RPS ; en vert, les RPL). Le losange rouge représente l'abondance de Ska1. Les données proviennent de Nagaraj et al., 2012

Donc, d'après l'ensemble des purifications biochimiques, Ska1 est lié majoritairement au complexe SKI mais pas l'inverse montrant ainsi que le complexe SKI peut être associé à la protéine Ska1 ou non. Ska1 serait donc lié à une sous-population du complexe SKI.

III. 2. *Ska1 n'est pas nécessaire à l'assemblage du complexe SKI.*

Cette association spécifique de Ska1 au complexe SKI nous a amené à tester si Ska1 pouvait participer à l'assemblage du complexe SKI. Pour répondre à cette question, des extraits protéiques de Ski3-TAP dans des souches exprimant *SKA1* ou non ont été séparés sur gradient de sucrose puis fractionnés et analysés par Western Blot. La comparaison des profils de sédimentation montre que Ski3-TAP sédimente principalement dans les fractions contenant les ribosomes 80S en présence comme en absence de Ska1 (**Figure 3** dans Zhang et al., en cours). L'association de Ski3 aux ribosomes ne dépend donc pas de Ska1.

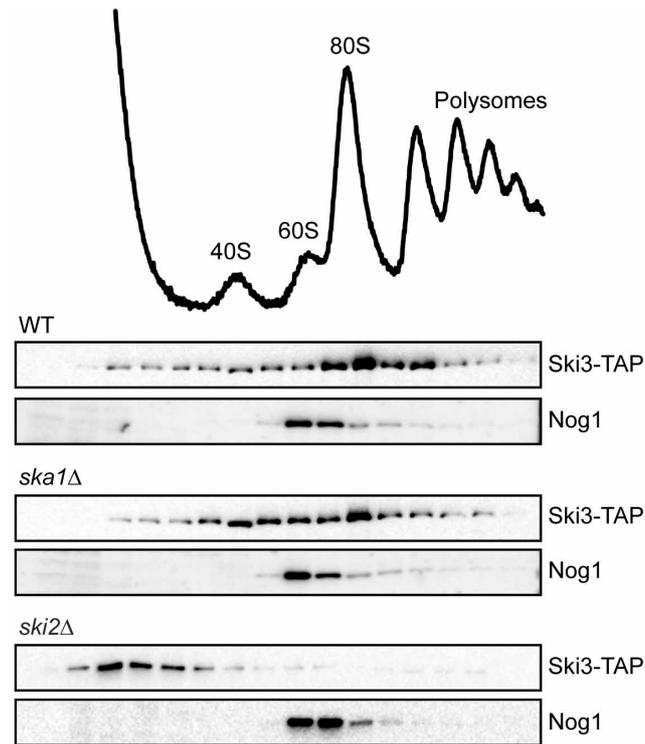


Figure 3. L'assemblage du complexe SKI ne nécessite pas la présence de Ska1.

Les extraits cellulaires des cultures de Ski3-TAP dans un contexte sauvage, *ska1Δ* et *ski2Δ* ont été séparés dans un gradient de sucrose (10 à 50%). Les fractions obtenues sont déposées dans un gel de polyacrylamide 10% puis transféré sur une membrane de nitrocellulose par Western Blot. Ski3-TAP a été révélé avec un anticorps PAP. Un anticorps anti-Nog1 a été utilisé pour révéler les pics contenant la particule 60S.

Alors que dans une souche n'exprimant pas *SKI2* ou *SKI8*, la sédimentation de Ski3-TAP est décalée dans les fractions légères non-ribosomales (**Figures 3 et S2** dans Zhang et al., en cours). De la même façon, la sédimentation de Ski8-TAP s'effectue dans les fractions légères non-ribosomales du gradient lorsque *SKI3* est délétée (**Figure S2** dans Zhang et al., en cours). Ces observations sont en adéquation avec les résultats de cryo-microscopie électronique montrant une liaison de Ski2 avec la particule 40S puis l'association de Ski3 avec les protéines Ski2 et Ski8 (Schmidt et al., 2016).

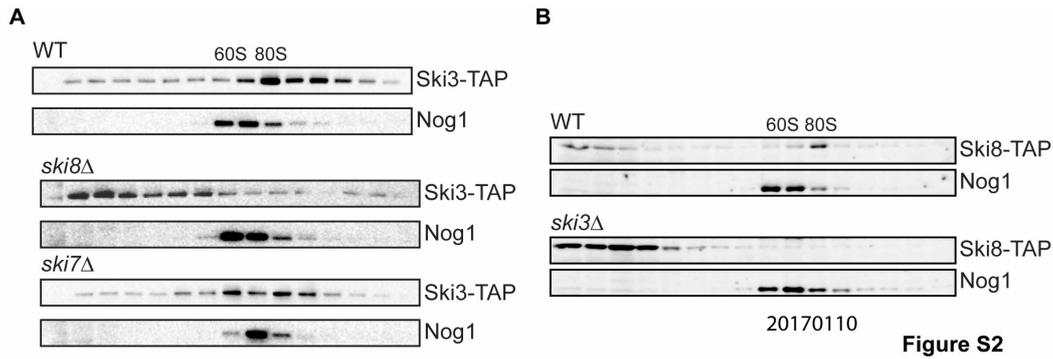


Figure S2. Le complexe SKI dans son intégralité est nécessaire pour son assemblage sur les ribosomes.

Les extraits cellulaires des cultures de Ski3-TAP et Ski8-TAP dans un contexte sauvage, *ska3Δ*, *ski7Δ* ou *ski8Δ* ont été séparés dans un gradient de sucrose (10 à 50%). Les fractions obtenues sont déposées dans un gel de polyacrylamide 10% puis transféré sur une membrane de nitrocellulose par Western Blot. Ski3-TAP et Ski8-TAP ont été révélés avec un anticorps PAP. Un anticorps anti-Nog1 a été utilisé pour révéler les pics contenant la particule 60S.

L'ensemble de ces résultats montre que l'association du complexe SKI avec le ribosome ne nécessite pas la présence de Ska1.

III. 3. L'association de Ska1 avec les ribosomes est dépendante de l'ARN.

Les purifications d'affinité ont montré une association de Ska1 avec les ribosomes. Pour vérifier cette association, les extraits protéiques d'une souche Ska1-TAP ont été séparés dans un gradient de sucrose puis fractionnés. Les fractions analysées par Western Blot montrent que Ska1-TAP sédimente dans les fractions contenant les ribosomes 80S mais également avec les fractions contenant les sous-unités 40S et 60S ribosomales ainsi que dans les fractions polysomales (**Figure 4** dans Zhang et al., en cours). La même expérience effectuée en parallèle avec une souche contenant la protéine Ski3-TAP a montré, comme précédemment, que Ski3-TAP sédimentait majoritairement dans les fractions contenant les ribosomes 80S mais également avec les fractions contenant les sous-unités 40S ainsi que dans les fractions polysomales (**Figure 4** dans Zhang et al., en cours). Par comparaison avec Ski3-TAP, on observe que la protéine Ska1-TAP, bien que présente dans le pic 80S, n'est pas majoritairement associée aux ribosomes 80S.

Dans le but de savoir si l'interaction de Ska1 avec les ribosomes est directe ou dépendante des ARN messagers, j'ai effectué un traitement à la RNase des extraits

cellulaires de Ska1-TAP, Ski3-TAP et du contrôle Pab1-TAP avant séparation dans le gradient de sucrose. La dégradation des ARN entraîne la disparition des polysomes, qui vont s'accumuler dans les fractions contenant les ribosomes 80S. Après le traitement RNase, Ski3-TAP est toujours associé aux ribosomes, comme montré précédemment (Schmidt et al., 2016). La liaison de Ski3 ne dépend donc pas de la présence d'ARN. Dans notre échantillon contrôle, Pab1-TAP qui sédimente dans toutes les fractions du gradient dans des conditions normales, s'accumule dans les fractions légères ne contenant pas de particules ribosomales après un traitement à la RNase (**Figure S3** dans Zhang et al., en cours). Ska1-TAP ne sédimente pas dans les mêmes fractions que Ski3-TAP après traitement à la RNase, elle sédimente plutôt dans les fractions contenant les particules 40S et 60S mais plus dans les fractions contenant le ribosome 80S (**Figure 4** dans Zhang et al., en cours). Ces résultats indiquent qu'après traitement à la RNase, Ska1 n'est pas libre, elle semble rester associée à un complexe mais pas avec les ribosomes. Ceci suggère que la proportion de Ska1 associé aux ribosomes 80S se fait par l'intermédiaire de l'ARN.

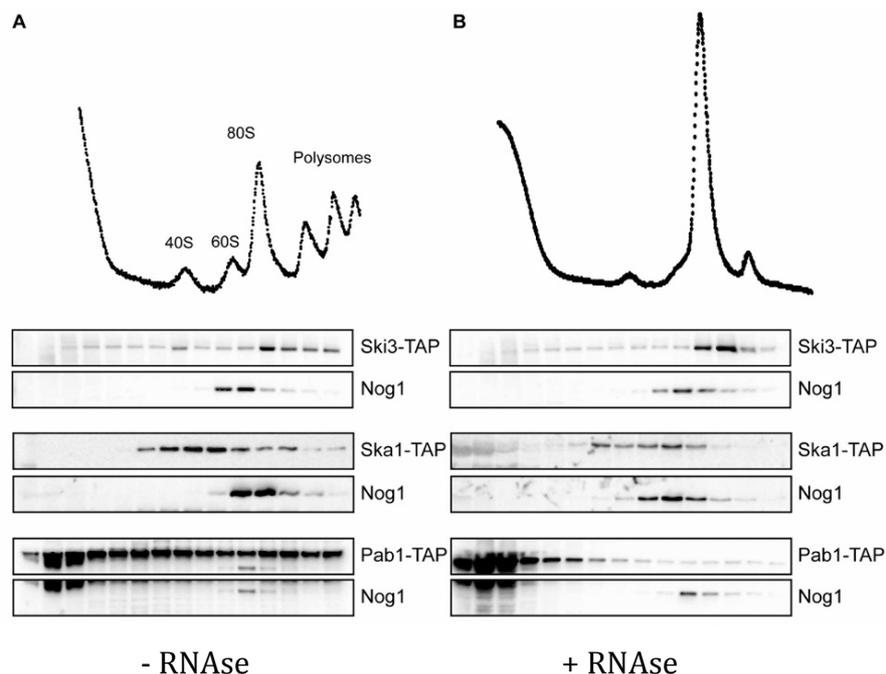


Figure 4. L'association de Ska1 aux ribosomes semble être ARN-dépendante. Les extraits cellulaires des cultures de Ski3-TAP et Ska1-TAP, traité ou non avec une RNase, ont été séparés dans un gradient de sucrose (10 à 50%). Les fractions obtenues sont déposées dans un gel de polyacrylamide 10% puis transféré sur une membrane de nitrocellulose par Western Blot. Ski3-TAP et Ska1-TAP ont été révélés avec un anticorps PAP. Un anticorps anti-Nog1 a été utilisé pour révéler les pics contenant la particule 60S.

Nous avons également testé si la liaison de Ska1 aux ribosomes nécessitait le complexe SKI. Les profils de sédimentation de souches WT, *ski2Δ* ou *ski3Δ* exprimant Ska1-TAP sont tous similaires (**Figure S3** dans Zhang et al., en cours), montrant donc que l'association de Ska1 aux ribosomes se fait indépendamment du complexe SKI.

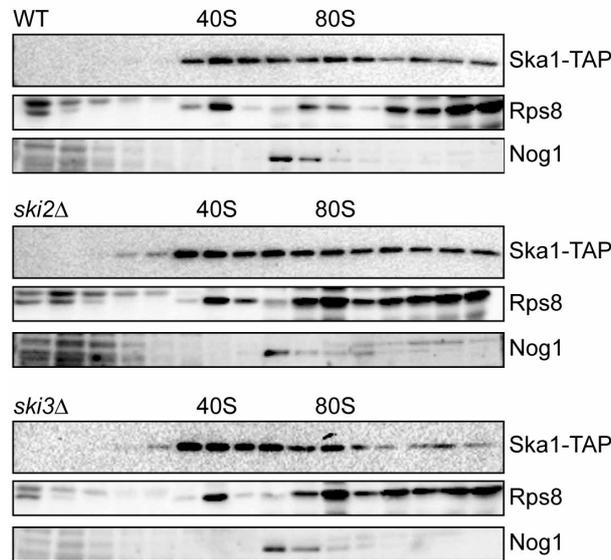


Figure S3. Le complexe SKI n'est pas nécessaire pour l'association de Ska1 sur les ribosomes.

Les extraits cellulaires des cultures de Ska1-TAP dans un contexte sauvage, *ski2Δ* et *ski3Δ* ont été séparés dans un gradient de sucrose (10 à 50%). Les fractions obtenues sont déposées dans un gel de polyacrylamide 10% puis transféré sur une membrane de nitrocellulose par Western Blot. Ska1-TAP a été révélé avec un anticorps PAP. Un anticorps anti-Nog1 a été utilisé pour révéler les pics contenant la particule 60S.

III. 4. Des intermédiaires de dégradation en 3'-UTR des ARN messagers sont accumulés en absence de Ska1.

Comme Ska1 est lié physiquement au complexe SKI, que celui-ci est impliqué dans la dégradation des ARN aberrants et canoniques avec l'exosome cytoplasmique, nous avons testé si Ska1 pouvait participer à l'une de ces voies de dégradation.

Nous avons d'abord testé l'implication de Ska1 dans la dégradation des ARN messagers NonStop. Nous avons utilisé deux gènes rapporteurs : (i) le TAP-NonStop décrit précédemment (**Partie 1**) et (ii) le GFP-Rz-HIS3 est un gène rapporteur contenant une séquence ribozyme qui va générer un ARN messager codant pour la GFP sans codon STOP, et contrairement au TAP-NonStop, sans queue poly(A). Deux gènes rapporteurs TAP-Stop contenant un codon STOP et GFP-HIS3 ne possédant pas de séquence ribozyme ont également été utilisés comme contrôles. Les souches WT, *ska1Δ* et *ski3Δ*

ont été transformées avec ces gènes rapporteurs puis leurs extraits protéiques ont été analysés par Western Blot. Avec les deux gènes rapporteurs TAP-NonStop utilisés, alors que la souche *ski3Δ* accumule fortement les peptides aberrants TAP-NonStop, les souches WT et *ska1Δ* n'en accumulent pas (**Figure S4** dans Zhang et al., en cours). Ces résultats montrent donc que Ska1 n'a pas de rôle dans la dégradation des ARN messagers aberrants.

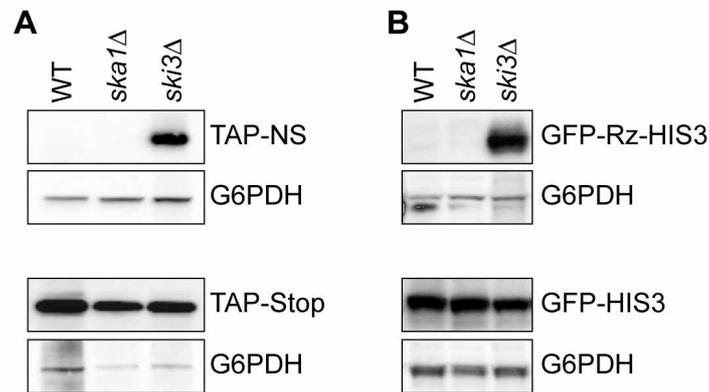


Figure S4. Ska1 n'est pas nécessaire pour la dégradation des ARN messagers et peptides aberrants NonStop.

Des extraits protéiques de souches WT, *ska1Δ* et *ski3Δ* transformées avec les gènes rapporteurs (A) TAP-NonStop et TAP-Stop, (B) GFP-Rz-HIS3 et GFP-HIS3, ont été séparés sur gel de polyacrylamide 10% puis transférés sur membrane de nitrocellulose par Western Blot. La protéine A (A) et la GFP (B) ont été révélés avec un anticorps PAP et un anti-GFP respectivement. Le contrôle de charge a été révélé avec un anticorps anti-G6PDH.

Pour tester la dégradation générale des ARN messagers, nous avons utilisé deux gènes rapporteurs exprimant un transcrit stable *PGK1pG* et un transcrit instable *MFA2pG* sous contrôle du promoteur *GAL1* (Anderson and Parker, 1998). Les souches WT, *ska1Δ*, *ski2Δ* et *ski7Δ* ont été transformées avec ces gènes rapporteurs et cultivées dans un milieu YPGal. De plus, ces gènes rapporteurs comprennent une séquence polyG après le codon STOP qui bloque la dégradation à partir de l'extrémité 5' par l'exonucléase Xrn1 et qui permet la détection d'intermédiaires de dégradation de fragments en 3'-UTR grâce à une sonde polyC complémentaire (**Figure 5A** dans Zhang et al., en cours). L'analyse des ARN messagers de *PGK1pG* dans toutes les souches montre, comme attendu, le transcrit entier et le fragment 3' de 170 nucléotides accumulé grâce au blocage de la dégradation par Xrn1. De façon intéressante, dans les souches *ska1Δ*, *ski2Δ* et *ski7Δ* mais pas dans la souche WT, un deuxième fragment plus petit non caractérisé a pu être observé (**Figure 5B** dans Zhang et al., en cours). En revanche, avec

le gène rapporteur *MFA2pG*, cet intermédiaire supplémentaire n'est pas détectable (**données non présentées**). Ceci pouvant être dû à la stabilité de l'ARN messager ou à des propriétés intrinsèques du transcrit comme la séquence ou la structure. L'ensemble de ces résultats montre que Ska1 est impliqué, comme le complexe SKI, dans la dégradation générale des ARN messagers à partir des régions 3'-UTR normalement dépourvu de ribosomes.

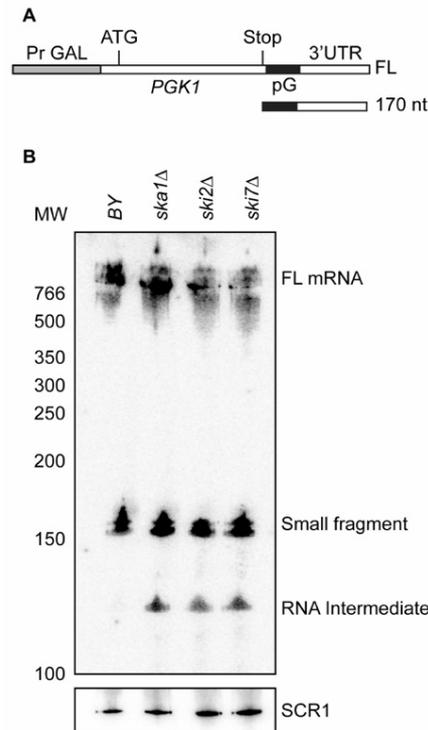


Figure 5. Ska1 est impliqué dans la dégradation 3'-5' des ARN messagers. (A) Représentation schématique du gène rapporteur *PGK1*. (B) Des extraits d'ARN à partir des souches BY, *ska1Δ*, *ski2Δ* et *ski7Δ* transformées préalablement avec le gène rapporteur *PGK1* ont été séparés sur gel de urée-polyacrylamide 6% puis transféré sur membrane par Northern Blot. Les ARN de *PGK1* ont été révélés grâce à une sonde poly-G radioactive [³²P]. Le contrôle de charge a été révélée grâce à la sonde de *SCR1*.

Si Ska1 est impliqué dans la dégradation des ARN messagers à partir de l'extrémité 3', l'absence de Ska1 combinée avec la délétion de gènes impliqués dans la dégradation du 5' vers le 3' des ARN messagers devrait être délétère pour la cellule. *DCP2* étant un gène essentiel, sa délétion affecte gravement la croissance de la cellule, nous avons donc utilisé une souche exprimant *DCP2* associé à un degron, la présence d'auxine dans le milieu de culture dégradant la protéine Dcp2 dans les cellules. Nous avons donc combinée la mutation de *DCP2* avec la délétion de *SKA1* et de *SKI2* pour tester leur croissance sur un milieu YPGlu contenant de l'auxine. Nous observons que la

croissance des souches simple-mutantes *ska1Δ* et *ski2Δ* ne sont pas sensibles à l'auxine contrairement à la souche *dcp2-degroun* dont la croissance est ralentie. Les souches double-mutantes, *dcp2-degroun/ska1Δ* et *dcp2-degroun/ski2Δ*, sont très fortement affectées en présence d'auxine (**Figure 6** dans Zhang et al., en cours). Il existe donc un lien fonctionnel de type létalité synthétique entre *DCP2* et *SKI2* déjà observé auparavant (Anderson and Parker, 1998) et également entre *DCP2* et *SKA1* bien que ce dernier soit moins fort.

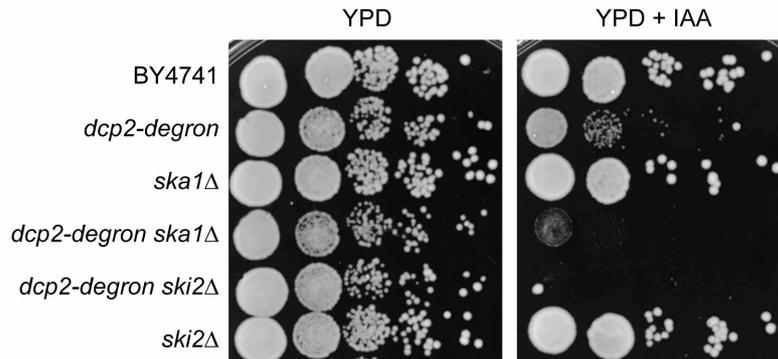


Figure 6. *ska1Δ* est synthétique létal avec le mutant *dcp2-degroun*.

Des dilutions en série de cultures de souches BY4741, *dcp2-degroun*, *ska1Δ*, *ski2Δ*, *dcp2-degroun/ska1Δ* et *dcp2-degroun/ski2Δ* ont été déposées sur YPGlu et YPGlu+IAA. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours.

III. 5. Les cibles de Ska1

Pour identifier les ARN ciblés par Ska1, j'ai effectué une expérience de RIP-Seq. J'ai immunoprécipité les ARN associés à Ska1 et à Ski3, que j'ai comparé avec les ARN associés à Rpl16a. Les banques ont été construites avec le kit Truseq mRNA stranded d'Illumina après une étape d'élimination des ARN ribosomiques avec le kit Illumina Ribozéro. Les ARN messagers les plus enrichis avec Ska1 sont ceux de *SKA1* et *SKI3* alors que les ARN messagers les plus enrichis avec Ski3 sont ceux de *SKA1* et *SKI7*. De plus, les ARN messagers de *SKI2* sont également légèrement enrichis dans les deux expériences de RIP avec Ska1 et Ski3 (**Figure 7** dans Zhang et al., en cours). Ces résultats suggèrent que Ska1 et les composants du complexe SKI pourraient interagir ensemble de façon co-translationnelle avec une interaction préférentielle entre Ska1 et Ski3. Des études similaires avec d'autres facteurs protéiques avaient décrits un tel assemblage co-translationnel de complexes chez les procaryotes et chez les eucaryotes (Wells et al., 2015; Natan et al., 2017). En revanche, ces expériences de RIP-seq ne nous ont pas

permis de sélectionner des cibles spécifiques associées à Ska1 ou à Ski3 (**Figure 7** dans Zhang et al., en cours).

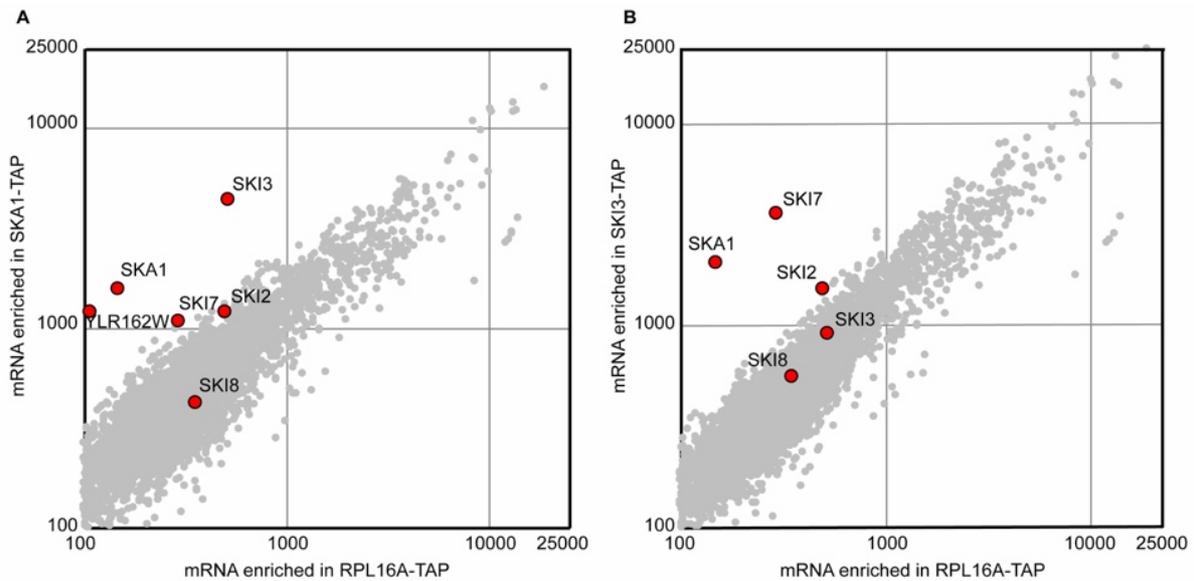


Figure 7. Les ARN messagers de SKA1 sont spécifiquement enrichis avec SKI3-TAP et inversement.

(A) Les ARN associés à Ska1-TAP sont comparés avec ceux associés à Rpl16a. (B) Les ARN associés à Ski3-TAP sont comparés avec ceux associés à Rpl16a.

Puisque nous avons observé des intermédiaires de dégradation en 3' s'accumulant en absence de *SKA1* ou de *SKI2* avec le gène rapporteur *PGK1pG* (**Figure 5** dans Zhang et al., en cours), nous voulions les identifier à l'échelle du génome. Pour analyser des effets sur l'efficacité de la voie de dégradation des ARN de l'extrémité 3' vers 5', il est nécessaire d'inhiber la voie majeure de dégradation des ARN du 5' vers 3'. Pour cela, nous avons utilisé le mutant *dcp2-degtron*, décrit précédemment (**Partie 4. 1**). Nous avons combiné la mutation de *dcp2-degtron* avec la délétion de *SKA1* ou *SKI2* et nous avons comparé les séquences 3' accumulées dans ces souches par rapport à une souche WT et une souche simple-mutante *dcp2-degtron*. J'ai construit des banques de 3' avec un kit Lexogen Teloprime, qui est utilisé en routine pour amplifier les séquences d'ADN complémentaires obtenues à partir de la queue poly(A) des ARN messagers. De plus, puisque la dégradation des ARN de l'extrémité 3' vers 5' s'effectue après une étape de déadénylation, les intermédiaires de dégradation résultant devraient être dépourvus de leur queue poly(A), ainsi, j'ai ajouté une étape de polyadénylation *in vitro* en utilisant une PolyA polymérase.

La figure 8 montre deux exemples de transcrits codants et non codants. On observe une accumulation d'intermédiaires de dégradation dans la région 3'-UTR aussi bien en

absence de Ski3 que de Ska1. En revanche, on observe une accumulation d'intermédiaires de dégradation dans la région codante des ORF en absence de Ski3 mais pas en absence de Ska1 (**Figure 8A** dans Zhang et al., en cours). Ceci indique que Ska1 pourrait être important pour la dégradation de la région 3'-UTR mais pas pour la région traduite. Par ailleurs, la **figure 8B** dans Zhang et al., en cours montre deux exemples d'accumulation d'intermédiaires de dégradation d'ARN non-codants cytoplasmiques, les XUT et les SUT en absence de Ski3 ou de Ska1 lorsque la voie de dégradation de 5' vers 3' est affectée. De plus, le fait que Ska1 ne soit pas nécessaire pour la voie de surveillance NSD contrairement au complexe SKI permet d'appuyer l'hypothèse que le complexe SKI associé à Ska1 cible spécifiquement les séquences dépourvues de ribosomes.

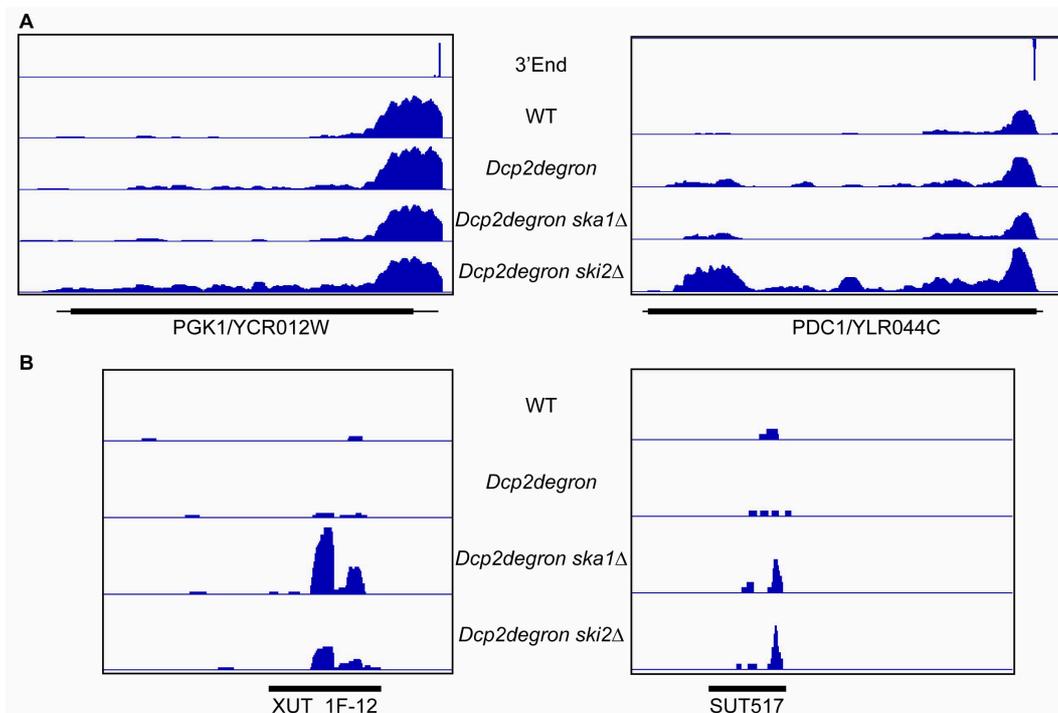


Figure 8. Ska1 est nécessaire, avec le complexe SKI, pour dégrader les séquences ARN cytoplasmiques dépourvues de ribosomes.

Des bibliothèques génomiques ont été construites à partir d'extraits d'ARN des souches WT, dcp2-degron, dcp2-degron/ski3Δ et dcp2-degron/ska1Δ avec le kit Lexogen Teloprime. Elles ont été séquencées puis analysées comme décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ». (A) Graphes représentant l'accumulation des intermédiaires d'ARN messagers dans les différentes souches lorsque la dégradation 5'-3' est affectée. (B) Graphes représentant l'accumulation d'ARN non-codants dans les différentes souches lorsque la dégradation 5'-3' est affectée.

III. 6. Modèle proposé et conclusion.

Ces résultats suggèrent que le complexe SKI peut exister sous deux formes : l'une associée avec le ribosome et l'autre associée à Ska1. Ceci nous a permis de construire un modèle selon lequel, pendant la dégradation générale des ARN messagers à partir de l'extrémité 3', dans un premier temps, Ska1 est associé au complexe SKI au niveau des séquences 3'-UTR dépourvues de ribosomes puis lorsque le complexe SKI/Ska1 atteint une région codante et rencontre un ribosome, Ska1 quitterait le complexe, ce qui permettrait au complexe SKI de s'associer avec le ribosome en cours de traduction (**Figure 9** dans Zhang et al., en cours).

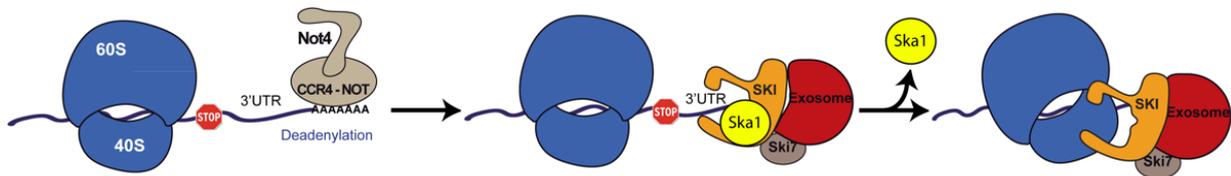


Figure 9. Modèle représentant le complexe SKI associé ou non au ribosome.

Dans un premier temps, le complexe SKI, associé à Ska1, dégrade le 3'-UTR des ARN indépendamment du ribosome. Dans un second temps, lorsque le complexe SKI-Ska1 atteint la séquence codante et rencontre un ribosome, Ska1 quitte le complexe et le ribosome prend sa place pour poursuivre la dégradation.

Selon ce modèle, si Ska1 est une protéine en compétition avec le ribosome pour son association au complexe SKI, la surexpression de *SKA1* pourrait permettre d'inverser la balance. En effet, Ska1 s'associerait avec le complexe SKI, ce dernier sera alors moins disponible pour interagir avec le ribosome, ce qui devrait affecter la voie de dégradation NSD qui s'effectue de façon co-translationnelle. Nous avons donc testé les effets de la surexpression de *SKA1*, d'une part au niveau de la croissance cellulaire et d'autre part, au niveau de l'expression d'un gène rapporteur TAP-NonStop.

J'ai transformé les souches WT, *ski2Δ* et *ska1Δ* avec un plasmide pCM190 vide et un plasmide pCM190-*SKA1* et j'ai testé la croissance de ces différentes souches sur un milieu -URA et sur un milieu -URA contenant de l'hygromycine B. La surexpression de *SKA1* n'affecte pas la croissance cellulaire de la souche WT sur un milieu -URA alors qu'en présence d'hygromycine B elle est légèrement affectée (**Figure 10A** dans Zhang et al., en cours). Ces souches surexprimant *SKA1* ont également été transformées avec le gène rapporteur exprimant la protéine aberrante TAP-NonStop. Les souches WT et

ska1Δ comportant le plasmide vide n'accumulent pas de TAP-NonStop, alors que la souche *ski2Δ* en accumule. De façon intéressante, lorsque *SKA1* est surexprimé, les protéines aberrantes TAP-NonStop s'accumulent dans les souches WT et *ska1Δ*, et nous observons une accumulation plus importante dans la souche *ski2Δ* (Figure 10B dans Zhang et al., en cours). Ska1 aurait donc un rôle antagoniste avec la formation du complexe SKI-ribosome qui est impliqué dans la voie de surveillance NSD.

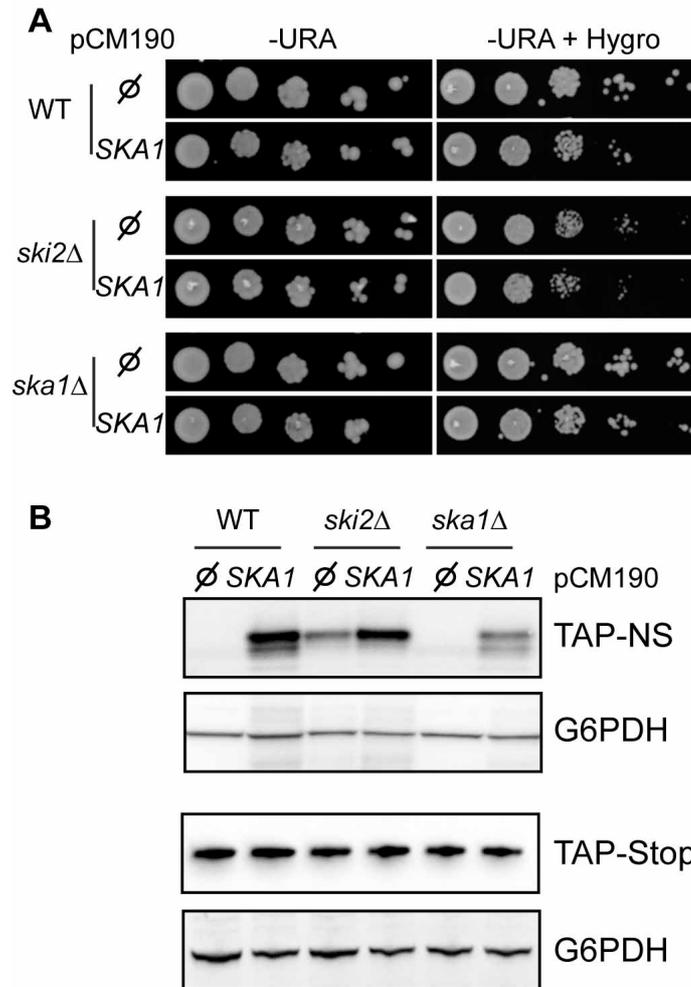


Figure 10. La surexpression de SKA1 affecte la voie de dégradation NSD.

(A) Des dilutions en série de cultures de WT, *ski2Δ*, *ska1Δ*, transformées préalablement avec le pCM190 ou pCM190-Ska1, ont été déposées sur un milieu Magic Medium -URA avec ou sans hygromycine B. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 2 jours. (B) Les extraits protéiques totaux des mêmes souches ont été séparés sur gel de polyacrylamide 10% et transférés sur membrane par Western Blot. La protéine A a été révélée par l'anticorps PAP. Le contrôle de charge a été révélé par un anticorps anti-G6PDH.

Résultats

L'ensemble de ces résultats nous a permis de proposer un modèle qui lève le paradoxe initial et permet de comprendre comment le complexe SKI, aidé de Ska1, est impliqué dans une première étape de dégradation des régions dépourvues de ribosomes.

Une analyse de cryo-microscopie électronique réalisée par le laboratoire de Roland Beckmann est en cours afin de valider ce modèle.

A new SKI subcomplex involved in ribosome-free transcript degradation

Elodie Zhang^{‡1}, Varun Khanna[‡], Abdelkader Namane[‡], Antonia Doyen[‡], Bernard Turcotte[§], Alain Jacquier[‡] et Micheline Fromont-Racine[‡]

[‡]Institut Pasteur, Génétique des Interactions Macromoléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 3525, F-75724 Paris, France

[§]McGill University Health Centre, Department of Medicine, 1001 Décarie Boulevard, Montréal, Québec, Canada H4A 3J1

¹Sorbonne Universités, UPMC Paris 6, Complexité Du Vivant, 75252 Paris Cedex 05, France

running title: *ribosome-free transcript degradation*

keywords: RNA degradation, SKI complex, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

RNA turnover has been shown to occur co-translationally, mainly by the Xrn1-dependent 5' to 3' degradation pathway. But it also involves, although to a lesser extent, the exosome/SKI-dependent 3' to 5' pathway. We recently showed that the SKI complex directly interacts with ribosomes and that this interaction takes place during the general 3' to 5' mRNA degradation pathway. This seems paradoxical because the SKI complex was previously shown to be required for the efficient degradation of mRNA 3'UTRs, mainly devoid of ribosomes. Here we characterized a new SKI-Ska1-subcomplex involved in the degradation of the ribosomes-free RNA 3'UTRs and cytoplasmic lncRNAs such as XUTs and SUTs. We propose a model in which the SKI complex acts in two steps. It first associates with Ska1 to participate to the degradation of the RNA-3'UTR. When the complex reaches the coding sequence, Ska1 is exchanged for the ribosome to continue the degradation process.

Introduction

Cellular mRNAs are subjected to a balance between synthesis, stability and degradation, which determines the shape of the transcriptome and greatly participates to protein homeostasis. Moreover, regulatory mechanisms trigger degradation depending of external stimuli. In addition to the general degradation pathway, which ensures the turnover of each mRNA, a number of quality control mechanisms target aberrant RNAs for degradation.

The general cytoplasmic mRNA degradation involves two mechanisms: a 5' to 3' degradation pathway, mediated by the exonuclease Xrn1 and a 3' to 5' degradation pathway, which involves the exosome. The shortening of the 3' poly(A) tail is the first step required before both degradation pathways (**for review Parker, 2012; Fromont-Racine and Saveanu, 2014**). The 5' to 3' mRNA degradation pathway is the most rapid (**Cao and Parker, 2001**) and the major mechanism. After deadenylation, the mRNA is decapped by Dcp1/Dcp2 (**Dunckley and Parker, 1999; van Dijk et al., 2002**) with the help of several enhancers of decapping such as Edc1, Edc2 (**Dunckley et al., 2001**), Edc3 (**Badis et al., 2004**), Dhh1 (**Coller et al., 2001**), Pat1 (**Bonnerot et al., 2000**), Scd6 (**Decourty et al., 2008**) and the Lsm complex (**Tharun and Parker, 2001**) and is finally

degraded by Xrn1, the 5' to 3' exonuclease (**Larimer et al., 1992**). This process is co-translational (**Hu et al., 2009; Pelechano et al., 2015**).

The 3' to 5' mRNAs degradation pathway involves the cytoplasmic exosome, assisted by its co-factor, the SKI complex. The exosome is composed of ten main factors. Among them, only one, Dis3, is catalytically active. Depending of its localization, the exosome is assisted by different co-factors to be efficient. In the nucleus, the exosome requires the presence of the distributive exoribonuclease Rrp6 as well as, Mpp6, rp1/Rrp47 and the RNA helicase Mtr4 within the TRAMP complex (Trf4/5, Air1/2, Mtr4) (**de la Cruz et al., 1998; Mitchell et al., 2003; Milligan et al., 2008**). In the cytoplasm, the exosome requires the presence of the SKI complex, composed of Ski2 (SKIV2L in human), Ski3 (TTC37 in human) and Ski8 (WDR61 in human). Ski2 is a RNA helicase which shares a similar structure as Mtr4. Ski8 contains WD40 repeats and Ski3 is a TPR containing protein, which forms the scaffold of the SKI complex (**Halbach et al., 2013**). Ski2 is required for the unwinding of the RNA substrates and to remove proteins, which could be present on the RNA substrates. Ski3 and Ski8 contribute to the structure and activity of the SKI complex (**Halbach et al., 2013**). Historically, the primary indications of the existence of the Ski factors were dated 40 years ago from yeast analyses (**Toh-E et al., 1978**). They were

revealed by a genetic screen performed with a yeast strain containing linear double-stranded RNA encapsulated into virus-like particles, which secrete a protein toxin. Mutants generating a super killer phenotype were isolated and called *ski* (for super killer) (Toh-E *et al.*, 1978). Therefore, the first function for the *SKI* genes was to be involved in antiviral defenses by its role in viral RNA degradation (Widner and Wickner, 1993). Twenty years later, Roy Parker's team showed that these genes are required for the 3' to 5' mRNA degradation (Anderson and Parker, 1998), and Arlen Johnson's team demonstrated that these factors exist as a complex *in vivo* (Brown *et al.*, 2000). Native mass spectrometry analyses revealed that the yeast SKI complex is a heterotetramer formed of one copy of Ski2, one copy of Ski3 and two copies of Ski8 (Synowsky and Heck, 2008). Ski7 is not part of the SKI complex but is also involved in mRNA degradation (van Hoof *et al.*, 2000). It makes a bridge between the SKI complex and the exosome (Araki *et al.*, 2001). Interestingly, Ski7 shares the same surface features of the exosome as the nuclear exosome factor Rrp6 (Kowalinski *et al.*, 2016). Ski7 is not conserved throughout evolution but only present in a subset of fungi. Recently, structural data showed that the SKI complex forms a path for the RNA through a central channel. RNase protection assays performed with a mixture of the exosome and the SKI complex revealed protected fragments of a size compatible with a continuous channel formed by the SKI and exosome complexes. It was proposed that the SKI complex directly delivers single-stranded RNA into the exosome (Halbach *et al.*, 2013). Altogether, these results allowed the authors to propose a model in which, in the cytoplasm, the exosome and the SKI complex could be structurally organized, to degrade the RNA molecules, as the proteasome to degrades peptides (Halbach *et al.*, 2013). In addition to its involvement in the general mRNA degradation pathway, it is well established that the SKI complex is also required for the aberrant mRNA degradation related to the Non-Stop mRNA decay (NSD), the No-Go mRNA decay (NGD) and the Non-sense mediated mRNA decay (NMD) in yeast as well as in metazoan (Frischmeyer, 2002; van Hoof *et al.*, 2002; Mitchell and Tollervey, 2003; Doma and Parker, 2006). Recently, biochemical analyses and cryo-electromicroscopy revealed that the SKI complex associates to the ribosome translating aberrant as well as conform mRNAs by a direct interaction with the 40S subunit molecule (Schmidt *et al.*, 2016). The SKI complex was also shown to have a preference for the ribosome containing a 3' overhang mRNA molecule (Schmidt *et al.*, 2016). These data are consistent with the 3' to 5' mRNA degradation pathway being cotranslational, as is the major 5' to 3' mRNA pathway.

Yet, the SKI-exosome complex is also able to degrade the 3'-UTR of the mRNAs, which are

essentially devoid of ribosomes. This shows that the SKI complex can act as a cytoplasmic exosome cofactor independently of its association with ribosomes. In an attempt to overcome this paradox, we further analyzed the mechanism of action of the SKI complex.

Here, we identified a new component, encoded by *YKL023W*, which is associated to a subpopulation of the SKI complexes and that we called Skal for Ski-Associated component one. We demonstrated that this factor is not involved in the aberrant mRNA degradation pathway but in the general RNA degradation pathway and more precisely in the degradation of RNA regions devoid of ribosomes. Altogether these results reveal the existence of a SKI-Skal subcomplex required for the degradation of the mRNA 3'-UTR regions and of cytoplasmic long non-coding RNAs (lncRNAs), which are substrates for the NMD surveillance pathway. In contrast, Skal is not required for the efficient degradation of translated mRNA regions nor for the elimination of aberrant transcripts such as non-stop mRNAs.

Results

Skal, a novel factor associated to a subpopulation of the SKI complex

In order to further explore the mRNA degradation pathways and to investigate the mechanism of action of the SKI complex, we first performed an affinity purification using Ski3-TAP as bait. The factors associated with Ski3-TAP were both separated on a polyacrylamide gel (Fig. 1.A) and identified by mass spectrometry (LC-MS/MS). Statistical analysis of label-free quantitative MS data, represented on a volcano-plot, showed a significant enrichment of three groups of proteins associated with Ski3 (Fig. 1.B). As expected, the most enriched protein group, when compared to the control purification from an untagged BY4741 strain, was composed of Ski2 and Ski8, the two other components of the SKI complex, in addition to the Ski3 bait. A second group of enriched proteins was composed of the six RNasePH domain proteins of the exosome, Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp45, Rrp46 and Mtr3, of Dis3 the catalytic subunit, and of the three RNA-binding subunits Rrp4, Rrp40 and Csl4, all of them related to the exosome (in yellow). In this group, we also identified Ski7 and a novel factor of unknown function, Ykl023w that we called Skal for Ski-Associated component 1 (Fig. 1.B). The third group of proteins was related to the ribosome with a weak enrichment of the small subunit compared to the large one. The 5' to 3' exonuclease Xrn1 was also present in this group.

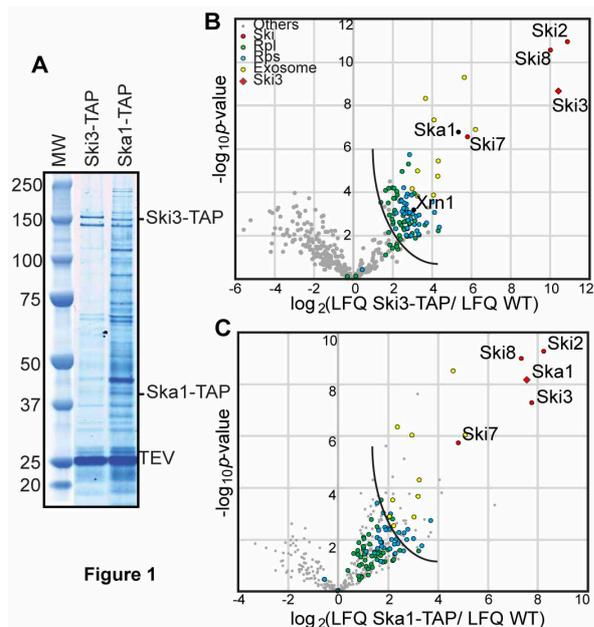


Figure 1 *Ska1* is associated to the SKI complex (A) Affinity purification using *Ska1*-TAP, *Ski3*-TAP, as bait and the BY4741 strain as control. The components of the TEV eluates were separated on an acrylamide gel. (B) The volcano-plot *Ski3*-TAP shows the fold change between the *Ski3*-TAP complex and the BY4741 (\log_2 LFQ cpx/LFQ ref.) on the x axis and the P-value distribution ($-\log_{10}$ P value) on the y axis for all the identified proteins represented by a circle (in red, the SKI complex; in yellow, the exosome; in blue, the RPSs; in green, the RPLs). The diamond indicates the bait used for the affinity purification. (C) Volcano-plot *Ska1*-TAP as in (B).

We therefore identified a new component, *Ska1*, associated to the SKI complex, which is enriched at a similar level as the exosome, suggesting that *Ska1* could be preferentially link to the SKI complex and/or to the exosome. To confirm the physical interaction between *Ska1* and the SKI complex, we performed an affinity purification using *Ska1*-TAP strain in the same conditions of purification as for *Ski3*-TAP (**Fig. 1.C**). We tested the functionality of the TAP fusion by combination of the *Ski3*-TAP or *Ska1*-TAP with a *Dcp2*-degron mutant (see below). In contrast to *Ski3*-TAP, we observed that *Ska1*-TAP was only partially functional in this assay, suggesting that the complex associated to *Ska1*-TAP could be biased (**Fig. S1**).

Nevertheless, statistical analysis of label-free quantitative MS data followed by a volcano-plot representation revealed that the complex associated to *Ska1* was highly similar to the SKI complex purification. We again observed the three comparable groups of proteins. The most enriched proteins compared to the BY4741 were *Ski2*, *Ski3* and *Ski8*, which were recovered at stoichiometric levels with the *Ska1*-TAP bait. The second group of proteins associated to *Ska1*-TAP was related to the exosome, *Xrn1* and *Ski7*. The enrichment of the third group of proteins related to the ribosome was less important than for the *Ski3*-TAP purification. Using a compilation of proteomic data, from Mathias Mann's lab, we looked at the relative abundance of

endogenous proteins from a wild type strain (Nagaraj *et al.*, 2012). The comparison of the abundance of 4077 yeast proteins revealed that *Ska1* was expressed to a lower level compared to the SKI and exosome complexes components (**Fig. 2**).

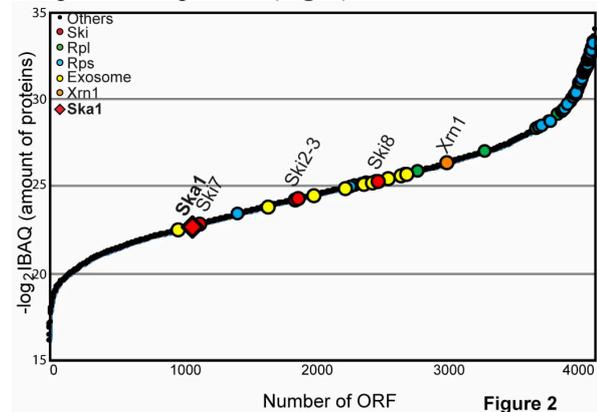


Figure 2 Relative protein abundance in *Saccharomyces cerevisiae* Each circle represents an identified protein (in red, the SKI complex; in yellow, the exosome; in blue, the RPSs; in green, the RPLs). The red diamond indicates the *Ska1* abundance. The relative amount of each proteins was estimated according to the sum of the peptide intensities. The data came from Nagaraj *et al.*,

These results suggested that most of the molecules of *Ska1* could be associated to the SKI complex whereas, inversely, all the SKI complexes were not associated to *Ska1*. This indicated that *Ska1* was part of a SKI subcomplex.

Ska1 is not required for the SKI complex assembly

The specific association of *Ska1* with the SKI complex prompted us to determine whether *Ska1* could be involved in the SKI complex assembly. We fractionated cellular extracts from *Ski3*-TAP strain on a sucrose gradient and we compared the sedimentation profile of *Ski3*-TAP in the presence or in the absence of *Ska1*. The analysis of the fractions by western blot revealed that *Ski3*-TAP mainly co-sediments with the 80S peak as described before (**Fig. 3**) (Schmidt *et al.*, 2016). In the absence of *Ska1*, the sedimentation profile of *Ski3*-TAP was unchanged. In contrast, the absence of *Ski2* or *Ski8* but not *Ski7* led to a sedimentation of *Ski3*-TAP in the light fractions (**Fig. 3 & Fig. S2A**). Similarly, the absence of *Ski3* led to a sedimentation of *Ski8*-TAP in the light fractions (**Fig. S2B**). This was in agreement with recent cryo-EM data showing that *Ski2* directly binds to the 40S and that *Ski3*, in turn, binds to *Ski2* and *Ski8* (Schmidt *et al.*, 2016).

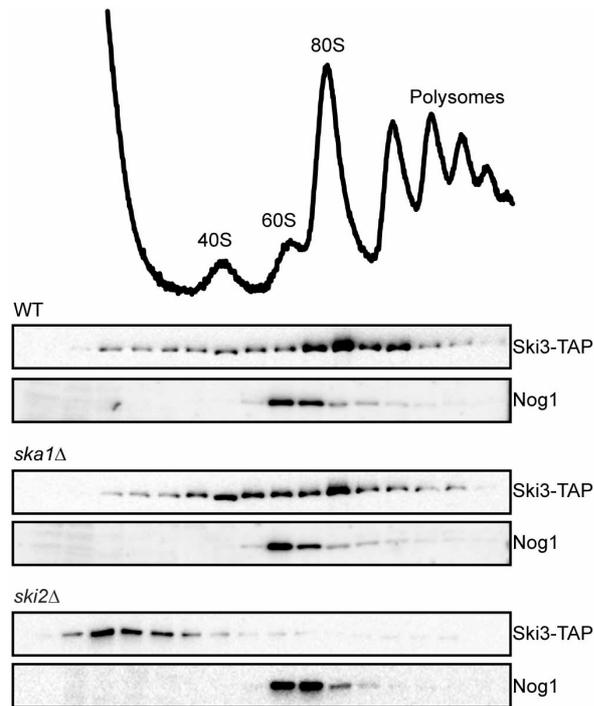


Figure 3

Fig. 3 The SKI complex assembly does not require Ska1 Total cellular extracts from cells expressing Ski3-TAP in wild type or in *ska1Δ* or *ski2Δ* strains were separated on a sucrose gradient (10-50%) by ultracentrifugation. Fractions of 500 μ l were collected and the proteins of each fraction were TCA-precipitated and analysed by Western blot using PAP for the detection of the TAP fusion protein and antibodies directed against Rps8 to mark the 40S subunit, the 80S and the polysomes fractions and Nog1 to mark the 60S fractions.

These results showed that the SKI complex assembly and its association to the ribosome did not require the presence of Ska1.

Ska1 association to the ribosome is RNA dependent

Affinity purification also showed that Ska1 was associated with the ribosome, yet to a lesser extent compared to Ski3 (**Fig. 1.B & 1.C**). To verify this association, we fractionated cellular extracts from the Ska1-TAP strain on a sucrose gradient. The analysis of the fractions by western blot revealed that Ska1-TAP co-sediments with the 80S peak, with the light polysomal fractions and with lighter fractions, in a region of the gradient were the 40S and 60S subunits sediment (**Fig. 4.A**). A similar experiment, performed with the Ski3-TAP strain for comparison, showed a greater enrichment of Ski3 in the 80S peak as previously described (**Fig. 4.A**) (**Schmidt et al., 2016**). These observations were in agreement with the results of affinity purification showing a stronger association of Ski3-TAP than Ska1-TAP to the ribosome. In order to determine whether the weak association of Ska1 to the ribosome was direct or mRNA-mediated, we performed a RNase treatment of the cellular extract of Ska1-TAP and Ski3-TAP, and Pab1-TAP strains before their fractionation on a

sucrose gradient (**Fig. 4.B**). As expected, the mRNA degradation led to the disappearance of the polysomes and to the accumulation of 80S monosomes. After RNase treatment, Ski3-TAP was still associated to the ribosome, as previously shown (**Schmidt et al., 2016**), whereas Pab1-TAP, which was usually distributed all along the sucrose gradient, sedimented in the light fractions as free proteins. In contrast, Ska1-TAP showed a sedimentation profile different from Ski3-TAP and Pab1-TAP. We observed an enrichment of Ska1 in the fractions mainly co-sedimenting with the 40S and 60S subunits but not with the 80S (**Fig. 4.B**).

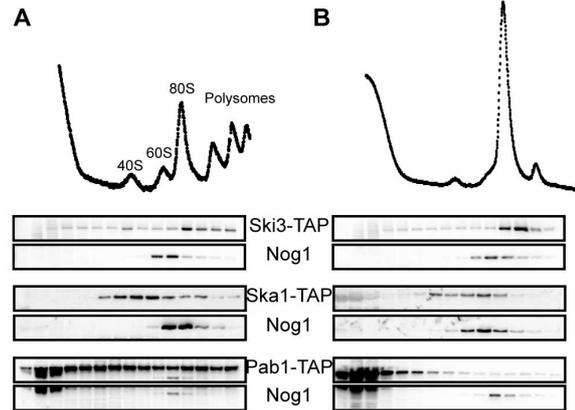


Figure 4

Fig. 4 Ska1 association to the ribosome is RNA-dependent (A) Total cellular extracts from cells expressing either Ski3-TAP or Ska1-TAP or Pab1-TAP were treated as in Fig. 3. (B) Total cellular extracts were treated with RNase before loading on the sucrose gradient.

These results indicated that, after RNase treatment, Ska1 was not free and still associated to a complex but not with the ribosome, suggesting that the weak Ska1-TAP association to the ribosome was RNA-dependent.

We also tested whether the SKI complex was required for the RNA-dependent association of Ska1 to the ribosome. We observed that the absence of Ski2 or Ski3 has no effect on the sedimentation profile of Ska1-TAP suggesting that the Ska1 association to the ribosome is not dependent of the SKI complex (**Fig. S3**).

Ska1 is not involved in NSD but is involved mRNA 3'UTR degradation

Since Ska1 is physically linked to the SKI complex, which is involved in RNA degradation in association with the exosome, we explored whether Ska1 could participate to the same metabolic pathways as the SKI complex. The SKI complex contributes to the degradation a number of RNA substrate such as conform or aberrant mRNAs. To investigate whether Ska1 could be involved in Non-Stop mRNA decay, we tested the expression of TAP-Non-Stop (**Fig. 5A left panel**), and GFP-Rz-HIS3 (**Fig. 5A right panel**) reporter genes in the absence of Ska1. The TAP-Non-Stop reporter gene carries a gene coding for the Protein A but lacks a termination codon

and thus produces an mRNA, which can be translated up to its polyA tail. The polyA tail is translated in a poly-lysine, which, due to its high electrostatic charge, gets stuck within the ribosome exit tunnel, stalling translation. In contrast, the GFP-Rz-HIS3 reporter gene carries a ribozyme, which generates an mRNA coding for the GFP without stop codon and without poly A tail. Translation thus stops only when the ribosome reaches the very end of the transcript. Both reporters are sensitive to the No-Stop-Decay pathway. We performed western blots with total cellular extracts from the *skal1Δ* or *ski3Δ* mutant and wild-type strains transformed with these plasmids. We used, as a control, the same reporter genes but with a normal termination codon or without ribozyme respectively. We did not observe any aberrant proteins accumulation in the *skal1Δ* strain in contrast to *ski3Δ* strain positive control, which exhibited a strong accumulation of these non-conform peptides (**Fig. 5A**). These results indicated that Skal1 is not involved in the aberrant mRNA degradation pathway.

To test the effect of the absence of Skal1 on the general mRNA degradation pathway, we followed the behavior of *PGK1pG* and *MFA2pG* well-characterized reporter genes, which expressed a stable and unstable transcript, respectively. These genes were under the control of the *GAL1* promoter; the addition of glucose blocks the transcription and allows to follow the degradation of reporter mRNAs present in the cells. Moreover, they contain a polyG just after the STOP codon, which blocks the progression of Xrn1 in the 3'-UTR, and allows the detection of 3'-end intermediates of degradation (**Fig. 5B**).

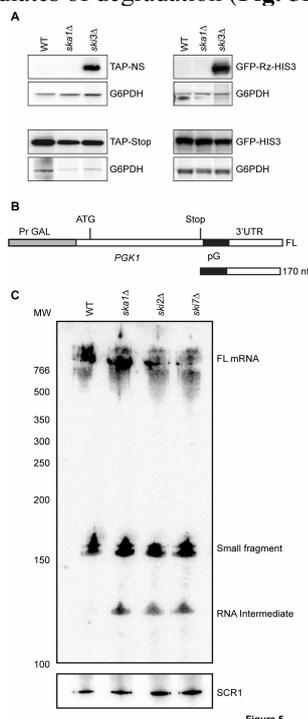


Fig. 5 Ska1 is involved in the 3' to 5' mRNA degradation pathway (A) Skal1 is not required for the Non-Stop mRNA degradation. Total cellular extracts from WT or *skal1Δ* or *ski3Δ* strains transformed with the TAP-Non-Stop or the GFP-Rz-HIS3 or with TAP-Stop or GFP-HIS reporter genes as control were

separated on 10% SDS/PAGE polyacrylamide gel. The protein A and the GFP were revealed by Western blot using PAP antibody or anti-GFP antibody. A loading control of the total protein amounts was done using anti-G6PDH antibody. (B) Schematic representation of the PGK1 reporter gene. (C) Total RNA from WT, *skal1Δ*, *ski2Δ* and *ski7Δ* strains were separated on a 6%-Urea polyacrylamide gel. The Northern blot was first hybridized with a [³²P]-radiolabelled poly(G) probe. Second, the membrane was hybridized with a [³²P]-radiolabelled SCR1 probe to estimate the amount of each sample loaded on the gel.

With the stable *PGK1pG* reporter gene, in addition to the full-length mRNA and the small 3'-UTR fragment that accumulates as a result of the polyG blocking Xrn1, the absence of Ski2 or Ski7 induces the accumulation of a small 3'-UTR degradation intermediate, as previously observed (**Anderson and Parker, 1998**). Importantly, the absence of Skal1 resulted in the accumulation of the same 3'-UTR intermediate fragment (**Fig. 5C**). In contrast, no additional intermediate of degradation was detectable using the *MFA2pG* reporter gene in mutant or WT strains (data not shown). This discrepancy between the two reporter genes could be due to the difference of stability between the two transcripts or to an intrinsic property of some messengers such as sequences or structure. This result indicated that Skal1 is involved in the same general mRNA decay mechanism as the Ski factors, at least for the 3'-UTR regions, which are devoid of ribosomes. If Skal1 is involved in the 3' to 5' degradation mRNA pathway, we postulated that the absence of Skal1 combined with mutation into genes involved in the 5' to 3' mRNA degradation pathway should be deleterious for the cells. Since the absence of the decapping enzyme Dcp2 severely affect the cell growth, we fused a degenon sequence in the presence of auxin (IAA). We combined this *DCP2* gene version with *ski2Δ* or *skal1Δ* deletion. The growth of *skal1Δ* or *ski2Δ* mutant strains was not affected compared to Dcp2 degenon strain in presence of auxin. In contrast, the double-mutant strains were sensitive to the auxin (**Fig. 6**).

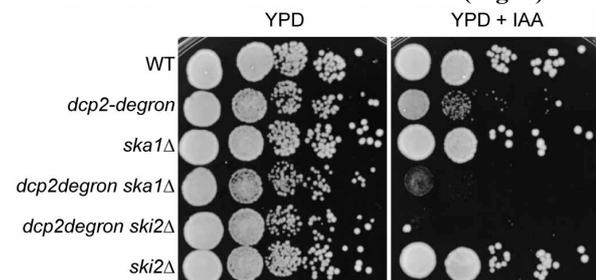


Figure 6

Fig. 6 *skal1Δ* is synthetic lethal with *dcp2* mutant Serial dilutions of wild-type, single or double mutant strains were spotted on rich medium plates with or without auxin and incubated for 48h at 30°C.

The synthetic lethality was very strong between *ski2Δ* and the *dcp2degenon* mutant as previously described (**Anderson and Parker, 1998**) but slightly less severe between *skal1Δ* and *dcp2degenon*.

The targets of *Ska1*

To identify the *Ska1*-RNA targets, we first performed a RIP-Seq experiment. We immunoprecipitated the RNAs associated with *Ska1* and *Ski3* complexes and we compared them with RNAs associated with the *Rpl16a* complex. The libraries were performed with the Illumina kit after treatment with Ribominus to eliminate the ribosomal RNA. Surprisingly, the mRNAs most enriched with the *Ska1*-TAP complex were *SKA1* and *SKI3* while the mRNAs most enriched with *Ski3*-TAP were *SKA1* and *SKI7* (Fig. 7). Moreover, the mRNA coding for *Ski2* was also enriched, although to a lesser extent, with both *Ska1*-TAP and *Ski3*-TAP complexes.

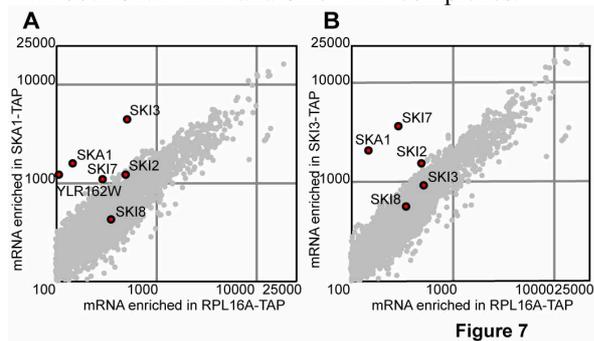


Figure 7
Fig. 7 *SKA1* mRNAs are specifically enriched with *Ski3*-TAP and inversely

A) RNAs associated to the *SKA1*-TAP complex were compared to the RNAs associated to the *Rpl16a*-TAP complex. B) RNAs associated to the *SKI3*-TAP complex were compared to the RNAs associated to the *Rpl16a*-TAP complex.

This suggests that *Ska1* and components of the *SKI* complex could interact together cotranslationally, with a preferential interaction between *Ska1* and *Ski3*. Such mechanism has been frequently observed both in prokaryotes and eukaryotes (Wells *et al.*, 2015; Natan *et al.*, 2017) and is a signature of co-translational complex assembly (see Discussion). Therefore, the RIP experiment did not select specific targets associated to *Ska1* or *Ski3* complexes apart from their own mRNAs. Since we observed intermediates of degradation accumulating in the absence of *Ska1* or *Ski2* using a *PGK1pG* reporter gene (Fig. 5C), we decided to identify these intermediates genome-wide. In order to observe any effects on the efficiency of the 3' to 5' pathway genome-wide, it is necessary to inhibit the major 5' to 3' degradation pathway. To do so, we used a *dcp2-degtron* mutant, which, upon auxin addition, strongly decreases mRNA decapping, protecting mRNAs 5'-ends from *Xrn1* exonucleolytic degradation.

The *dcp2-degtron* mutant was then combined with the *ska1Δ* or *ski2Δ* deletion mutations and we compared the 3' end sequence accumulating in these strains with a wild-type and with a *dcp2-degtron* single mutant strain. We constructed the 3'-end libraries with the Teloprime lexogen kit, which is routinely used to amplify full-length cDNAs from their polyA tail. However, since the 3' to 5' RNA degradation

intermediates are predicted to be devoid of polyA, we added an *in vitro* polyadenylation step using the PolyA polymerase (Fig. 8).

Altogether, our results revealed that *Ska1* is required with the *SKI* complex for the efficient degradation of the mRNA 3'-UTR regions (Fig. 5C) and the cytoplasmic non-coding RNAs (Fig. 8), which are substrates of the NMD surveillance pathway. In contrast, and contrarily to the *SKI* complex, *Ska1* is not required for the efficient 3' to 5' degradation of the translated regions of mRNAs nor of the substrates of the surveillance pathways such as the NSD, which eliminates aberrant non-stop mRNAs. These observations suggested that *Ska1* is specifically required for the *SKI* complex to target cytoplasmic RNA sequences devoid of ribosomes.

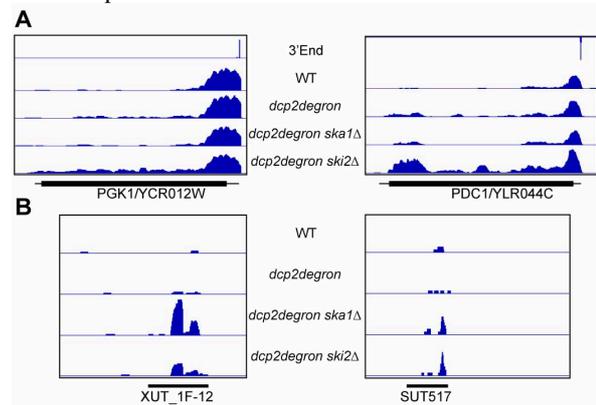


Figure 8
Fig. 8 *Ska1* is required, together with the *SKI* complex, to degrade the cytoplasmic RNA sequences devoid of ribosomes

Genomic libraries were constructed from mRNA extracted from WT, *dcp2-degtron*, *dcp2-degtron ski3Δ* and *dcp2-degtron ska1Δ* strains using the Teloprime lexogen kit. The libraries were sequenced with an Illumina and the analysis was performed as described in Materials and Methods A) illustration of the accumulation of mRNA intermediates in the absence of the *SKI* complex or in the absence of *Ska1* when the 5' end degradation pathway is compromised. B) Illustration of the accumulation of non-coding RNA in the absence of the *SKI* complex or in the absence of *Ska1* when the 5' end degradation pathway is affected.

Recently, it was shown that the *SKI* complex has a strong affinity to ribosomes carrying small mRNA 3' overhangs (Schmidt *et al.*, 2016). This association is fully consistent with the role of the ribosome-associated *SKI* complex in the NSD since this pathway is translation dependent and degrades RNAs with ribosome reaching the 3'-end of the transcripts. But it is not fully consistent with its role in the general mRNA degradation pathway. Indeed, before degradation of the coding sequence harboring the ribosomes, the ribosome free 3'-UTR must be degraded. The association of the *SKI* complex with ribosomes cannot either account for the role of the *SKI* complex in the NMD dependent degradation of non-coding RNAs when the 5' to 3' pathway is compromised. Since, we observed that *Ska1* interacts with the *SKI* complex independently of the ribosome, we can assume that the *SKI* complex could exist in two states, one associated to the ribosome and one, possibly mutually exclusive, associated to *Ska1*.

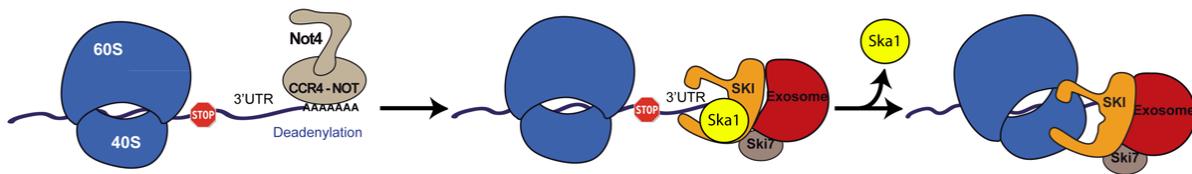


Figure 9

Fig. 9 Model for SKI-ribosome and ribosome-independent SKI complexes functions In a first step, the SKI complex in association with Ska1 degrades the 3'UTR independently of the ribosome; in a second step, when the SKI/Ska1 complex reaches the coding sequence, there is an exchange between Ska1 and the ribosome.

Therefore, we postulated that, in the general 3' to 5' degradation of mRNAs, the SKI/Ska1 complex interacts, in a first step, with the 3'-UTR devoid of ribosome and in a second step, when the SKI/Ska1 complex reaches the coding sequence region, Ska1 leaves the complex and the SKI complex associates with the translating 3' ribosome (**Fig. 9**). The configuration of the NSD substrates, and the fact that Ska1 is not required for NSD, in contrast to SKI, is also consistent with the hypothesis that the Ska1-associated SKI complex specifically targets ribosome free sequences, since NSD substrates lack, by definition, a 3'-UTR.

A further hypothesis suggests that Ska1, present in a sub-stoichiometric amount relative to the Ski factor, preferentially interact with it, cotranslationally (see above) in order to keep a ribosome free fraction of the SKI complex available for the degradation of ribosome devoid transcripts. According to this model, if Ska1 acts as a specific competitor for binding to the SKI ribosome-interacting surface, its overexpression should affect the NSD degradation pathway, which targets ribosome associated RNAs. We therefore investigated the effect of *SKA1* overexpression. We first observed that the overexpression of *SKA1* did not affect the growth of WT cells on minimal medium but affected growth in the presence of Hygromycin B, an antibiotic that

Fig. 10 Ska1 overexpression affects the Non-Stop mRNA decay (A) Serial dilutions of wild-type, *ski2Δ* or *ska1Δ* strains, transformed with plasmid pCM190 (carrying a URA3 selection marker) empty or overexpressing *SKA1*, were spotted on magic medium -URA plates with or without hygromycin (40 μg/ml) and incubated for 48h at 30°C.

(B) Total cellular extracts from WT or *ska1Δ* or *ski2Δ* strains transformed with the TAP-Non-Stop or the TAP-Stop reporter genes as control were separated on 10% SDS/PAGE polyacrylamide gel. The protein A was revealed by Western blot using PAP antibody. A loading control of the total protein amounts was done using anti-G6PDH antibody.

induces read-through events and decrease translation fidelity. Moreover, the deletion of *SKI2*, which results in a similar slow growth phenotype, as previously described (**Defenouillère et al., 2013**), was epistatic with the effect of the deletion of *SKA1*, consistent with the hypothesis that the function of Ska1 is mediated by its interaction with the SKI complex (**Fig. 10A**). Furthermore, and most strikingly, we observed that the overexpression of *SKA1* resulted in a strong accumulation of the Non-Stop ProtA NSD reporter (**Fig. 10B**), fully consistent with the hypothesis that Ska1 antagonizes the formation of ribosome-SKI complexes, which are involved in the NSD pathway (**Schmidt et al., 2016**).

Discussion

The SKI-Ska1 complex is involved in the 3'UTR mRNA degradation pathway

It was known, since a long time, that the SKI complex operates in the cytoplasm as a co-factor of the exosome to degrade the mRNAs from their 3' to 5' ends. More precisely, it is well documented that the SKI complex is involved not only in the general mRNA degradation pathway but also in the aberrant mRNA degradation such as NSD or NGD (**Anderson and Parker, 1998; van Hoof et al., 2002**). Recently, *in vivo* and *in vitro* experiments have demonstrated that the SKI complex associate with ribosomes containing RNA 3'-end overhangs, revealing that the 3' to 5' mRNA degradation pathway is a co-translational event (**Schmidt et al., 2016**) like the 5' to 3' end mRNA degradation pathway (**Pelechano et al., 2015**). These structural data were consistent with the fact that the aberrant mRNA degradation is translation-dependent. In contrast, the co-translational

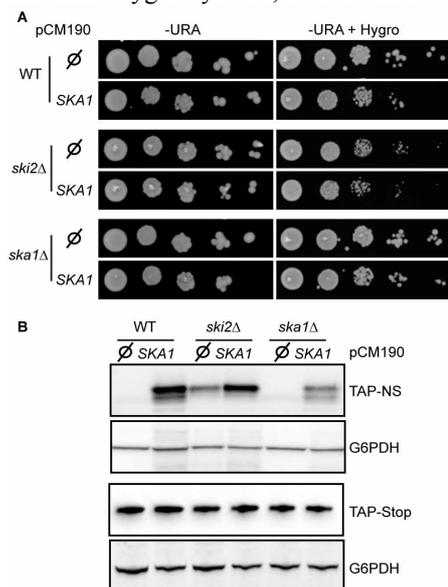


Figure 10

implication of the SKI complex in the general mRNA degradation pathway only partially fits with these structural data since the mRNA 3'-UTRs are essentially devoid of ribosomes, yet are known to require the SKI complex to be efficiently degraded by this pathway (Anderson and Parker, 1998). The context in which the SKI complex operates for this specific function thus requires further characterization. Here, by affinity purification followed by quantitative mass spectrometry analyses, we identified a new component, Ska1, specifically associated with a subpopulation of SKI complexes (Fig. 1 & 2). We demonstrated that this factor assists the SKI complex in the general mRNA degradation pathway but is not involved in the aberrant mRNA mechanism (Fig. 5). The synergistic effects of the deletion of *SKA1* and *DCP2* but not of *SKI* genes, are consistent with a role of Ska1 in the general mRNA decay (Fig. 6). We also showed that Ska1 is associated to the ribosome only indirectly, by the intermediate of the mRNAs (Fig. 4). Furthermore, we found that, when the 5' to 3' degradation pathway is compromised by a depletion of Dcp2, Ska1 was required, together with the SKI complex, for the efficient degradation of ribosome-devoid RNA sequences such as cytoplasmic non-coding RNAs (Fig. 8) or 3'-UTRs (Fig. 5C) but, in contrast to Ski2, not for the efficient degradation of translated mRNA regions (Fig. 8). Altogether, these results allowed us to propose a model in which the general 3' to 5' mRNA degradation pathway could act in two steps after deadenylation (Fig. 9). First, a Ska1-associated SKI complex subpopulation would assist the exosome to degrade the ribosome-free RNAs such as 3'-UTR mRNA regions, until it reaches the coding regions where it would encounter ribosomes. At this stage, Ska1 would leave and allow a direct interaction between the SKI complex and the ribosome, a configuration required for the activity of the SKI-exosome complex when the mRNA targets are occupied by ribosomes (Fig. 9) (Schmidt *et al.*, 2016). In strong support of this model, *SKA1* overexpression induces an accumulation of NSD or NGD reporter peptides. This is a signature of the inhibition of the NSD and NGD dependent degradation of aberrant mRNAs, which involves ribosome-associated SKI complexes (Fig. 10). This observation is thus fully consistent with the model that Ska1 acts as an antagonist of the SKI-ribosome association by interacting, in a competitive manner, with the same surface of the SKI complex.

A co-translational assembly of the SKI-Ska1 complex

Using RIP experiments, we made the unexpected observation showing that Ska1 and Ski proteins are associated, not only with their own mRNA, but also with the mRNAs encoding some of their strongest interacting factors. Namely, Ska1-TAP purification strongly enriches not only the *SKA1*

mRNA, but also the *SKI3* mRNA. Likewise, Ski3-TAP purification strongly enriches the *SKI7* and *SKA1* mRNAs (Fig. 8). The most likely explanation for these observations is that the corresponding protein complexes assemble in part cotranslationally. In eukaryotes like in prokaryotes as well, most of the proteins such as the Ski proteins are organized in complexes. In prokaryotes, the genes are structured in operon and many complexes are operon-encoded. Therefore, proteins of the complex are translated from the same mRNA, which favors a quick and ordered assembly (Shieh *et al.*, 2015). But, in eukaryotes, the proteins are synthesized from separate genes and little is known about how the proteins independently produced are transported and assembled, particularly for the proteins expressed at a low level. One way to deal with this problem is to cotranslationally assemble the complex. The first observation in eukaryotes of such complex assembly was made by (Duncan and Mata, 2011). Since then, a number of cases have been reported. (Wells *et al.*, 2015; Natan *et al.*, 2017). We here have an additional example of such organization.

In addition, one particularity of the SKI complex is that it acts in association with the ribosome or with the Ska1 cofactor. Therefore, it could be essential to quickly associate with the Ska1 protein to avoid an association of the SKI complex with the 40S ribosomal subunit. This is in agreement with the SKI complex titration when we overproduced Ska1 at the expense of the SKI-ribosome complex formation (see above).

Material and methods

Yeast strains and plasmids

The yeast strains and the plasmids used in this study were listed in the Table 1 and the Table 2 respectively (see Supplemental Material). The yeast strains constructed for this study were obtained by transformation of genomic PCR product. The details of each construction are available upon request. The TAP-NS and TAP-Stop plasmids carrying the *LEU2* marker were obtained by homologous recombination into BY4741 with the TAP-NS and TAP-Stop plasmids carrying the *URA3* marker, linearized by EcoRV and with a PCR amplification of the *LEU2* gene from pRS305 using QD139 and QD140 primers. pCM190-SKA1 was generated by ligation into pCM190 previously digested with BamH1 and Not1 of a BamH1-Not1 PCR fragment containing the *SKA1* gene synthesized with EZ089 and EZ090 primers.

Polysome gradients, proteins extraction and western blotting

Polysome extracts and sucrose gradients were performed as described in (Defenouillère *et al.*, 2013). Proteins extractions were prepared by alkaline treatment using 5 A600 mid-log phase yeast cells (Kushnirov, 2000). The cellular extracts were separated on 10% SDS-PAGE. The proteins were

transferred on nitrocellulose membrane using a Biorad semi-dry machine. The membrane was hybridized with appropriate antibodies dilution as mentioned in Table 3 (see Supplemental Material).

RNA extraction and Northern

Total RNA was extracted from 12 A600 mid-log phase yeast cells using the hot acid phenol protocol (Collart and Oliviero, 2001). Total RNAs were separated on 6% polyacrylamide–urea gels, transferred on nitrocellulose membranes and probed with ³²P-labeled oligonucleotides listed in Table 4 (see Supplemental Material).

Libraries construction

Data analyses

The quality of sequence data was visualized with FastQC v0.11.3 (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Every duplicate single-end read was discarded using the perl program fqduplicate (<ftp://ftp.pasteur.fr/pub/gensoft/projects/fqtools>).

Adaptor clipping and quality trimming of reads were performed using AlienTrimmer v0.4.0 (Criscuolo and Brisse, 2013). Demultiplexing fastq files was done using Biopython v1.69 (Cock *et al.*, 2009). Only reads with at least 6 As or 6 Ts in their extremity were kept. Reads were aligned along the chromosomes of the 16 chromosomes and mitochondrial sequence of *S. cerevisiae* S288C genome and the 3 chromosomes and mitochondrial sequence of *S. pombe* genome using single-end mode of Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012) using local read alignment with option ‘--sensitive-local’. Output SAM files were converted to BAM files using SAMtools v0.1.19 (Li *et al.*, 2009).

Mapped reads were filtered with a python script: reads with no mismatch were kept by parsing the BAMs files. The python tool bamCoverage implemented in deepTools 2.5.3 (Ramirez *et al.*, 2014) was used per default to generate bigWig coverage file for each strand (option «--filterRNAstrand») and with a bin size of 1. The mapping coverage was visualized by using IGV v.2.3.97 (Robinson *et al.*, 2011).

Affinity purifications coupled to mass spectrometry

Affinity purifications were performed using 4 liters of culture at 2 OD_{600nm} as described in (Defenouillère *et al.*, 2013). The peptides were identified with an LTQ-Orbitrap Velos. Protein identifications and comparative label-free quantification were performed using the MaxQuant suite (version 1.5.5.1), which includes the Andromeda search engine. Quantifications were done using the algorithm integrated into MaxQuant to calculate Label Free Quantification intensities (Cox *et al.*, 2014).

Acknowledgments

The authors thank all colleagues mentioned in the text

for their gifts of material used in this study. They are grateful to the proteomic platform of the Pasteur Institute for the availability of the Orbitrap. E. Z was supported by a grant ANR-14-CE-10-0014-01 from the Agence Nationale de la Recherche (ANR). This work was supported by a grant ANR-14-CE-10-0014-01 from the Agence Nationale de la Recherche (ANR), the Institut Pasteur, and the Centre National de la Recherche Scientifique.

Abbreviations

LFQ, label-free quantification
IBAC, Instantaneous Biological Analyzer and Collector
LC-MS/MS, Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry
IAA, Indole-3-Acetic Acid
NSD, Non-Stop mRNA decay
NGD, No-Go mRNA decay
NMD Non-sense mediated mRNA decay
UTR, Untranslated Transcribed Region
TCA, Tri Chloro Acetic Acid
TAP, Tandem Affinity Purification
Rz, Ribozyme
MS, Mass Spectrometry
SDS, Sodium dodecyl sulfate

References

- Anderson, J. S., and Parker, R. P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17, 1497–1506.
- Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajiho, H., Hoshino, S., and Katada, T. (2001). Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 20, 4684–4693.
- Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2004). Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol. Cell* 15, 5–15.
- Bonnerot, C., Boeck, R., and Lapeyre, B. (2000). The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5939–5946.
- Brown, J. T., Bai, X., and Johnson, A. W. (2000). The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA N. Y. N* 6, 449–457.
- Cao, D., and Parker, R. (2001). Computational modeling of eukaryotic mRNA turnover. *RNA N. Y. N* 7, 1192–1212.
- Cock, P. J. A. *et al.* (2009). Biopython: freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics. *Bioinforma. Oxf. Engl.*

- 25, 1422–1423.
- Collart, M. A., and Oliviero, S. (2001). Preparation of yeast RNA. *Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 13, Unit13.12*.
- Coller, J. M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M. A., and Parker, R. (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA N. Y. N 7*, 1717–1727.
- Cox, J., Hein, M. Y., Lubner, C. A., Paron, I., Nagaraj, N., and Mann, M. (2014). Accurate Proteome-wide Label-free Quantification by Delayed Normalization and Maximal Peptide Ratio Extraction, Termed MaxLFQ. *Mol. Cell. Proteomics MCP 13*, 2513–2526.
- Criscuolo, A., and Brisse, S. (2013). AlienTrimmer: a tool to quickly and accurately trim off multiple short contaminant sequences from high-throughput sequencing reads. *Genomics 102*, 500–506.
- de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., and Linder, P. (1998). Doh1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J. 17*, 1128–1140.
- Decourty, L., Saveanu, C., Zemam, K., Hantraye, F., Frachon, E., Rousselle, J.-C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2008). Linking functionally related genes by sensitive and quantitative characterization of genetic interaction profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. 105*, 5821–5826.
- Defenouillère, Q. *et al.* (2013). Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110*, 5046–5051.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J. 21*, 6915–6924.
- Doma, M. K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature 440*, 561–564.
- Duncan, C. D., and Mata, J. (2011). Widespread cotranslational formation of protein complexes. *PLoS Genet. 7*, e1002398.
- Dunkley, T., and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J. 18*, 5411–5422.
- Dunkley, T., Tucker, M., and Parker, R. (2001). Two related proteins, Edc1p and Edc2p, stimulate mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics 157*, 27–37.
- Frischmeyer, P. A. (2002). An mRNA Surveillance Mechanism That Eliminates Transcripts Lacking Termination Codons. *Science 295*, 2258–2261.
- Fromont-Racine, M., and Saveanu, C. (2014). mRNA degradation and decay. In: *Fungal RNA Biology, Switzerland: Ane Sesma and Tobias von der Haar*, 159–193.
- Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M., and Conti, E. (2013). The yeast ski complex: crystal structure and RNA channeling to the exosome complex. *Cell 154*, 814–826.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., and Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science 295*, 2262–2264.
- van Hoof, A., Staples, R. R., Baker, R. E., and Parker, R. (2000). Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. *Mol. Cell. Biol. 20*, 8230–8243.
- Hu, W., Sweet, T. J., Chamnongpol, S., Baker, K. E., and Coller, J. (2009). Co-translational mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature 461*, 225–229.
- Kowalinski, E., Kögel, A., Ebert, J., Reichelt, P., Stegmann, E., Habermann, B., and Conti, E. (2016). Structure of a Cytoplasmic 11-Subunit RNA Exosome Complex. *Mol. Cell 63*, 125–134.
- Kushnirov, V. V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast Chichester Engl. 16*, 857–860.
- Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods 9*, 357–359.
- Larimer, F. W., Hsu, C. L., Maupin, M. K., and Stevens, A. (1992). Characterization of the XRN1 gene encoding a 5'→3' exoribonuclease: sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-disrupted yeast cells. *Gene 120*, 51–57.
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., and 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma. Oxf. Engl. 25*, 2078–2079.
- Milligan, L., Decourty, L., Saveanu, C., Rappsilber, J., Ceulemans, H., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2008). A yeast exosome cofactor, Mpp6, functions in RNA surveillance and in the degradation of noncoding RNA transcripts. *Mol. Cell. Biol. 28*, 5446–5457.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Tollervey, D. (2003). Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable RNAs. *Mol. Cell. Biol. 23*, 6982–6992.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2003). An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell 11*, 1405–1413.
- Nagaraj, N., Alexander Kulak, N., Cox, J., Neuhauser, N., Mayr, K., Hoerning, O., Vorm, O., and Mann, M. (2012). System-wide Perturbation Analysis with Nearly Complete Coverage of the Yeast Proteome by Single-shot Ultra HPLC Runs on a Bench Top Orbitrap. *Mol. Cell. Proteomics MCP 11*.
- Natan, E., Wells, J. N., Teichmann, S. A., and Marsh, J. A. (2017). Regulation, evolution and consequences of cotranslational protein complex assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol. 42*, 90–97.
- Parker, R. (2012). RNA Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics 191*, 671–702.

- Pelechano, V., Wei, W., and Steinmetz, L. M. (2015). Widespread co-translational RNA decay reveals ribosome dynamics. *Cell* *161*, 1400–1412.
- Ramírez, F., Dündar, F., Diehl, S., Grüning, B. A., and Manke, T. (2014). deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res.* *42*, W187–191.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., and Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* *29*, 24–26.
- Schmidt, C. *et al.* (2016). The cryo-EM structure of a ribosome-Ski2-Ski3-Ski8 helicase complex. *Science* *354*, 1431–1433.
- Shieh, Y.-W., Minguez, P., Bork, P., Auburger, J. J., Guilbride, D. L., Kramer, G., and Bukau, B. (2015). Operon structure and cotranslational subunit association direct protein assembly in bacteria. *Science* *350*, 678–680.
- Synowsky, S. A., and Heck, A. J. R. (2008). The yeast Ski complex is a hetero-tetramer. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *17*, 119–125.
- Tharun, S., and Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell* *8*, 1075–1083.
- Toh-E, A., Guerry, P., and Wickner, R. B. (1978). Chromosomal superkiller mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *136*, 1002–1007.
- Wells, J. N., Bergendahl, L. T., and Marsh, J. A. (2015). Co-translational assembly of protein complexes. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 1221–1226.
- Widner, W. R., and Wickner, R. B. (1993). Evidence that the SKI antiviral system of *Saccharomyces cerevisiae* acts by blocking expression of viral mRNA. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 4331–4341.

IV – Rqc1 et Ltn1 sont essentiels pour éviter l'agrégation des peptides aberrants induites par l'addition des CAT-tail par Rqc2

Mon laboratoire d'accueil fut l'un des premiers à découvrir et à caractériser le complexe RQC, composé des protéines Rqc1, Rqc2, Ltn1 et Cdc48 et ses co-facteurs Ufd1 et Npl4 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). Durant ma thèse, j'ai pu participer à la caractérisation d'agrégats protéiques initialement observés dans un contexte où l'expression de Rqc1 est affectée. Ces travaux ont donné lieu à un article dans le « Journal of Biological Chemistry » en 2016 dans lequel je suis 2^{ème} auteur. Je présenterai ici les figures qui illustrent les expériences que j'ai réalisées pour cet article (Defenouillère et al., 2016).

La fonction moléculaire de Ltn1 était connue. Il s'agit d'une E3 Ubiquitine ligase qui va polyubiquitinyler les peptides aberrants bloqués dans le tunnel de sortie de la grande sous-unité du ribosome. Cette fonction a été montrée aussi bien *in vivo* (Bengtson and Joazeiro, 2010) qu'*in vitro* (Shao et al., 2013). L'une des fonctions de Rqc2 est d'ajouter des Alanines et des thréonines (CAT-tail) en C-terminal des peptides aberrants (Shen et al., 2015). L'ajout des CAT tail vient d'être également montré *in vitro* (Osuna et al., 2017). En revanche, la fonction de Rqc1 restait évasive.

Pour comprendre la fonction de Rqc1 dans le contrôle-qualité des protéines, Quentin Defenouillère a, dans un premier temps, analysé par Western Blot l'accumulation du gène rapporteur aberrant TAP-NonStop dans un contexte où *RQC1* est délété. La méthode d'extraction des protéines couramment utilisée comportait un traitement à la soude (Kushnirov, 2000) et permettait de mieux mettre en évidence les extensions CAT ajoutées par Rqc2 sur les peptides aberrants. L'utilisation d'une autre méthode employant le TCA pour précipiter les protéines a permis de mettre en évidence, après transfert du gel sur une membrane de nitrocellulose, dans la partie « stacking » des gels de polyacrylamide, de nouvelles formes de TAP-NonStop de très haut poids moléculaire. Il est intéressant de noter que ces formes de haut poids moléculaires apparaissent seulement lorsque *RQC1* seul est délété. Dans la souche sauvage WT, si seul *RQC2* est délété ou si on associe la délétion de *RQC2* à la délétion de *RQC1*, ces formes ne sont plus visibles.

Pour déterminer la nature de ces formes de hauts poids moléculaires, j'ai effectué un traitement avec 5mM de guanidine, un composé qui dénature les structures protéiques, sur les souches WT, *rqc1Δ*, *rqc2Δ* et *rqc1Δrqc2Δ*. Ce traitement a permis de

réduire significativement ces formes de haut poids moléculaire que l'on retrouve seulement en *rqc1Δ* (**Figure 1B** dans Defenouillère et al., 2016). Ceci suggérerait que les formes de haut poids moléculaire devaient être des formes agrégées de protéines aberrantes.

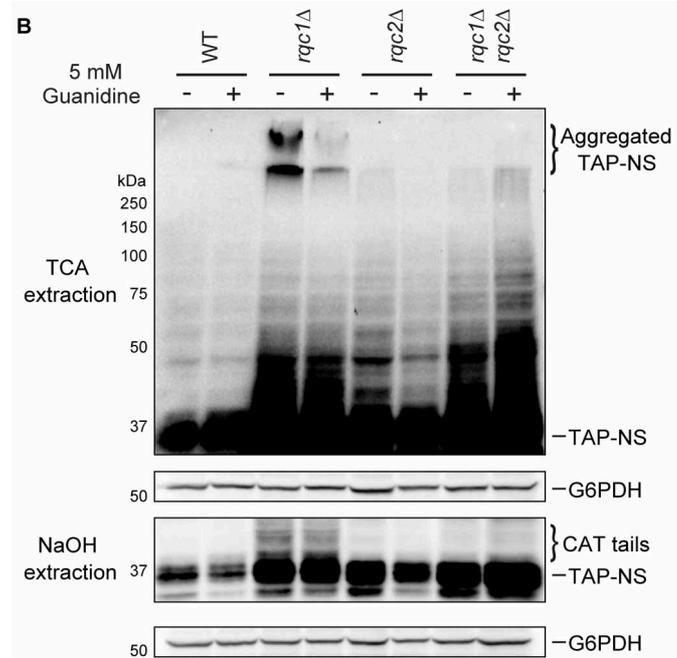


Figure 1B: Rqc1 prévient la formation des agrégats dépendant de Rqc2 Les protéines issues des souches WT, *rqc1Δ*, *rqc2Δ*, *rqc1Δ rqc2Δ* traitées ou non avec 5 mM guanidine pendant 15h ont été extraites soit par traitement TCA (panneau haut) soit traitement alcalin (panneau bas), puis séparées sur gel 10% acrylamide. Les protéines TAP-NS ont été révélées par western blot en utilisant un anticorps PAP (1/10000). La G6PDH révélée par un anticorps anti-G6PDH (1/100000) a servi de contrôle de charge.

Avec Quentin Defenouillère, nous avons également analysé les protéines exprimées par un gène rapporteur GFP-NonStop par microscopie à fluorescence. Alors que dans les souches WT, *rqc2Δ* et *rqc1Δ rqc2Δ*, le signal GFP est diffus dans le cytosol, nous avons pu mettre en évidence des foci verts (**Figure 2** dans Defenouillère et al., 2016) correspondant très certainement aux formes de haut poids moléculaires observées par Western Blot dans la souche *rqc1Δ*. L'ensemble de ces résultats confirme donc que ces formes de haut poids moléculaire correspondent à des agrégats protéiques.

Rqc1 est donc essentiel pour empêcher la formation des agrégats cytosoliques de peptides aberrants TAP-NonStop, de plus ils dépendent également de la présence de Rqc2.

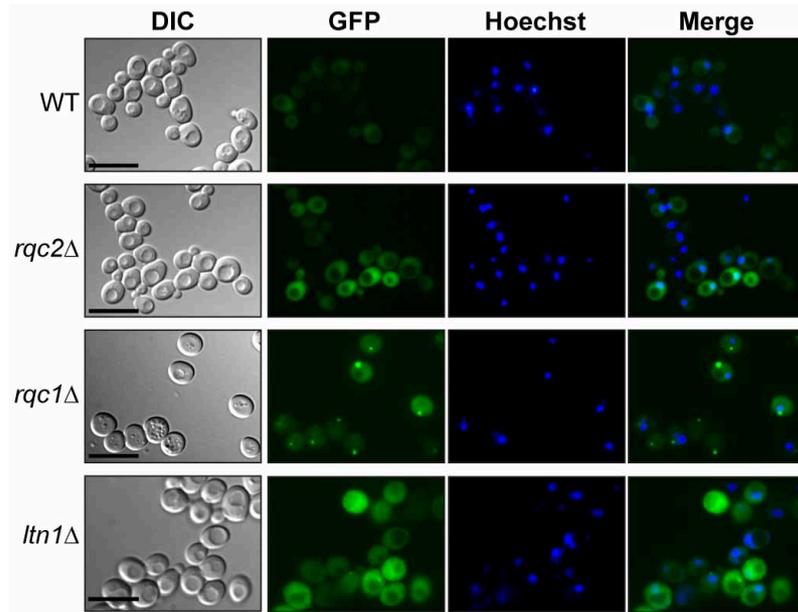


Figure 2 : Les peptides aberrants forment des agrégats en absence de Rqc1 Les souches WT, *rqc1Δ*, *rqc2Δ* et *ltn1Δ* exprimant la GFP-NS ont été analysé par microscopie à fluorescence.

Ces formes agrégées sont observées en l'absence de Rqc1 mais, si on y associe l'absence de Rqc2, elles ne sont plus détectables (**Figure 1B** dans Defenouillère et al., 2016). Nous savons que Rqc2 possède une fonction d'ajout de CAT-tails aux peptides aberrants bloqués dans la particule 60S ribosomale. La question se posait donc de savoir si cette fonction est indispensable dans la formation des agrégats protéiques. Pour répondre à cette question, une souche complémentée avec une forme mutante de Rqc2 appelée RQC_{aaa} a été utilisée. Ce mutant de Rqc2 est fonctionnel pour la dégradation des peptides aberrants mais pas pour l'ajout d'extensions CAT. Le devenir des TAP-NonStop a donc été étudié dans des souches complémentées ou non avec RQC_{aaa}. L'accumulation d'agrégats dans une souche *rqc1Δrqc2Δ* a ainsi pu être restaurée par la complémentation avec la forme sauvage de Rqc2 et non la forme mutante Rqc2_{aaa} (**Figure 3** dans Defenouillère et al., 2016), démontrant donc que l'ajout d'extensions CAT-tails est responsable de la formation d'agrégats protéiques.

Sachant que Rqc1 est un facteur important pour le recrutement de l'hexamère Cdc48 sur les particules 60S bloquées avec un peptide aberrant, il était important de tester si cette fonction de Rqc1 était nécessaire pour la formation d'agrégats protéiques. Dans un gradient de polysomes effectué avec les extraits d'une souche *cdc48-deplétée*, les agrégats protéiques ont également pu être observés (**Figure 4** dans Defenouillère et

al., 2016), montrant donc que le recrutement de Cdc48 empêche l'agrégation des peptides aberrants. Il est également intéressant de noter que les agrégats protéiques sédimentent principalement dans les fractions légères du gradient mais qu'ils peuvent également être retrouvés, bien que dans une moindre mesure, dans les fractions 60S (**Figure 4** dans Defenouillère et al., 2016) et que ce phénotype est aggravé dans une souche *Cdc48-déplétée/rqc1Δ*. Ces résultats montrent donc que les peptides aberrants peuvent former des agrégats en l'absence de Cdc48, même s'ils sont toujours associés aux particules 60S ribosomales.

Le recrutement de Cdc48 dépendant de la polyubiquitination des peptides aberrants par Ltn1, nous avons voulu savoir si Ltn1 avait aussi un rôle dans la formation des agrégats protéiques. La présence d'agrégats protéiques, même si moins importante, a été vérifiée par Western Blot et par microscopie à fluorescence en l'absence de Ltn1 (**Figures 2 et 5** dans Defenouillère et al., 2016), confirmant que Ltn1 est requis pour prévenir la formation de ces agrégats protéiques. Quentin Defenouillère a également analysé la polyubiquitination par Ltn1 des peptides aberrants dans les agrégats. Pour cela, il a extrait les protéines des souches WT, *rqc1Δ*, *ltn1Δ* et *rqc1Δltn1Δ* et fait un Western Blot utilisant un anticorps anti-ubiquitine. Les agrégats observés en *rqc1Δ* sont bien reconnus par cet anticorps, démontrant donc que les peptides aberrants sont au moins en partie polyubiquitinylés.

Les agrégats protéiques observés en *rqc1Δ* sont-ils dégradés par le protéasome, comme c'est le cas pour les peptides aberrants? L'utilisation d'un inhibiteur du protéasome, le MG-132, dans des souches WT et *rqc1Δ* suivi d'une analyse des extraits de polysomes par Western Blot a permis d'observer que les agrégats protéiques que l'on retrouve en *rqc1Δ* sont en quantité plus importante lorsque les cellules sont traitées avec le MG-132 (**Figure 7** dans Defenouillère et al., 2016), ces agrégats sont donc, au moins en partie, dégradés par le protéasome.

Enfin, pour terminer cette étude, les agrégats protéiques observés dans la partie « stacking » des gels de polyacrylamide ont été analysés par spectrométrie de masse. L'identification a révélé un enrichissement en ubiquitines, en co-chaperonnes Sis1 et Sgt2 avec leurs chaperonnes associées Ssa1 et Ssa2 ainsi que Hsp82 dans la souche *rqc1Δ* par rapport à une souche sauvage WT (**Figures 8A et 8B** dans Defenouillère et al., 2016). Ces facteurs sont des facteurs retrouvés de l'agrésome (Wang et al., 2009).

J'ai pu, dans un premier temps, observer la présence de Sis1 dans des agrégats protéiques de *rqc1Δ* par Western Blot en utilisant des anticorps anti-Sis1 (**Figure 8C** dans Defenouillère et al., 2016). Dans un second temps, j'ai analysé par microscopie à fluorescence des souches WT ou *rqc1Δ*, exprimant à la fois la protéine GFP-NonStop et, soit la protéine Sis1-mcherry, soit la protéine Sgt2-mcherry. Ces analyses m'ont permis de montrer que les protéines fusions Sis1-mcherry et Sgt2-mcherry co-localisent avec la fusion GFP-NonStop au niveau des agrégats que forme cette protéine dans la souche *rqc1Δ*. Ces résultats confirment les données biochimiques et montrent donc que ces agrégats contiennent ces protéines chaperonnes (**Figure 8D** dans Defenouillère et al., 2016).

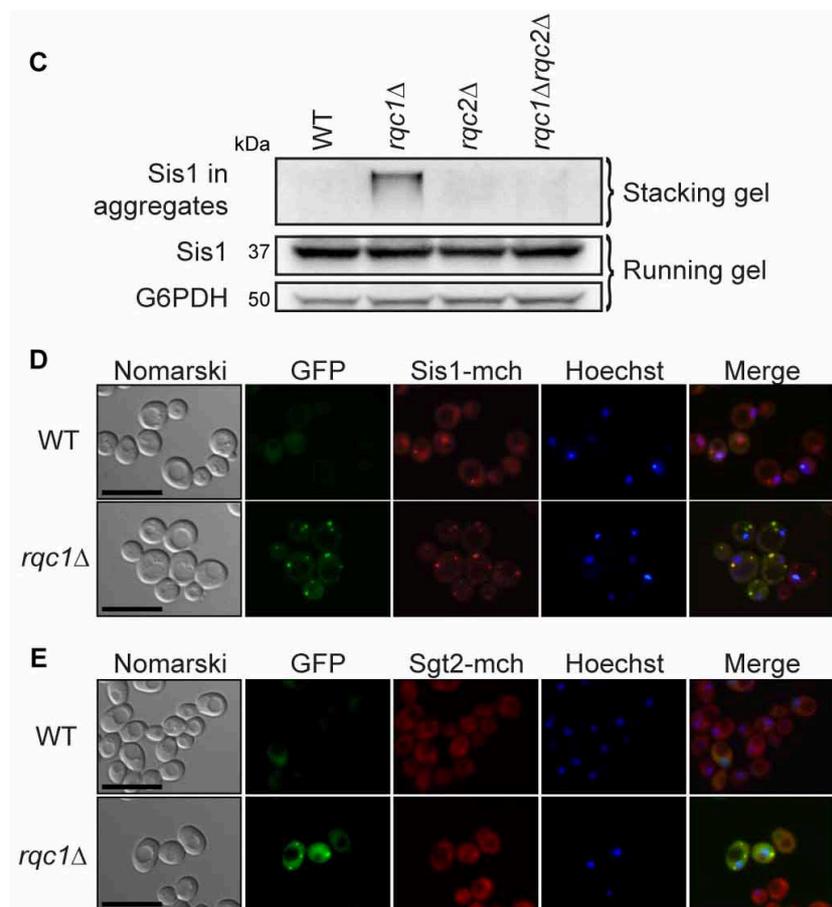


Figure 8 : Les agrégats formés en *rqc1Δ* contiennent des chaperonnes spécifiques de l'agrésome (C) Les protéines issues des souches WT, *rqc1Δ*, *rqc2Δ*, *rqc1Δrqc2Δ* ont été extraites par traitement TCA et séparées sur gel 10% acrylamide. Les protéines Sis1 dans le stacking et dans le gel de séparation ont été révélées par western blot en utilisant un anticorps anti-Sis1 (1/1000). La G6PDH révélée par un anticorps anti-G6PDH (1/100000) a servi de contrôle de charge. **(D et E)** Les souches WT et *rqc1Δ* exprimant la GFP-NS et contenant soit Sis-mcherry, soit Sgt2-mcherry ont été analysé par microscopie à fluorescence.

Résultats

Ces protéines ont été retrouvées dans une étude précédente caractérisant des protéines localisées dans l'agrésome après l'expression de l'exon 1 de la protéine Huntingtin comportant des expansions polyglutamines (Wang et al., 2009), suggérant que les agrégats de protéines aberrantes qui s'accumulent en l'absence de Rqc1 sont adressées dans des compartiments cytosoliques de type agrésome.

Pour résumer, les protéines Rqc1 et Ltn1, qui permettent un recrutement efficace de Cdc48, sont essentielles pour empêcher l'agrégation des peptides naissants aberrants induite par l'ajout des CAT-tails dans leur région C-terminale. Ces agrégats sont polyubiquitylés par Ltn1 et dégradés par le protéasome.

Parallèlement à notre travail, deux autres publications ont abouti aux mêmes conclusions (Choe et al., 2016; Yonashiro et al., 2016).

Rqc1 and Ltn1 Prevent C-terminal Alanine-Threonine Tail (CAT-tail)-induced Protein Aggregation by Efficient Recruitment of Cdc48 on Stalled 60S Subunits*^[S]

Received for publication, February 19, 2016, and in revised form, April 5, 2016. Published, JBC Papers in Press, April 18, 2016, DOI 10.1074/jbc.M116.722264

Quentin Defenouillère^{‡§1}, Elodie Zhang^{‡§1}, Abdelkader Namane[‡], John Mouaikel[‡], Alain Jacquier[‡], and Micheline Fromont-Racine^{‡2}

From the [‡]Institut Pasteur, Génétique des Interactions Macromoléculaires, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 3525, F-75724, Paris, France and the [§]Sorbonne Universités, UPMC Paris 6, Complexité Du Vivant, 75252 Paris Cedex 05, France

Protein homeostasis is maintained by quality control mechanisms that detect and eliminate deficient translation products. Cytosolic defective proteins can arise from translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon (NonStop) or containing a sequence that blocks translation elongation (No-Go), which results in translational arrest. Stalled ribosomes are dissociated, aberrant mRNAs are degraded by the cytoplasmic exosome, and the nascent peptides remaining in stalled 60S exit tunnels are detected by the ribosome-bound quality control complex (RQC) composed of Ltn1, Rqc1, Rqc2, and Cdc48. Whereas Ltn1 polyubiquitylates these nascent peptides, Rqc2 directs the addition of C-terminal alanine-threonine tails (CAT-tails), and a Cdc48 hexamer is recruited to extract the nascent peptides, which are addressed to the proteasome for degradation. Although the functions of most RQC components have been described, the role of Rqc1 in this quality control process remains undetermined. In this article we show that the absence of Rqc1 or Ltn1 results in the aggregation of aberrant proteins, a phenomenon that requires CAT-tail addition to the nascent peptides by Rqc2. Our results suggest that aberrant CAT-tailed protein aggregation results from a defect in Cdc48 recruitment to stalled 60S particles, a process that requires both Rqc1 and Ltn1. These protein aggregates contain Ltn1-dependent polyubiquitin chains and are degraded by the proteasome. Finally, aggregate characterization by proteomics revealed that they contain specific chaperones including Sis1, Sgt2, Ssa1/2, and Hsp82, suggesting that these protein aggregates may be addressed to aggresome-like structures when the RQC complex fails to deliver aberrant nascent peptides to the proteasome for degradation.

Protein homeostasis is maintained in eukaryotic cells by quality control pathways that ensure the recognition and the degradation of defective translation products. Whereas molec-

ular chaperones perform unfolding and refolding of misfolded proteins, aberrant proteins are recognized and eliminated by the ubiquitin-proteasome system. These cellular responses prevent the toxicity generated by the accumulation of defective proteins that may be nonfunctional and are prone to aggregation. However, in the presence of a translational stress, the rapid increase of the amount of defective proteins often leads to the accumulation of protein aggregates (for review see Ref. 1). It has been shown that these protein aggregates can be transported via the microtubules network to a deposit called the aggresome (2), in which the coordinated action of chaperones and proteasome-recruiting factors enables aggregate processing, thus limiting their intracellular toxicity and maintaining the quality of the cellular protein pool (3). In the cytosol, accumulation of aberrant proteins may result from the translation of aberrant mRNAs that trigger ribosome stalling during translation elongation. These stalled ribosomes act as a signal for mRNA (4–6), nascent peptide (7, 8), and ribosome degradation and recycling (9, 10). Two types of aberrant transcripts causing translational arrest have been identified: mRNAs lacking a STOP codon (NonStop mRNAs) (4, 5), for which ribosome stalling is caused by the translation of the poly(A) tail into a positively charged polylysine (7), and mRNAs carrying a sequence or a structure that prevents elongating ribosomes from reaching the termination codon (no-go mRNAs) (6). In both cases, Dom34 (Pelota in mammals) and Hbs1 bind to the stalled ribosomes, which trigger the recruitment of the ATPase Rli1/ABCE1 (11). Together, they promote dissociation of the stalled ribosome. Following the dissociation, the aberrant transcripts undergo an endonucleolytic cleavage (6) and are degraded via the recruitment of the SKI complex, Ski7, the cytoplasmic exosome, and Xrn1 (5, 6, 12).

After ribosome dissociation, the exit tunnel of the 60S subunit still contains an aberrant nascent peptide bound to a tRNA that must be degraded to prevent the accumulation of defective translation products. Recent studies revealed that these aberrant substrates are detected by the ribosome-bound quality control complex (RQC),³ composed of the RING domain E3 ubiquitin ligase Ltn1, the factors Rqc1 and Rqc2, a hexamer of Cdc48 (Listerin, TCF25, NEMF, and p97 in mammals, respec-

* This work was supported by Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-2011-BSV6-011-02 and ANR-14-CE-10-0014-01 and funds from the Institut Pasteur and the CNRS. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

^[S] This article contains supplemental Data Set S1.

¹ Supported by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Association pour la Recherche contre le Cancer.

² To whom correspondence should be addressed: Institut Pasteur, 25–28, Rue du Dr. Roux, F-75724, Paris, France. Tel.: 33-140-613-432; E-mail: mfromont@pasteur.fr.

³ The abbreviations used are: RQC, ribosome-bound quality control complex; CAT-tail, C-terminal alanine-threonine tail; PAP, peroxidase-anti-peroxidase.

Prevention of Aberrant Protein Aggregation

TABLE 1

Yeast strains used in this study

Strains	Genotypes	References
BY4741	<i>MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0</i>	
BY4742	<i>MATalpha, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0</i>	
LMA1967	as <i>BY4742, rqc1Δ::KANMX4</i>	Euroscarf
LMA843	as <i>BY4742, yel068cΔ::PralphaNATMX4, ydl242wΔ::KANMX4</i>	Ref. 14
LMA2306	as <i>BY4742, yel068cΔ::PralphaNATMX4, rqc1Δ::KANMX4</i>	Ref. 14
LMA836	as <i>BY4742, rqc2Δ::PralphaNATMX4, yel068cΔ::KANMX4</i>	Ref. 14
LMA1921	as <i>BY4742, yel068cΔ::PralphaNATMX4, ltn1Δ::KANMX4</i>	Ref. 14
LMA1920	as <i>BY4742, rqc2Δ::PralphaNATMX4, ltn1Δ::KANMX4</i>	Ref. 14
LMA3768	as <i>BY4742, rqc1Δ::PralphaNATMX4, ltn1Δ::KANMX4</i>	This study
LMA2135	as <i>BY4742, rqc1Δ::KANMX4, rqc2Δ::PralphaNATMX4</i>	This study
LMA3124	as <i>BY4742, PralphaNATMX4:PrTetO2:CDC48, yel068cΔ::KANMX4</i>	This study
LMA3121	as <i>BY4742, PralphaNATMX4:PrTetO2:CDC48, rqc1Δ::KANMX4</i>	This study
LMA3041	as <i>BY4741, erg6Δ::LEU2</i>	This study
LMA3120	as <i>BY4741, erg6Δ::LEU2, rqc1Δ::KANMX4</i>	This study

tively), and the Cdc48 co-factors Npl4 and Ufd1 (13–15) (see Fig. 1A). Rqc2 binds to the 60S interface surface and consequently prevents 40S reassociation (16). An additional function of Rqc2 is to sense the tRNA in the P-site of the stalled 60S and to coordinate the recruitment of alanyl- and threonyl-tRNAs in the A-site to add a nontemplated C-terminal alanine-threonine tail (CAT-tail) to the nascent peptide (17). This process is essential to trigger the Hsf1 response to translational stress (17). In parallel, Ltn1 performs the polyubiquitylation of the aberrant peptide (15–18). This enables the recruitment of a Cdc48 hexamer that hydrolyzes ATP to extract the aberrant substrate from the 60S exit tunnel and to escort it to the proteasome for degradation (14, 19). Whereas Rqc1 is not involved in the polyubiquitylation process, it is required for Cdc48 recruitment on the 60S subunit and therefore essential for efficient degradation of these aberrant proteins (13, 14).

Although the functions of Ltn1, Rqc2, and Cdc48 within this RQC-mediated translational quality control have been partly described (see review in Ref. 20), the function of Rqc1 remains widely unknown. Furthermore, rapid accumulation of defective proteins in case of stress often results in a saturation of quality control mechanisms (for review see in Ref. 21), and the fate of aberrant translation products in the absence of a fully functional RQC complex is yet to be determined.

In this study, we show that Rqc1, Ltn1, and Cdc48 prevent the aggregation of aberrant proteins that can only appear after CAT-tail addition by Rqc2. These protein aggregates contain polyubiquitin chains generated by Ltn1 and are degraded by the proteasome. Finally, these aggregates are recognized by specific chaperones including Sis1, Sgt2, Ssa1/2, and Hsp82, suggesting that they are targeted to aggresome-like structures. This work reveals the importance of Cdc48 recruitment on stalled 60S particles by Rqc1 and Ltn1 to prevent the accumulation of CAT-tail induced aggregates of aberrant translation products, thus participating in the maintenance of cellular protein homeostasis.

Experimental Procedures

Yeast Strains and Plasmids—The yeast strains used in this study are listed in Table 1. All of them were generated from either BY4741 or BY4742 by homologous recombination using PCR products. The plasmid pGFP-NonStop was generated by pTAP-NonStop (14) digestion with BamHI and BglII and yeast

homologous recombination with a GFP sequence PCR fragment carrying overhangs that target 5' and 3' ends of the digested vector. Depletions of *CDC48* were performed by generating a *PrTetO2-CDC48* strain (14) where *CDC48* is under the control of a tetracyclin-repressible promoter and by treating cell cultures with doxycyclin ($5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) for 13.5 h at 30°C . To eliminate the aggregated forms of protein, the cells were treated for 15 h with 5 mM guanidine, and 5 A_{600} cells in the mid-log phase of treatment were harvested, and proteins were extracted as described below.

Polysome Gradients, Proteins Extraction, and Western Blotting—Polysome extracts were obtained from 120 A_{600} mid-log phase yeast cells were treated with $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cycloheximide for 5 min and broken with glass beads using a MagNA Lyser (three times for 60 s at 3000 rpm) in breaking buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cycloheximide, 10 mM *N*-ethylmaleimide, and EDTA-free protease inhibitors from Roche). For proteasome inhibition, the cells were treated for 2 h with $100 \mu\text{M}$ MG132 before lysis. They were deleted from *ERG6* to increase the sensitivity to MG132. 7 A_{260} of clarified cell lysates were loaded on 10–50% sucrose gradients. Collected fractions were precipitated with 10% TCA and resuspended in 40 μl of sample buffer, and 10 μl were loaded on 10% SDS-PAGE. Total protein extracts were prepared from 5 A_{600} of exponential culture. Briefly, the cells were broken with glass beads using a MagNA Lyser (twice for 60 s at 4800 rpm) in 300 μl of TCA 20%. We let beads settle and transferred the supernatant into a new tube. 300 μl of 5% TCA were added to the beads, and after vortex for 10 s, we again let beads settle and transferred the supernatant into the collected tube. After centrifugation for 1 min at $16,000 \times g$, the samples were resuspended in 40 μl of sample buffer, and 10 μl were loaded on 10% SDS-PAGE. Alternatively, a fast method using alkaline treatment (22) was used as mentioned in the text. 5 A_{600} of exponential culture were resuspended in 200 μl of 0.1 N NaOH. After incubation for 5 min at room temperature, the cells were collected by centrifugation for 3 min at room temperature and resuspended in 40 μl of sample buffer. Proteins were denatured for 3 min at 95°C , and cellular debris were pelleted by centrifugation. 10 μl of supernatant were loaded on 10% SDS-PAGE. After transfer to nitrocellulose membrane with a semidry system, proteins were detected by hybridization with the appropriate antibodies.

Mass Spectrometry Experiments and Data Analysis—For sample preparation from stacking gels, each lane was excised, cut in small cubes, and subjected to in-gel trypsin digestion after reduction and alkylation as described in Ref. 23. All steps from in-solution trypsin digestion, peptide sample analysis by LC-MS/MS on an Orbitrap Velos, protein identification, to comparative label-free quantification using MaxQuant suite were performed as previously described in Ref. 14.

Fluorescence Microscopy—Fluorescence microscopy was performed with GFP-NonStop-expressing yeast cells grown in liquid synthetic medium containing galactose without uracil to a final A_{600} of 4.0 and resuspended in sterile water. DNA was stained with Hoechst 33352 ($5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$) for 5 min, and cells were washed twice in sterile water. Samples were imaged using a Leica DMRXA fluorescence microscope. Fluorescent signals were collected with single band pass filters for excitation of GFP (Leica) for 3500 ms, mCherry (Cy3; Leica) for 800 ms and Hoechst 33352 (A; Leica) for 40 ms. Images were acquired with a Hamamatsu ORCAII-ER cooled CCD camera controlled by the Openlab software (version 3.5; Improvion) and processed using Adobe Photoshop CS3 software (version 10; Adobe).

Results

Rqc1 Prevents the Accumulation of Rqc2-dependent Aberrant Protein Aggregates—Whereas the functions of the other components of the RQC complex have been described (13–15, 17), the role of Rqc1 in the translational quality control pathway remains poorly understood. To better understand the mechanism of action of Rqc1 in this quality control process, we analyzed by Western blotting the accumulation of an aberrant reporter containing a tandem affinity purification sequence (24) and lacking a translation termination codon (called “TAP-NonStop”) in the absence of *RQC1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In addition to the previously observed accumulation of the aberrant reporter protein in *rqc1Δ* cells compared with a wild type when protein extracts were prepared using NaOH (Fig. 1B, bottom two panels, and Ref. 14), extracting proteins using TCA and blotting the stacking part of the polyacrylamide gel revealed an additional form of the TAP-NonStop reporter stabilized in the absence of Rqc1 that was retained in the stacking gel (Fig. 1B, top two panels). Interestingly, these high molecular weight species of the TAP-NonStop were not visible in *rqc2Δ* cells, and the absence of Rqc2 suppressed their accumulation in the *rqc1Δrqc2Δ* double mutant, although the accumulation of the running gel-migrating TAP-NonStop was comparable between this double mutant and the *rqc1Δ* single mutant (Fig. 1B). Whereas these high molecular weight species were resistant to the SDS present in the protein sample buffer, treating the yeast cultures with 5 mM guanidine for 15 h significantly reduced high molecular weight species accumulation in the stacking gel of *rqc1Δ* cells (Fig. 1B), suggesting that they could correspond to aggregated forms of the TAP-NonStop aberrant protein that accumulate in the absence of Rqc1.

We addressed this hypothesis by replacing the TAP sequence in the TAP-NonStop reporter gene by a GFP sequence to monitor the aberrant “GFP-NonStop” reporter by fluorescence microscopy. Interestingly, whereas the fluorescent signal was weak and homogeneously distributed in the cytosol of wild-

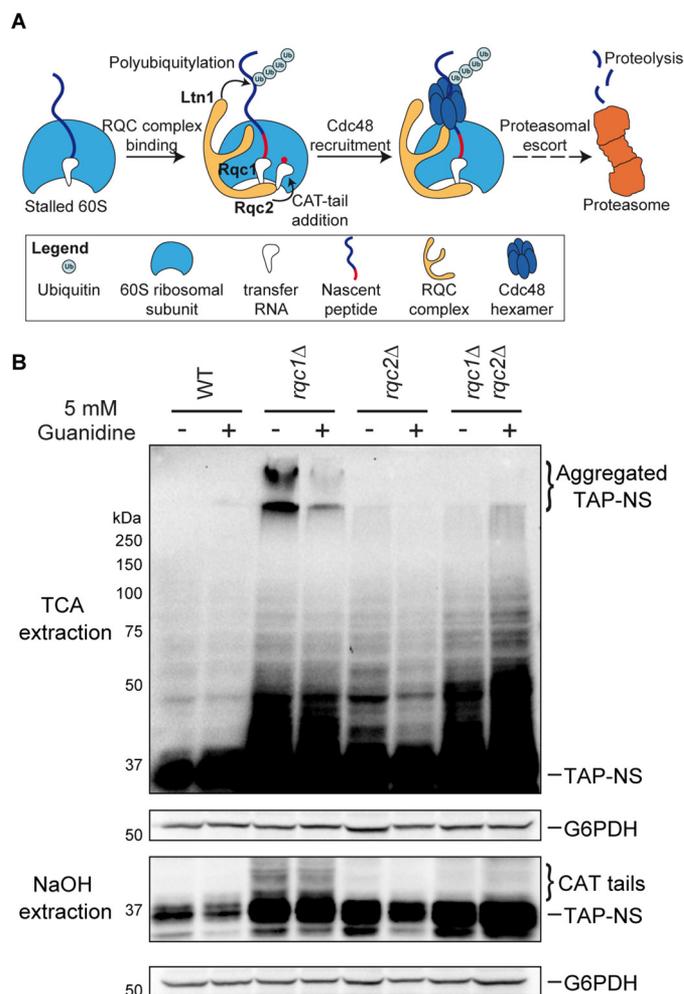


FIGURE 1. Rqc1 prevents the accumulation of Rqc2-dependent aberrant protein aggregates. A, schematic illustration of the ribosome-bound quality control pathway based on previous studies. Aberrant nascent peptides synthesized from mRNAs triggering translational arrest remain stalled in the 60S ribosomal subunit after ribosome dissociation. 60S particles stalled with a nascent peptide are recognized by the RQC complex composed of Rqc1, Rqc2, and Ltn1 that performs CAT-tail addition and polyubiquitylation of the nascent peptide. This polyubiquitylated substrate is then recognized by a Cdc48 hexamer that hydrolyzes ATP to extract it from the 60S exit tunnel and escorts it to the proteasome for degradation. B, total proteins extracted using TCA (top two panels) or NaOH (bottom two panels) prepared from wild-type, *rqc1Δ*, *rqc2Δ*, and *rqc1Δrqc2Δ* cells expressing the TAP-NonStop reporter and treated or not with 5 mM guanidine for 15 h were separated on 10% polyacrylamide gels. Analyses by Western blotting were performed using antibodies against the TAP-NonStop (peroxidase-anti-peroxidase (PAP) from Sigma-Aldrich) (1/10,000) and rabbit polyclonal against G6PDH (1/100,000) for loading control. Aggregated species of the TAP-NonStop in the stacking gel of TCA extracts and CAT-tailed forms of the TAP-NonStop are indicated. NS, NonStop.

type cells, the GFP-NonStop aberrant protein accumulated to a higher extent in *rqc1Δ* cells and formed green foci corresponding to protein aggregates that were localized in the cytosol, according to a merge with nucleus staining (Fig. 2). In contrast, whereas the GFP-NonStop fluorescent signal in the cytosol of *rqc2Δ* cells was comparable with the intensity observed in *rqc1Δ* cells, no green foci were detected in the absence of Rqc2, whether in the presence or Rqc1 or not (Fig. 2). These observations corroborate those obtained in Fig. 1 and suggest that high molecular weight species observed with the TAP-NonStop correspond to the cytosolic aggregates observed with the GFP-

Prevention of Aberrant Protein Aggregation

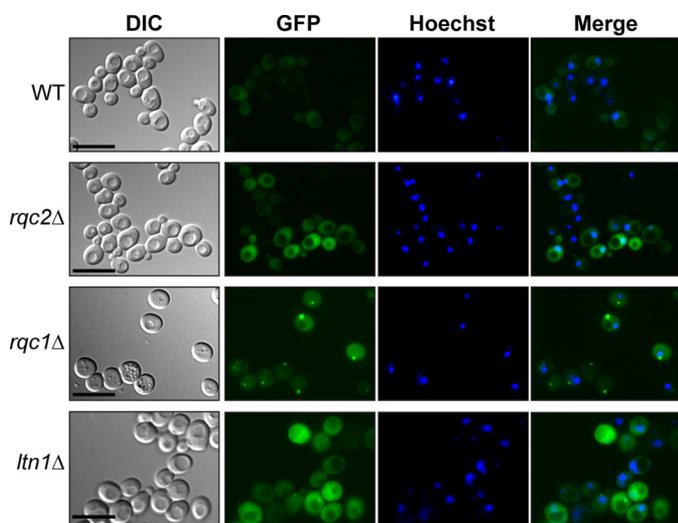


FIGURE 2. **Aberrant nascent peptides form cytosolic aggregates in the absence of Rqc1.** Wild-type, *rqc2Δ*, *rqc1Δ*, and *ltn1Δ* strains expressing the GFP-NonStop reporter gene were analyzed by fluorescence microscopy. Yeast cells are shown in the left column (Nomarski); GFP and Hoechst fluorescent signals are displayed in the middle columns; and a merge is displayed in the right column. Scale bars, 5 μ m. DIC, differential interference contrast.

NonStop reporter. Taken together, these results show that Rqc1 is essential to prevent the formation of cytosolic aggregates of aberrant peptides synthesized from NonStop mRNAs; however, aggregate formation strictly depends on the presence of Rqc2.

Addition of CAT-tails to Aberrant Peptides by Rqc2 Is Essential for Their Aggregation in the Absence of Rqc1—We then investigated why Rqc2 was essential for aggregate formation even in the absence of Rqc1. Because Rqc2 was shown to initiate CAT-tail addition to aberrant nascent peptides (17), we wondered whether the presence of CAT-tails on aberrant proteins could be responsible for their aggregation in the absence of Rqc1. To this end, we complemented the wild-type, *rqc1Δ*, *rqc2Δ*, and *rqc1Δrqc2Δ* strains with vectors coding the *RQC2* gene or the *RQC2_{aaa}* mutant, which is functional for aberrant protein degradation but not for CAT-tail addition, thus uncoupling these two distinct mechanisms (17). As expected, the CAT-tails addition to the soluble TAP-NonStop peptide was observed only when the entire *RQC2* gene version is present but not with the *RQC2_{aaa}* mutant (Fig. 3, bottom two panels). Interestingly, the accumulation of aggregated TAP-NonStop in the *rqc1Δrqc2Δ* double mutant could only be restored by complementation with the *RQC2* gene but not with the *RQC2_{aaa}* mutant (Fig. 3, top two panels, compare lanes 11 and 12), revealing that CAT-tail addition by Rqc2 is actually responsible for protein aggregation in the absence of Rqc1. Intriguingly, the quantity of protein aggregates was increased when two copies of *RQC2* were expressed in the *rqc1Δ* mutant (Fig. 3, top two panels, compare lanes 7 and 8), which suggests that the overexpression of an Rqc2 version that is functional for CAT-tail addition has an aggravating effect on aberrant protein aggregation when Rqc1 is impaired.

Recruitment of Cdc48 on Stalled 60S Particles by Rqc1 and Ltn1 Is Essential to Prevent Aberrant Protein Aggregation—We showed that the absence of Rqc1 leads to aberrant protein aggregation, a process that requires prior CAT-tail addition to

aberrant proteins by Rqc2. Because the only documented role of Rqc1 is to optimize the recruitment of the Cdc48 hexamer on 60S particles stalled with an aberrant nascent peptide in their exit tunnel (13, 14), we suspected that the absence of efficient Cdc48 recruitment on stalled 60S particles in *rqc1Δ* cells, which leads to a defect in aberrant peptide extraction from the 60S and in escort to the proteasome for degradation (14, 19), could be the cause of aggregate formation in the absence of Rqc1. We therefore analyzed the accumulation of the TAP-NonStop reporter after *CDC48* depletion by Western blotting after polysome fractionation using sucrose gradients. Interestingly, aberrant protein aggregates were also detected in the stacking gel upon *CDC48* depletion as observed in the *rqc1Δ* mutant (Fig. 4). In addition, polysome fractionation revealed that these aggregates mainly co-sedimented with light nonribosomal fractions of the sucrose gradient, although a subset also co-sedimented with 60S particles (Fig. 4). We then addressed the effect of combining a *Cdc48* depletion with an *RQC1* deletion and observed a strong aggravating effect on aberrant protein aggregation (Fig. 4), indicating that the absence of both Rqc1 and Cdc48 leads to the aggregation of aberrant proteins in an additive or even synergistic manner. Remarkably, the proportion of aggregated proteins co-sedimenting in the 60S fractions was higher in the absence of both Rqc1 and Cdc48 compared with the *rqc1Δ* single mutant, which correlates with the function of the Cdc48 hexamer in nascent peptide extraction from the stalled 60S (13, 14) and suggests that aberrant proteins that are not efficiently extracted in the absence of Cdc48 can also form aggregates even when they are still bound to 60S particles (Fig. 4).

In addition to the presence of Rqc1, Cdc48 recruitment to the stalled 60S also requires prior polyubiquitylation of the nascent peptide by the E3 ubiquitin ligase Ltn1 (13, 14). Therefore, one may expect that the absence of Ltn1 would also lead to an accumulation of aberrant protein aggregates. We thus analyzed the migration profile of the TAP-NonStop reporter in *ltn1Δ* mutant compared with *rqc1Δ* strain by Western blotting after polysome fractionation using sucrose gradients. As expected, aggregates of the TAP-NonStop reporter protein were also visible in the stacking gel and mainly co-sedimented with light fractions of the sucrose gradient from *ltn1Δ* cells, although the quantity of aggregates in this mutant was lower than in the *rqc1Δ* mutant (Fig. 5). We verified the presence of aggregates in the *ltn1Δ* mutant by fluorescence microscopy with the GFP-NonStop reporter and thus confirmed the presence of green cytosolic foci, although the fluorescence intensity of these aggregates was weaker than the one observed in the *rqc1Δ* (Fig. 2). We also analyzed the migration profile of the TAP-NonStop reporter in the *ltn1Δrqc1Δ* mutant. Surprisingly, the accumulation level of aggregated TAP-NonStop in the *ltn1Δrqc1Δ* mutant was comparable with the *ltn1Δ* and thus not as high as in the *rqc1Δ* (Fig. 5), indicating that the deletion of *LTN1* is epistatic over the absence of *RQC1* with regard to the level of accumulation of protein aggregates. One possibility to explain this epistatic phenotype is that aberrant peptides aggregating in the absence of *RQC1* are polyubiquitylated in an Ltn1-dependent manner and that this polyubiquitylated state promotes

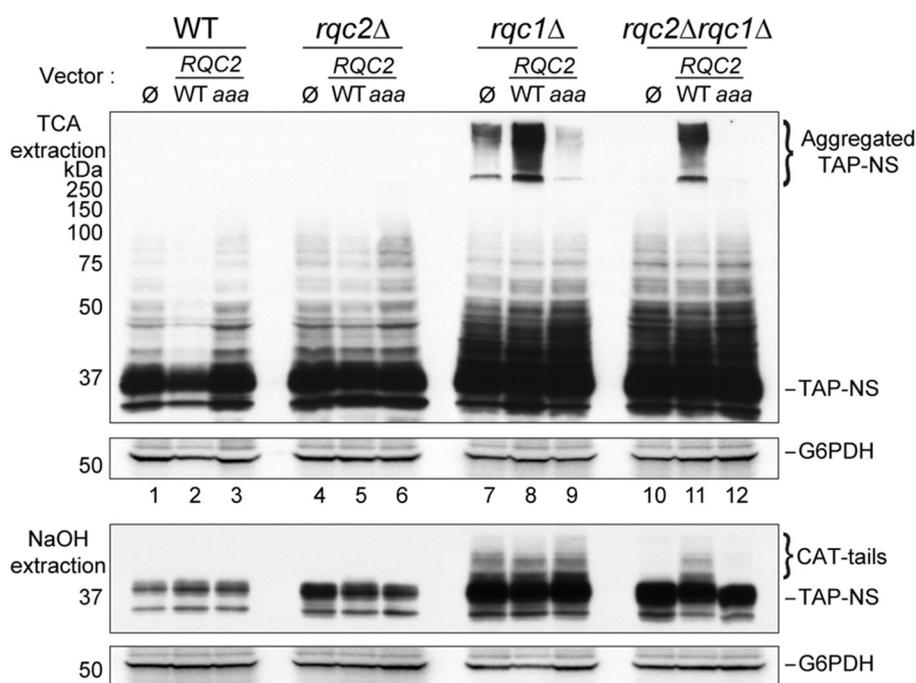


FIGURE 3. Addition of CAT-tails to aberrant peptides by Rqc2 is essential for their aggregation in the absence of Rqc1. Wild-type, *rqc2Δ*, *rqc1Δ*, and *rqc2Δrqc1Δ* strains expressing the TAP-NonStop reporter gene were transformed either with pRS315 empty vector or with pRS315-RQC2 or pRS315-RQC2_{aaa} vectors (17). Total cellular proteins from each strain were extracted either by TCA (top two panels) or NaOH (bottom two panels) methods, separated on a 10% acrylamide gel, and analyzed by Western blotting using antibodies against the TAP-NonStop (PAP) and G6PDH as a loading control. Aggregated versions of the TAP-NonStop in the stacking gel of TCA extracts and CAT-tailed forms of the TAP-NonStop are indicated with curly brackets. NS, NonStop.

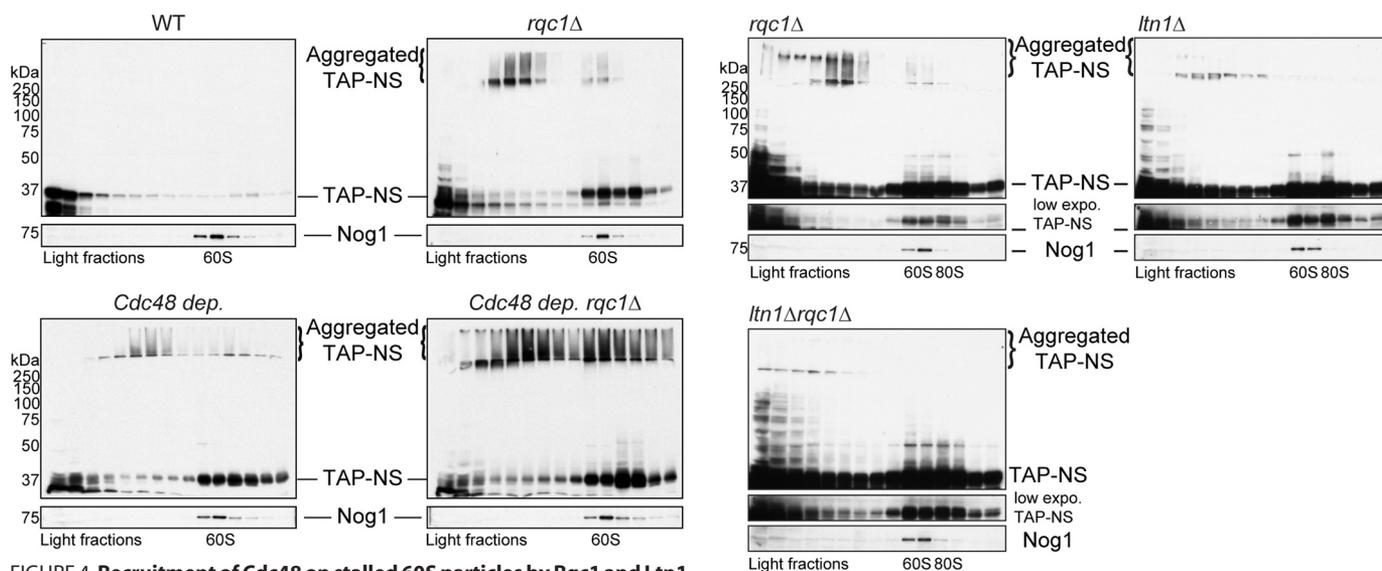


FIGURE 4. Recruitment of Cdc48 on stalled 60S particles by Rqc1 and Ltn1 is essential to prevent aberrant protein aggregation. Wild-type and *rqc1Δ* strains expressing the TAP-NonStop reporter were grown with or without Cdc48 depletion (13.5 h with doxycycline). Polysome extracts were separated on a sucrose gradient (10–50%), and TCA-precipitated fractions were migrated on polyacrylamide gels and analyzed by Western blotting using antibodies against the TAP-NonStop (PAP) and rabbit polyclonal against Nog1 (1/10,000) as a loading control and a marker of the 60S-sedimenting fractions. Aggregated species of the TAP-NonStop accumulating in the stacking gel are annotated. NS, NonStop.

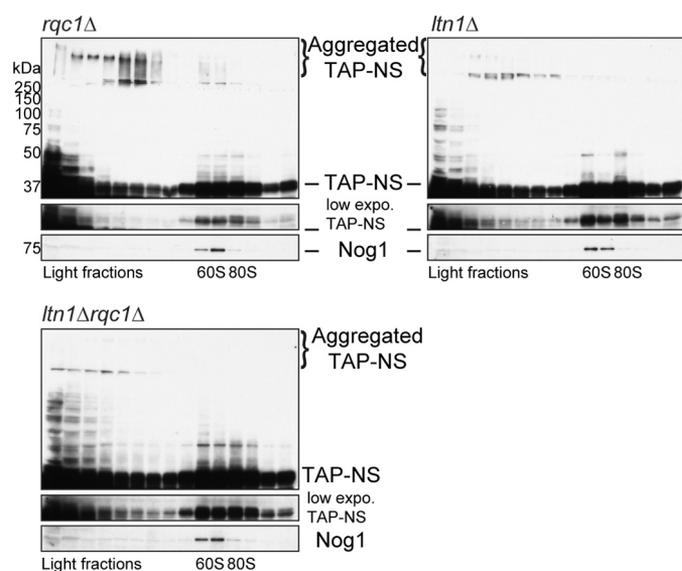


FIGURE 5. Ltn1 is also essential to prevent the accumulation of aberrant protein aggregates. Polysome extracts from *rqc1Δ*, *ltn1Δ*, and *rqc1Δltn1Δ* cells expressing the TAP-NonStop reporter were prepared and separated on a sucrose gradient (10–50%), and TCA-precipitated fractions were migrated on polyacrylamide gels and analyzed by Western blotting using antibodies against the TAP-NonStop (PAP) and Nog1 as a loading control and a marker of the 60S-sedimenting fractions. Aggregated species of the TAP-NonStop accumulating in the stacking gel are annotated. NS, NonStop.

protein aggregation, as previously reported in the case of α -synuclein (25).

We therefore analyzed the polyubiquitination level of protein aggregates by Western blotting using anti-ubiquitin antibodies on sucrose-fractionated protein extracts prepared from wild-type, *rqc1Δ*, *ltn1Δ*, and *ltn1Δrqc1Δ* reporter-free strains.

Whereas the ubiquitinated proteins profiles migrating in the running gel were comparable among these four strains, a fraction of ubiquitinated proteins migrating in the stacking gel was observed specifically in the *rqc1Δ* mutant, demonstrating that the aggregates accumulating in the absence of RQC1 are constituted (at least in part) of polyubiquitinated proteins (Fig. 6).

Prevention of Aberrant Protein Aggregation

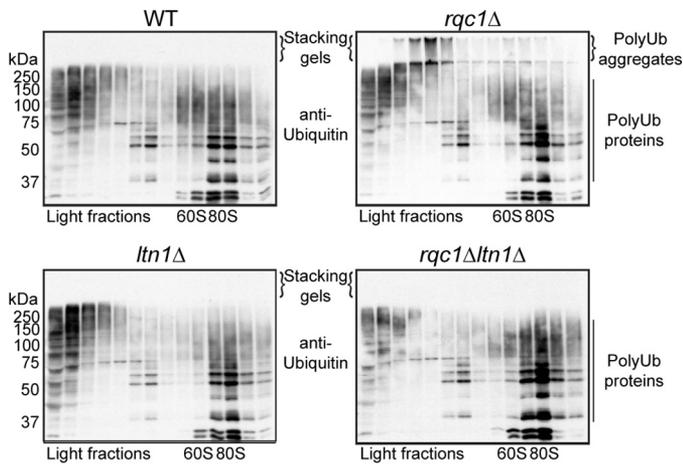


FIGURE 6. Aggregated aberrant proteins accumulating in the absence of Rqc1 are polyubiquitinated in an Ltn1-dependent manner. Polysome extracts prepared from wild-type, *rqc1Δ*, *ltn1Δ*, and *ltn1Δrqc1Δ* cells were separated on a sucrose gradient (10–50%). Fractions of the gradient were TCA-precipitated, separated on a 10% acrylamide gel, and analyzed by Western blotting using monoclonal antibodies against ubiquitin (P4D1 from Covance) (1/1,000) to visualize the ubiquitinated forms of soluble (running gel) and aggregated (stacking gel) endogenous proteins. Aggregates containing polyubiquitinated proteins and accumulating in stacking gels are indicated. *Ub*, ubiquitin.

Notably, these species migrating in the stacking gel displayed a sedimentation pattern similar to the aggregated TAP-NonStop in the same *rqc1Δ* mutant (Fig. 4). Because the strains used for Fig. 4 do not express any aberrant reporter, this result shows that protein aggregates can spontaneously appear when Rqc1 is impaired and are not an artifact resulting from the overexpression of an aberrant NonStop reporter protein. In contrast, no polyubiquitin-containing aggregates were detected in the wild-type strain, the *ltn1Δ* mutant, or the *ltn1Δrqc1Δ* double mutant, which shows that the *LTN1* deletion is also epistatic over the *RQC1* deletion concerning the accumulation of polyubiquitinated protein aggregates (Fig. 6). Furthermore, these results show that aggregates accumulating in the absence of *RQC1* contain aberrant proteins that have been polyubiquitylated in an Ltn1-dependent manner. Taken together, these results suggest that ubiquitylation of aberrant proteins by Ltn1 may contribute to their aggregation in the absence of Rqc1, which may explain the observed epistatic phenotypes of the *LTN1* deletion over the *RQC1* deletion (Figs. 5 and 6).

Aberrant Protein Aggregates Are Eliminated by the Proteasome—Because aberrant peptides synthesized from NonStop mRNAs are known to be degraded by the proteasome (15), we wondered whether the aggregated forms of aberrant proteins appearing in *rqc1Δ* cells also constituted proteasomal substrates. To test this hypothesis, we performed a proteasome inhibition with the inhibitor MG-132 in wild-type and *rqc1Δ* cells and analyzed the stabilization of the TAP-NonStop reporter protein by Western blotting on polysome fractions. A proteasome inhibition in wild-type cells led to the stabilization of the TAP-NonStop in 80S and light fractions of the sucrose gradient (Fig. 7, upper right panel); however, no aggregated forms were detected in the stacking gel, indicating that the aggregation phenomenon is not due to a general defect in proteolysis but a particular phenotype caused by a dysfunction of specific RQC components such as Rqc1, Ltn1, or Cdc48. In

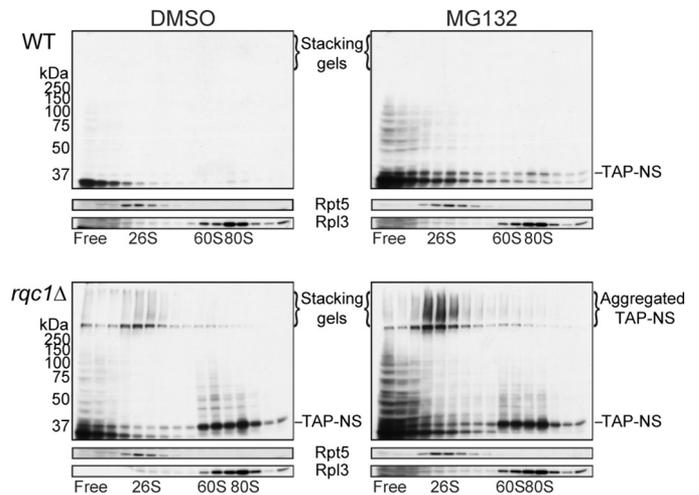


FIGURE 7. Aberrant protein aggregates are eliminated by the proteasome. Polysome extracts prepared from wild-type and *rqc1Δ* cells expressing the TAP-NonStop reporter and previously treated with the proteasome inhibitor MG132 or with DMSO as a negative control were separated on a sucrose gradient (10–50%). Both strains are deleted for *ERG6*. Fractions of the gradient were TCA-precipitated, separated on a 10% acrylamide gel, and analyzed by Western blotting using antibodies against the TAP-NonStop (PAP), mouse polyclonal against Rpl3 (1/5,000), and rabbit polyclonal against Rpt5 from Biomol (1/5,000) as loading controls and indicators of the ribosomal and the proteasomal fractions, respectively. Aggregated forms of the TAP-NonStop accumulating in the stacking gel are annotated. *NS*, NonStop.

sharp contrast, an MG-132 treatment of *rqc1Δ* cells increased the amount of aberrant protein aggregates visible in the stacking gel in comparison with the nontreated control (Fig. 7, bottom row), which demonstrates that aberrant protein aggregates that appear in the absence of Rqc1 are, at least in part, degraded by the proteasome.

Protein Aggregates Accumulating in *rqc1Δ* Cells Contain Aggresome-specific Chaperones—Several deposits of cytosolic protein aggregates involving distinct molecular chaperones have been described in yeast (26–28). To investigate toward which type of protein deposit the proteins aggregating in the absence of Rqc1 were addressed, we sought to determine what proteins could be identified in these aberrant protein aggregates. We thus isolated proteins from wild-type and *rqc1Δ* cells, migrated these samples on a polyacrylamide gel, extracted the proteins that were retained in the stacking gel (Fig. 8A), and analyzed these samples by label-free quantitative mass spectrometry. Protein identifications by LC-MS/MS and their relative label-free quantification revealed significant enrichment of ubiquitin, the co-chaperones Sis1 and Sgt2, and their associated chaperones Ssa1 and Ssa2 (29), as well as Hsp82 in the stacking gel of the *rqc1Δ* sample compared with the wild type (Fig. 8B and supplemental Data Set S1). Remarkably, all these factors were found in a previous study that characterized the proteins located in the aggresome after expression of Huntingtin exon 1 with an expanded polyglutamine domain in yeast (27), suggesting that aggregates of aberrant proteins that accumulate in the absence of Rqc1 are targeted to cytosolic aggresome-like compartments.

To confirm the presence of these aggresome-related chaperones identified by mass spectrometry in aberrant protein aggregates, we performed Western blotting using anti-Sis1 antibodies and analyzed the accumulation of Sis1 in both stacking and

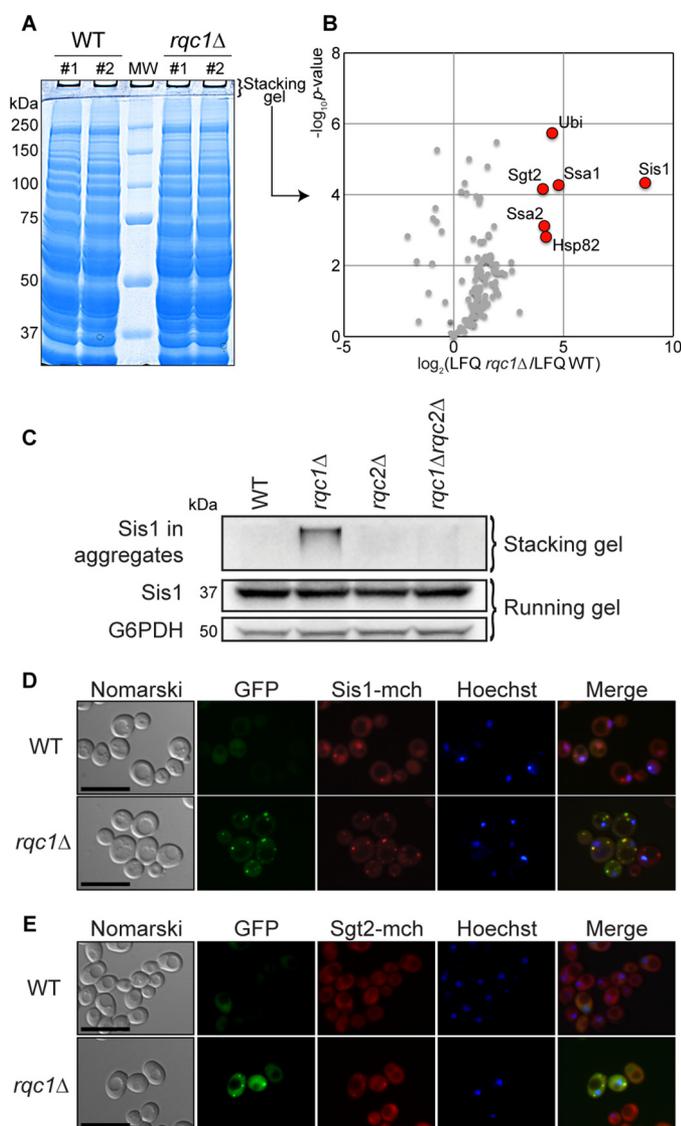


FIGURE 8. Protein aggregates accumulating in *rqc1*Δ cells contain aggresome-specific chaperones. *A*, protein extracts from wild-type and *rqc1*Δ cells were migrated on a polyacrylamide gel prepared with a 3-mm-thick stacking gel and stained with Coomassie Blue. *B*, proteins identified by label-free quantitative mass spectrometry in the stacking gel of *rqc1*Δ cell extracts were compared with the WT strain. The volcano plot shows the fold change (\log_2 LFQ *rqc1*Δ/LFQ WT) on the x axis and the *p* value distribution ($-\log_{10} p$ value) on the y axis for the quantified proteins, calculated using the Student's *t* test. Each circle indicates an identified protein. The red circles represent the significantly enriched candidates (*p* value ≥ 0.05). *C*, total protein extracts from wild-type, *rqc1*Δ, *rqc2*Δ, and *rqc1*Δ*rqc2*Δ cells were separated on 10% polyacrylamide gels. Analyses by Western blotting were performed using rabbit polyclonal antibodies against Sis1 (1/1,000) and G6PDH for loading control. Fractions of Sis1 migrating in the stacking gel or the running gel are specified with curly brackets. *D*, WT and *rqc1*Δ Hoechst-stained strains containing a genomic Sis1-mCherry fluorescent fusion and expressing the GFP-NonStop reporter plasmid were analyzed by fluorescence microscopy. Yeast cells are displayed in the left column (Nomarski); GFP, mCherry, and Hoechst fluorescent signals are shown in the middle columns; and a merge is displayed in the right column. Scale bars, 5 μm . *E*, same as *D* using a genomic Sgt2-mCherry fluorescent fusion.

running gels from wild-type, *rqc1*Δ, *rqc2*Δ, and *rqc1*Δ*rqc2*Δ strains. Whereas the abundance of Sis1 migrating in the running gel was comparable in all these strains, in the absence of Rqc1 (Fig. 8C), we detected a fraction of Sis1 retained in the stacking gel, which resembles the migration profile observed for the TAP-NonStop aberrant reporter in Fig. 1. These stack-

ing gel-retained forms of Sis1 were not visible for the wild-type, *rqc2*Δ, and *rqc1*Δ*rqc2*Δ strains (Fig. 8C), revealing that the presence of Sis1 in stacking gels depends on the activity of Rqc2, as previously observed for TAP-NonStop protein aggregates (Figs. 1B and 3).

Finally, we analyzed the co-localization of Sis1 and Sgt2 with aberrant protein aggregates by fluorescence microscopy by expressing the GFP-NonStop reporter together with fluorescent fusions of these co-chaperones (Sis1-mCherry and Sgt2-mCherry, respectively). In wild-type cells, Sis1-mCherry was more abundant in the nucleus than in the cytosol, whereas Sgt2-mCherry was mainly observed in the cytosol but excluded from the nucleus and the vacuole, according to a merge with nucleus staining (Fig. 8, *D* and *E*). As expected, the GFP-NonStop fluorescent signal was weak, and no green foci could be observed in wild-type conditions. In sharp contrast, deletion of *RQC1* led to an increase of the GFP-NonStop fluorescent signal and to the presence of green cytosolic foci (as observed in Fig. 2), as well as the appearance of red foci for both Sis1-mCherry and Sgt2-mCherry that co-localized with the GFP-NonStop cytosolic aggregates (Fig. 8, *D* and *E*) (note that red foci were also visible for Sis1-mCherry in the wild-type strain, but to a lesser extent than in the *rqc1*Δ mutant). These results show that Sis1-mCherry and Sgt2-mCherry are specifically recruited to aberrant protein cytosolic aggregates when Rqc1 is impaired. Furthermore, the absence of Rqc1 and the presence of GFP-NonStop aggregates seem to alter the cellular localization of Sis1-mCherry that was not as abundant in the nucleus as in the wild type and relocated in cytosolic protein aggregates (Fig. 8D). Taken together, these results confirm that the co-chaperones Sis1 and Sgt2 are indeed recruited to aberrant protein aggregates that accumulate in the absence of Rqc1 and suggest that aberrant peptides may be targeted to aggresome-like structures when their efficient proteasomal targeting by the RQC complex is impaired.

Discussion

Previous studies identified the Ribosome-bound Quality Control complex as a multiprotein complex that binds stalled 60S ribosomal particles to ubiquitylate aberrant nascent peptides that are subsequently addressed to the proteasome for degradation (13, 14). More recently, a structural study of the RQC complex revealed the Rqc2 function in the addition of CAT-tails to aberrant nascent peptides before their extraction from stalled 60S particles, a process essential to trigger the Hsf1 response to translational stress (17). In this article we showed that Rqc1, Ltn1, and Cdc48 are essential to prevent the aggregation of aberrant nascent peptides (Figs. 1B, 4, and 5). Furthermore, the increased accumulation of aggregated proteins in ribosomal fractions of a polysome gradient observed in the absence of both Rqc1 and Cdc48 suggests that a deficiency in Cdc48 recruitment to stalled 60S particles—and therefore in efficient proteasomal escort of aberrant substrates—is the cause for aberrant protein aggregation (Fig. 4). Interestingly, a deletion of *RQC2* could suppress this aggregation phenomenon (Fig. 1B), and complementation with an Rqc2 mutant that is functional for aberrant peptide degradation but nonfunctional for CAT-tail addition revealed that the presence of CAT-tails

Prevention of Aberrant Protein Aggregation

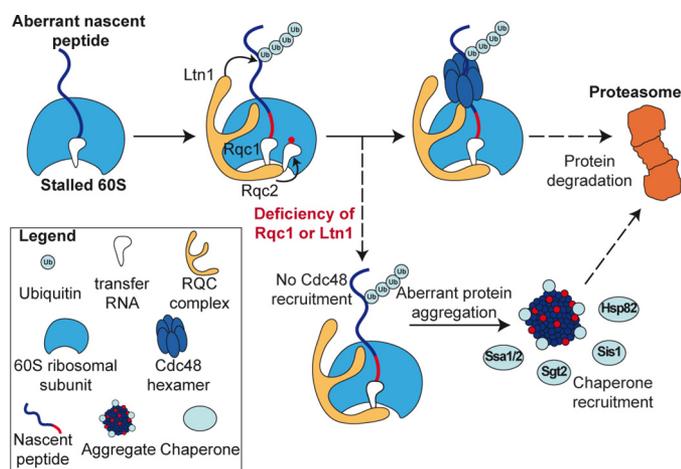


FIGURE 9. Model for the mechanism of aberrant protein aggregation, recognition, and proteasomal degradation in the absence of Rqc1 or Ltn1. Aberrant nascent peptides are recognized at the 60S level by the RQC complex, which enables its polyubiquitylation by Ltn1 and CAT-tail addition by Rqc2. Rqc1 is then essential for the recruitment of a Cdc48 hexamer to extract the peptide from the 60S exit tunnel and escort it to the proteasome for degradation. The absence of Rqc1 or Ltn1 causes a defect in Cdc48 recruitment, which results in CAT-tail-dependent protein aggregation. These cytosolic aggregates are recognized by specific co-chaperones (Sis1 and Sgt2) and chaperones (Ssa1, Ssa2, and Hsp82). Eventually, aggregated species of aberrant proteins are also eliminated by the proteasome.

on aberrant proteins is a *sine qua non* condition for their aggregation (Fig. 3). Finally, our biochemical analysis of these aggregates revealed that they contain Ltn1-dependent polyubiquitin chains (Fig. 6), are eliminated by the proteasome (Fig. 7), and are recognized by specific co-chaperones (Sis1 and Sgt2) and their associated chaperones (Fig. 8), suggesting that aberrant protein aggregates may be addressed toward cytosolic aggresome-like structures (27) when RQC complex substrates are not efficiently targeted to the proteasome by Cdc48 hexamers (see model in Fig. 9).

Whereas the only previously described role of Rqc1 is to recruit Cdc48 hexamers on stalled 60S particles (14), our study reveals another important function of Rqc1, in preventing the accumulation of aberrant protein aggregates (Figs. 1B and 2). However, because a depletion of Cdc48 also leads to protein aggregate accumulation, it is possible that the aggregation phenotype observed in the *rqc1Δ* strain is mainly due to a defect in Cdc48 recruitment to stalled 60S subunits in this mutant. In this model, Rqc1 could act as a structural adaptor between the Cdc48 hexamer and the stalled 60S, but one cannot exclude the possibility that the role of Rqc1 in Cdc48 recruitment to stalled 60S particles is indirect, for example, by modifying the structural conformation of the stalled 60S to facilitate Cdc48 binding, or via the recruitment of other as yet unidentified factors. Another hypothesis is that, independently from its function in Cdc48 recruitment, Rqc1 has a direct function in protein aggregate prevention, such as a “chaperone-like” activity or by recruiting chaperones on the stalled 60S, which could explain why the combination of a Cdc48 depletion with an *RQC1* deletion drastically increases the amount of aberrant protein aggregates compared with the amounts of aggregates observed in the respective single mutants (Fig. 4). Thus, further research may shed light on the precise role of Rqc1 and Cdc48 in the prevention of aberrant protein aggregation.

Concerning the AAA-ATPase Cdc48, whereas our results clearly demonstrate its importance to prevent the accumulation of aberrant protein aggregates (Fig. 4), one may wonder whether the aggregation phenotype observed upon Cdc48 depletion is due to the chaperone function of this homohexamer or due to a slowdown in the proteasomal escort of aggregation-prone aberrant nascent peptides. Indeed, because Cdc48 has been described as a “ubiquitin-selective chaperone” (30), it is possible that once recruited to stalled 60S particles, the Cdc48 hexamer protects the nascent peptide from aggregating until this substrate is properly delivered to the proteasome to be degraded. This possibility of a ubiquitin-selective chaperone role for Cdc48 in association with the RQC complex would be coherent with our data showing that ubiquitylation of aberrant nascent peptides by Ltn1 promotes their aggregation in the absence of Rqc1 (Figs. 5 and 6). However, because Cdc48 is essential to escort aberrant nascent peptides to the proteasome for degradation (19, 31), the fact that aberrant misfolded proteins accumulate in a polyubiquitylated state upon Cdc48 depletion (14), without being efficiently escorted and degraded by the proteasome, could also explain by itself this aggregation phenotype, regardless of a specific chaperone function of Cdc48 hexamers.

There is a remarkable correlation between the accumulation of aberrant protein aggregates and the triggering of Hsf1 response: indeed, both phenomena arise in the absence of Rqc1 or Ltn1 (Ref. 13 and this study) and require CAT-tail addition by Rqc2 (17). In parallel, proteomic analysis of aggregates enabled us to identify several factors, including Hsp82, whose expression was previously shown to increase upon Hsf1 response (32). Altogether, these results suggest that there could be a functional link between the accumulation of CAT-tails on aberrant peptides, the aggregation of these peptides, and the activation of the Hsf1 response to translational stress to express specific chaperones that may participate in limiting the expansion of potentially toxic aggregates. Conversely, Hsf1 activation by the accumulation of CAT-tails could be an essential step to initiate aggregate formation via the expression of Hsf1-induced chaperones (such as Hsp82) and the relocalization of the co-chaperones Sis1 and Sgt2 to cytosolic foci, as observed in Fig. 8. In this second scenario, the formation of aggresome-like structures in the cytosol could therefore be a cellular stress response that enables the storage of defective proteins that cannot be efficiently degraded by the proteasome, therefore participating in the maintenance of protein homeostasis (3, 21). Finally, although our study underlines the importance of CAT-tail addition to aberrant peptides by Rqc2 for their subsequent aggregation in the absence of Rqc1 (Fig. 3), the biochemical process by which C-terminal alanine-threonine nontemplated sequences cause protein aggregation remains unknown. It is possible that the nonfolded nature of these amino acid stretches triggers the aggregation of the targeted protein, as previously described in the case of polyalanine repeat expansions within specific transcription factors (33). Further characterization of the biochemical properties of CAT-tail-containing proteins could deter-

mine how these extensions cause aberrant proteins to aggregate when they are not efficiently degraded.

In conclusion, studies focused on the RQC complex revealed that its function is not limited to polyubiquitylation and proteasomal targeting of aberrant translation products. Indeed, the RQC complex also features important roles in Hsf1 response activation (13), CAT-tail addition to nascent peptides (17), and prevention of cytosolic aggregates (this study) and is therefore a pivotal element of the eukaryotic protein homeostasis maintenance machinery.

Author Contributions—Q. D., E. Z., J. M., and M. F.-R. performed and analyzed the experiments. A. N. generated and analyzed the mass spectrometry data. Q. D., M. F.-R., and A. J. designed the study. Q. D. and M. F.-R. wrote the paper. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgments—We thank Onn Brandman for providing RQC2- and RQC2_{aaa}-containing plasmids and Véronique Albanèse and Jonathan Warner for providing the anti-Sis1 and anti-Rpl3 antibodies, respectively. We thank Antonia Doyen for yeast strain construction, Frank Feuerbach for helpful advice in fluorescence microscopy and all the members of the lab for discussions and criticism on the manuscript. We are grateful to the proteomics platform of the Pasteur Institute for the availability of the Orbitrap Velos.

References

- Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010) The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell* **40**, 253–266
- Johnston, J. A., Ward, C. L., and Kopito, R. R. (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* **143**, 1883–1898
- Kopito, R. R. (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* **10**, 524–530
- Frischmeyer, P. A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrierio, A. L., Parker, R., and Dietz, H. C. (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* **295**, 2258–2261
- van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., and Parker, R. (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* **295**, 2262–2264
- Doma, M. K., and Parker, R. (2006) Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561–564
- Dimitrova, L. N., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009) Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* **284**, 10343–10352
- Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2007) Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in NonStop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev.* **21**, 519–524
- LaRiviere, F. J., Cole, S. E., Ferullo, D. J., and Moore, M. J. (2006) A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol. Cell* **24**, 619–626
- Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., and Ohno, M. (2012) 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. *EMBO J.* **31**, 2579–2589
- Shoemaker, C. J., and Green, R. (2011) Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, E1392–E1398
- Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., and Inada, T. (2012) Dom34:Hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* **46**, 518–529
- Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C. C., Li, G.-W., Zhou, S., King, D., Shen, P. S., Weibezahn, J., Dunn, J. G., Rouskin, S., Inada, T., Frost, A., and Weissman, J. S. (2012) A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* **151**, 1042–1054
- Defenouillère, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2013) Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 5046–5051
- Bengtson, M. H., and Joazeiro, C. A. (2010) Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* **467**, 470–473
- Lyumkis, D., Oliveira dos Passos, D., Tahara, E. B., Webb, K., Bennett, E. J., Vinterbo, S., Potter, C. S., Carragher, B., and Joazeiro, C. A. (2014) Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 15981–15986
- Shen, P. S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., Larson, M. H., Cox, J., Cheng, Y., Lambowitz, A. M., Weissman, J. S., Brandman, O., and Frost, A. (2015) Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* **347**, 75–78
- Shao, S., Brown, A., Santhanam, B., and Hegde, R. S. (2015) Structure and assembly pathway of the ribosome quality control complex. *Mol. Cell* **57**, 433–444
- Verma, R., Oania, R. S., Kolawa, N. J., and Deshaies, R. J. (2013) Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *eLife* **2**, e00308
- Brandman, O., and Hegde, R. S. (2016) Ribosome-associated protein quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **23**, 7–15
- Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 777–788
- Kushnirov, V. V. (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**, 857–860
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., and Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., and Séraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1030–1032
- Rott, R., Szargel, R., Haskin, J., Shani, V., Shainskaya, A., Manov, I., Liani, E., Avraham, E., and Engelender, S. (2008) Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 3316–3328
- Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008) Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* **454**, 1088–1095
- Wang, Y., Meriin, A. B., Zaarur, N., Romanova, N. V., Chernoff, Y. O., Costello, C. E., and Sherman, M. Y. (2009) Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. *FASEB J.* **23**, 451–463
- Miller, S. B., Ho, C.-T., Winkler, J., Khokhrina, M., Neuner, A., Mohamed, M. Y., Guilbride, D. L., Richter, K., Lisby, M., Schiebel, E., Mogk, A., and Bukau, B. (2015) Compartment-specific aggresomes direct distinct nuclear and cytoplasmic aggregate deposition. *EMBO J.* **34**, 778–797
- Lu, Z., and Cyr, D. M. (1998) Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the hsp40 co-chaperones Sis1 and Ydj1. *J. Biol. Chem.* **273**, 27824–27830
- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., and Jentsch, S. (2001) Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* **107**, 667–677
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegge, C., and Jentsch, S. (2005) A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* **120**, 73–84
- Morano, K. A., Santoro, N., Koch, K. A., and Thiele, D. J. (1999) A transactivation domain in yeast heat shock transcription factor is essential for cell cycle progression during stress. *Mol. Cell Biol.* **19**, 402–411
- Albrecht, A. N., Kornak, U., Böddrich, A., Süring, K., Robinson, P. N., Stiege, A. C., Lurz, R., Stricker, S., Wanker, E. E., and Mundlos, S. (2004) A molecular pathogenesis for transcription factor associated poly-alanine tract expansions. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2351–2359

Discussion et perspectives

Je me suis intéressée à trois facteurs protéiques, Jlp2, Tac4 et Ska1, durant ma thèse. Cependant, j'ai consacré ma dernière année à l'étude de Ska1 qui a abouti à des résultats particulièrement intéressants. C'est pourquoi je vais détailler plus amplement cette étude dans cette partie.

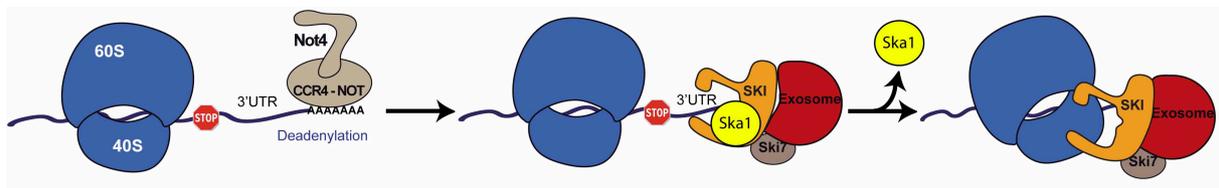
I – Ska1 et la dégradation des transcrits

I. 1. Le sous-complexe SKI-Ska1 est impliqué dans la dégradation des transcrits dépourvus de ribosomes.

Le complexe SKI est un co-facteur de l'exosome cytoplasmique impliqué dans les voies de dégradation des ARN messagers canoniques et aberrants à partir de leur extrémité 3'. Récemment, il a été montré, par les équipes de Roland Beckmann, d'Elena Conti, et mon laboratoire d'accueil, que le complexe SKI était lié au ribosome, au niveau de la sous-unité 40S, de préférence lorsque l'extrémité 3' de l'ARN en cours de traduction dépasse (Schmidt et al., 2016). Ces observations sont en parfait accord avec la dégradation des ARN messagers aberrants, sachant que celle-ci s'effectue de manière co-translationnelle.

La question initiale était de mieux comprendre comment le complexe SKI intervenait dans la dégradation des ARN messagers aberrants. Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord purifié par affinité le complexe SKI et identifié un nouveau facteur associé physiquement au complexe SKI que nous avons appelé Ska1. Une analyse quantitative des complexes purifiés par spectrométrie de masse a montré que Ska1 était associé à un sous-ensemble du complexe SKI (**Figure 1** dans Zhang et al, en cours). Les tests fonctionnels que j'ai réalisés m'ont permis de montrer que Ska1 n'était pas impliqué dans la dégradation des ARN messagers aberrants (**Figure S4** dans Zhang et al, en cours). En revanche, j'ai pu montrer, à l'aide de gènes reporteurs spécifiques que Ska1 était impliqué dans la dégradation générale des ARN messagers à partir de leur extrémité 3' (**Figure 5** dans Zhang et al, en cours). Un lien synthétique létal observé entre *DCP2* et *SKA1* est en accord avec cette observation (**Figure S1** dans Zhang et al, en cours). Nous avons également mis en évidence qu'une association de Ska1 avec les ribosomes existait mais de façon indirecte, plus précisément par

l'intermédiaire d'ARN messagers. (**Figure 4** dans Zhang et al, en cours) Ces résultats suggèrent donc que le complexe SKI existe sous forme de deux complexes différents, l'un associé directement au ribosome, l'autre associé à Ska1 et à l'ARN. Cette observation est particulièrement intéressante et importante car elle permettrait de lever un paradoxe existant dans le mécanisme de dégradation des ARN messagers de l'extrémité 3' vers le 5'. En effet, les données de structure montrant le complexe SKI directement associé aux ribosomes en cours de traduction (Schmidt et al., 2016), indiquaient que cette voie de dégradation s'effectue de manière co-translationnelle comme c'est le cas pour la voie de dégradation de 5' vers 3' (Pelechano et al., 2015), mais ces données n'expliquaient pas comment l'exosome associé au complexe SKI pouvait dégrader les régions 3'-UTR non-traduites et généralement dépourvues de ribosomes. L'ensemble de nos résultats nous a permis de construire un modèle qui résout ce paradoxe.



Selon ce modèle, la dégradation générale des ARN messagers s'effectuerait en deux étapes. Après la déadénylation des ARN messagers, une première étape impliquerait le sous-complexe SKI-Ska1 pour dégrader les séquences dépourvues de ribosomes. Elle serait ensuite suivie d'une étape où le complexe SKI-Ska1 atteint une région codante. Lorsque le complexe SKI-Ska1 rencontre un ribosome, Ska1 quitterait le complexe pour permettre au ribosome de se lier au complexe SKI, continuant ainsi la dégradation de l'ARN messager. Aucune donnée expérimentale pour le moment nous permet de l'affirmer mais il serait possible que cette rencontre entre le complexe SKI-Ska1 et le ribosome entraîne le blocage du ribosome sur l'ARN messager comme dans le cas aberrant du NGD. Pour valider notre modèle, j'ai surexprimé *SKA1*, qui est normalement peu abondant dans les cellules. Cette surexpression a entraîné une accumulation de peptides aberrants NonStop (**Figure 10** dans Zhang et al, en cours) indiquant que la surexpression de *SKA1* a monopolisé une quantité plus importante de complexe SKI non associé au ribosome, entraînant ainsi un défaut dans les voies de surveillance NSD. Ce résultat est en parfait accord avec notre modèle. Ska1 et le ribosome seraient donc en compétition pour la liaison avec le complexe SKI.

1. 2. Le sous-complexe SKI-Ska1 est impliqué dans la dégradation des XUT et des SUT.

Nos données de RNA-Seq permettant d'identifier l'extrémité 3' des transcrits révèlent qu'en absence de *SKI2* ou de *SKA1*, les transcrits pervasifs de type XUT ou SUT s'accumulent lorsque la voie de dégradation de 5' vers 3' est affectée (**Figure 8** dans Zhang et al, en cours). Une fois de plus, ce résultat soutient notre modèle puisque ces transcrits sont dépourvus de ribosomes. De plus, ces données à grande échelle révèlent que des substrats du NMD tels que les XUT et les SUT (Malabat et al., 2015) peuvent être les cibles de l'exosome/SKI lorsque la voie 5' est affectée. Ceci avait déjà été suggéré en 2003 par les groupes de Tollervey (Mitchell and Tollervey, 2003) et Katada (Takahashi et al., 2003).

Ces résultats sont très encourageants, cependant ils nécessitent d'être répétés et vérifiés par des expériences supplémentaires. Les banques en 3' des ARN doivent être construites de nouveau, d'une part, avec les souches simples et doubles mutantes et d'autre part pour obtenir plus de profondeur de séquence, de manière à pouvoir faire une analyse statistique solide. De plus, des cibles identifiées de la dégradation par le complexe SKI-Ska1 devront être vérifiées par Northern Blot.

1. 3. Le complexe SKI-Ska1 s'assemble de façon co-translationnelle.

Les expériences de RIP-Seq montrent que les protéines Ska1 et Ski3 ne sont pas associées à une population particulière d'ARN messagers, leur action se ferait donc de manière globale, comme le propose notre modèle. Cependant, nous avons pu observer que les ARN messagers de *SKA1* et de *SKI3* sont les plus enrichis lors de l'immunoprécipitation de la protéine Ska1-TAP alors que lors de l'immunoprécipitation de Ski3-TAP, ce sont les ARN messagers de *SKA1* et de *SKI7* qui sont enrichis (**Figure 7** dans Zhang et al, en cours). Cet enrichissement préférentiel des ARN messagers de *SKA1* et du complexe SKI suggère que l'assemblage entre Ska1 et le complexe SKI s'effectuerait de manière co-translationnelle. De plus, l'enrichissement important des ARN messagers de *SKI3* avec Ska1 et inversement suggère une interaction directe entre ces deux protéines. La traduction s'effectuant à partir de la région N-terminale, il est également possible que la liaison de ces protéines impliquent cette région N-terminale. Un tel assemblage pendant la traduction avait été observé pour la première fois en 2011

(Duncan and Mata, 2011), il existe pour le moment seulement quelques cas recensés (Wells et al., 2015; Natan et al., 2017). Chez les procaryotes, les systèmes d'opéron permettent la traduction de plusieurs facteurs protéiques à partir d'un même ARN, permettant ainsi un assemblage rapide et parfaitement ordonné. Chez les eucaryotes, les protéines sont synthétisées à partir de gènes différents et séparés, nous avons aujourd'hui peu de données sur la façon dont les protéines d'un complexe sont transportées et assemblées, surtout pour des protéines qui sont peu exprimées. Assembler les complexes de façon co-traductionnelle pourrait donc pallier à ce problème. De plus, dans notre cas, le complexe SKI existe sous deux formes : il peut interagir avec Ska1 ou le ribosome. Avec cet assemblage co-traductionnel, Ska1 pourrait donc s'associer rapidement au complexe SKI. L'interaction directe prédite entre Ska1 et Ski3 reste à démontrer.

1. 4. Recherche d'homologues.

Aucun homologue n'est connu pour Ska1 pour le moment, pourtant, connaître un homologue de Ska1 pourrait nous en apprendre un peu plus sur sa fonction. En revanche, les homologues structuraux respectifs chez les mammifères des facteurs Ski2, Ski3 et Ski8 sont SKIV2L, TTC37 et WDR6. Différents travaux ont mis en évidence que : *(i)* dans un gradient de sucrose, SKIV2L sédimente dans les fractions ribosomales, polysomales et 40S (Qu et al., 1998), *(ii)* des données à grande échelle d'interactions entre protéines montrent des liens physiques entre Ski2/SKIV2L et Ski3/TTC37, entre Ski2/SKIV2L et les homologues de Xrn1, Rrp6 et Rrp41, et entre Ski3/TTC37 et les homologues de Rrp41, Rli1 et Cul3 (Wan et al., 2015), *(iii)* il a été montré que des mutations dans les gènes Ski2/SKIV2L et Ski3/TTC37 sont à l'origine du syndrome tricho-hépat-entérique responsable d'une maladie infantile se manifestant par des diarrhées permanentes, des déformations faciales, une fragilité capillaire et pouvant également entraîner des maladies hépatiques (Fabre et al., 2012; Lee et al., 2016). L'ensemble de ces résultats montrent que les interactions des homologues SKIV2L et TTC37 semblent conservées et que des mutations dans les gènes *SKI2/SKIV2L* et *SKI3/TTC37* entraînent un même phénotype. Tous ces éléments témoignent donc en faveur de l'existence d'un « complexe SKI » ayant une fonction similaire chez les mammifères. Récemment, l'équipe de Wakita a découvert que la liaison de Ski2/SKIV2L à l'ARN messager HBV-X était indispensable pour la dégradation du transcrit par

l'exosome (Aly et al., 2016), il s'agit de la première preuve que, chez les mammifères, Ski2/SKIV2L aurait un rôle similaire à Ski2 chez la levure, ouvrant le champ vers des études futures. Il serait intéressant de voir s'il existe un modèle SKI-Ska1 chez les mammifères, il pourrait d'une part valider notre modèle et d'autre part, il nous permettrait de connaître l'homologue mammifère de Ska1. Des expériences de cryo-microscopie électronique, en collaboration avec l'équipe de Roland Beckmann, sont actuellement en cours pour obtenir une structure de ce sous-complexe SKI-Ska1.

II – Tac4 et le devenir des ribosomes non dissociés ?

La traduction peut être divisée en quatre étapes principales : l'initiation, l'élongation, la terminaison et le recyclage des ribosomes. Bien que le processus général de traduction soit aujourd'hui largement connu, ce sont surtout les étapes d'initiation et d'élongation qui ont été les plus étudiées, pensant qu'il s'agissait des étapes limitantes pour une traduction efficace. Néanmoins, les étapes de terminaison et de recyclage des ribosomes sont essentielles, d'une part, pour le maintien de l'homéostasie des ribosomes, et d'autre part, car ce sont à ces étapes qu'interviennent les contrôle-qualités liés à la traduction. En effet, dans un cas canonique, lorsque le codon STOP est reconnu, le peptide néosynthétisé va être libéré, les sous-unités ribosomales vont être dissociées et l'ARN messenger traduit va être à son tour libéré. Ces étapes permettent donc le recyclage des sous-unités 40S et 60S ribosomales. Mais, des travaux récents ont montré que lorsque la dissociation des deux sous-unités ribosomales est affectée, les ribosomes 80S pourraient se retrouver bloqués dans les régions 3'-UTR des ARN messagers traduits. Ce phénomène étant amplifié lors d'une déplétion de *RLI1* ou une délétion de *DOM34* (Young et al., 2015). Il existerait deux populations de ribosomes bloqués en 3'-UTR : (i) les ribosomes non-recyclés qui scannent les 3'-UTR des ARN messagers et qui nécessitent l'intervention de facteurs de sauvetage des ribosomes Dom34 et Hbs1 et (ii) les ribosomes capables de réinitier la traduction à partir de n'importe quel codon et qui sont pris en charge par les facteurs de terminaison classiques lorsque le prochain codon STOP est rencontré.

Le facteur protéique Tac4 que j'ai étudié durant ma thèse pourrait avoir un rôle dans le sauvetage des ribosomes bloqués dans les 3'-UTR des ARN messagers. J'ai pu montrer, grâce à la méthode de CRAC, avec l'aide de Gwenaël Badis-Bréard, que Tac4

était lié aux ribosomes au niveau de la sous-unité 40S ribosomale. Cette liaison s'effectue près du tunnel d'entrée des ARN messagers et plus précisément Tac4 lierait directement l'hélice h16 de l'ARN ribosomique 18S (**Figure 37**). Ce résultat est en accord avec les données initiales du laboratoire montrant que Tac4 est associé aux ribosomes avec une préférence pour la 40S (**Figure 34**). De plus, l'orthologue putatif de Tac4 chez les mammifères, DHX29 lie la même hélice h16 de l'ARN ribosomique 18S de la sous-unité 40S, comme Tac4. Nous savons que DHX29 est une ARN hélicase impliquée dans l'initiation de la traduction pour des ARN messagers possédant une région 5'-UTR ayant une structure secondaire complexe (Pisareva et al., 2008). Tac4 aurait pu avoir cette même fonction chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* mais les expériences de CRAC ont démontré que Tac4, en plus de la liaison à l'ARN ribosomique 18S, était lié au niveau des 3'-UTR des ARN messagers. Ces observations inattendues et les données de la littérature nous ont conduit à émettre l'hypothèse que Tac4 serait impliquée dans la réinitiation de la traduction à partir de ribosomes bloqués en 3'-UTR des ARN messagers.

Au cours de cette analyse, nous nous sommes rendu compte de l'existence d'un biais de digestion dû aux RNases utilisées pendant les expériences de CRAC. En effet, les deux RNases utilisées sont la RNase A qui coupe les ARN après les C et les U et la RNase T1 qui coupe après les G. Les séquences riches en A ne sont donc pas coupées, ce qui expliquerait la quantité très importante de séquences poly(A) dans mes banques.

Cependant, ce biais de représentation ne remet pas en cause l'enrichissement des régions 3'-UTR associées à Tac4 puisqu'une analyse bioinformatique réalisée par Varun Khanna a montré qu'indépendamment des séquences contenant une région poly(A), les régions 3'-UTR restaient surreprésentées.

Sachant cela, il va être important de refaire les mêmes expériences avec la RNase I ou la « Micrococcal Nuclease » qui ne présentent pas ce biais. De plus, il sera nécessaire d'obtenir une profondeur de séquençage plus importante. Enfin, si Tac4 est associé au niveau des 3'-UTR des ARN messagers, nous pourrions, d'une part, renouveler les expériences de CRAC dans des conditions où la dissociation des ribosomes est affectée, ce qui permettrait d'augmenter les événements de réinitiation de la traduction pour déterminer les positions exactes de Tac4 sur ces ARN messagers. D'autre part, des expériences de RIP-Seq pourraient également nous permettre de déterminer si ces événements de réinitiation de la traduction ciblent des transcrits spécifiques. De plus,

des expériences de « Ribosome Profiling » dans différentes conditions (en utilisant par exemple de l'harringtonine qui va bloquer les ribosomes sur les codons de démarrage de la traduction ou encore la lactimidomycine qui bloque les ribosomes pendant la formation de la première liaison peptidique) pourraient nous permettre de mettre en évidence des éléments *cis* impliqués dans la réinitiation de la traduction.

Il pourrait également être intéressant d'effectuer des cribles génétiques GIM pour identifier des facteurs ayant des liens fonctionnels avec Tac4.

L'étude de la réinitiation de la traduction n'est pour le moment qu'à ses débuts, mais si Tac4 est un facteur protéique impliqué dans cette voie nous pourrions mieux comprendre ces mécanismes de sauvetage des ribosomes.

III – Jlp2 et la voie de détoxification ?

La protéine Jlp2 est très peu décrite dans la littérature, elle a été découverte dans notre laboratoire suite à des cribles génétiques qui ont révélé des liens de létalité synthétique entre *LTN1* et *JLP2*. Par la suite, j'ai mis en évidence des liens synthétiques létaux entre *JLP2* et les différents membres des complexes RQC et SKI lorsque la traduction est affectée (**Figure 23**). Malgré ces résultats très encourageants, je n'ai pas pu montrer l'implication de Jlp2 dans la voie de dégradation des ARN et des peptides aberrants (**Figure 25**). En revanche, des résultats préliminaires de purifications biochimiques ont montré une association de Jlp2 avec des protéines de la sous-unité 19S du protéasome et avec les protéines du complexe CCT. De plus il est intéressant de noter que cette association serait dépendante de Ltn1 (**Figure 30**). Ces résultats restent encore à confirmer, en effet, la version étiquetée 3FLAG en C-terminal de Jlp2 utilisée, bien que fonctionnelle, semble être instable et ne nous a pas permis de reproduire ces résultats de façon fiable. Il est possible que l'ajout d'une étiquette, même petite comme le 3FLAG gêne les domaines potentiellement impliqués dans les liaisons de Jlp2 avec ses partenaires protéiques. Il serait intéressant de tester les liaisons de la protéine endogène Jlp2 en utilisant un anticorps anti-Jlp2. De plus, une mise au point des conditions de purification semble nécessaire. En effet, il a été montré que les résultats et le rendement d'une purification protéique peuvent varier de façon très significative en fonction de la composition des tampons de lyse et de liaison utilisés lors de purifications par affinité (Hakhverdyan et al., 2015).

Le lien entre Jlp2 et le complexe CCT (« Chaperonin-containing TCP1 complex »), également appelé TRiC (« TCP1 Ring Complex »), que j'ai observé demeure intéressant. Le complexe CCT est un complexe de protéines chaperonnes organisées en deux anneaux identiques dos à dos, composés eux-mêmes de huit facteurs CCT1-8 (**Figure 40**). Il est très conservé au cours de l'évolution et est essentiel pour la vie cellulaire. En effet, il aiderait à la conformation d'environ 10% du protéome qui correspondraient, pour une grande partie, à des régulateurs du cycle cellulaire et des composants du cytosquelette telles que l'actine et la tubuline. Les peptides naissants d'actines et de tubulines en cours de traduction sont pris en charge dès leur sortie du tunnel du ribosome par le complexe Prefoldin GimC qui va ensuite les adresser au complexe CCT pour l'assemblage du cytosquelette (revues Spiess et al., 2004; Leitner et al., 2012; Millán-Zambrano and Chávez, 2014).

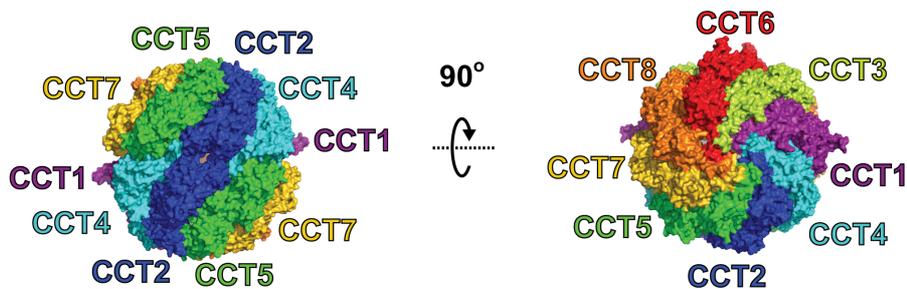


Figure 40. Structure du complexe CCT.

Vues latérales et « du dessus » du complexe CCT (Leitner et al., 2012)

Par ailleurs, les cribles GIM effectués avec le mutant de délétion *JLP2* ont également montré des liens fonctionnels entre Jlp2 et les protéines Yke2 et Bim1 (**Figure 18**). Yke2 est une sous-unité du complexe Prefoldin GimC décrit précédemment, elle participe donc au repliement de l'actine et de la tubuline (Geissler et al., 1998). Bim1 (Binding to microtubules) est une protéine associée aux microtubules, elle aurait un rôle dans le contrôle de la stabilité des microtubules pour fournir à la cellule une plateforme nécessaire à l'intégrité des filaments cellulaires (Staudt et al., 2010; Blake-Hodek et al., 2010).

Par ailleurs, il a été montré que les complexes CCT et Prefoldin GimC possèdent un rôle protecteur vis à vis de la toxicité cellulaire due à la formation d'agrégats cytoplasmiques contenant de longues séquences polyglutamines, comme celles comprises dans l'exon 1 d'une version mutée de la protéine Huntingtin (mHtt), responsable de la maladie d'Huntington. En effet, ces deux complexes chaperonnes

prennent en charge les peptides mutés mHtt à un stade précoce de leur traduction, empêchant ainsi la formation d'agrégats toxiques pour la cellule (Kitamura et al., 2006; Tam et al., 2006; Tashiro et al., 2013). Des travaux récents ont également révélé que l'E3 ubiquitine-ligase du complexe RQC, Ltn1, est un facteur-clef permettant la formation de corps d'inclusion (moins toxiques pour la vie cellulaire par rapport aux agrégats), leur ubiquitination et leur détoxification. En effet, la délétion de *LTN1* dans des cellules exprimant la version mutée mHtt entraîne une dispersion d'un corps d'inclusion en de multiples agrégats protéiques toxiques pour la cellule. Ce phénomène peut également être observé lorsque *RQC1* est délété, bien que le phénotype ne soit pas aussi important. Enfin, il semblerait que les corps d'inclusion et les agrégats cytoplasmiques soient associés au cytosquelette d'actines (Yang et al., 2016)(**Figure 41**).

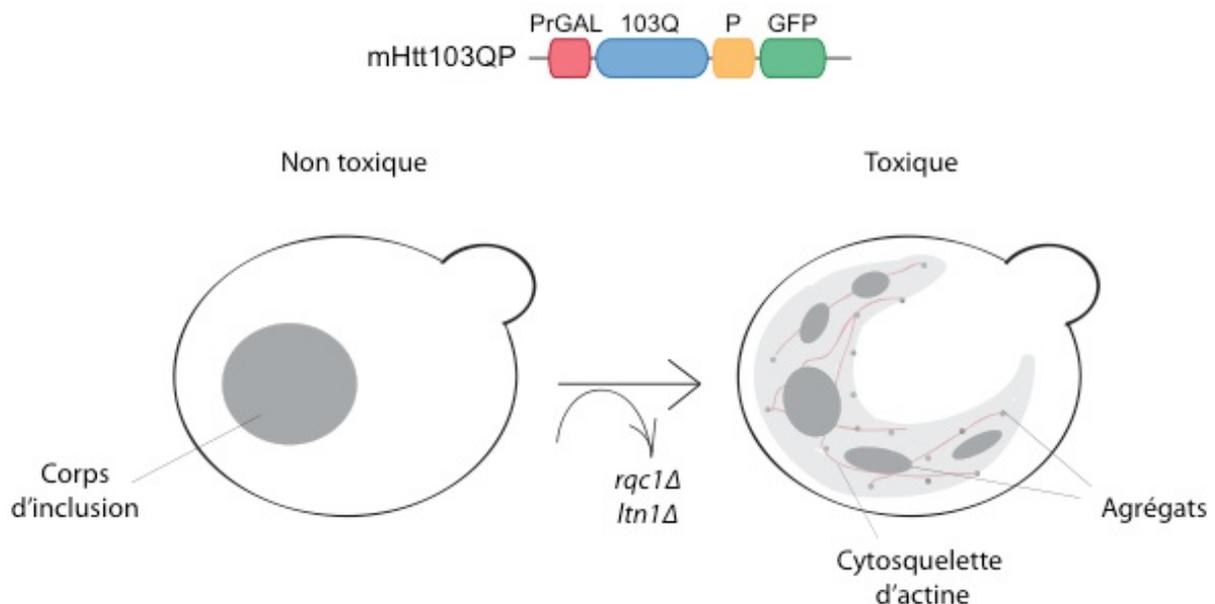


Figure 41. Délétion de *RQC1* et *LTN1* entraîne la formation d'agrégats toxiques. (A) Gène rapporteur exprimant la protéine GFP sous contrôle du promoteur GAL et contenant une expansion polyglutamine et une séquence riche en proline en N-terminal (B) Schéma représentant illustrant la dispersion du corps d'inclusion (dans un contexte sauvage) en de multiples agrégats protéiques toxiques associés au cytosquelette d'actine (en l'absence de *LTN1* ou *RQC1*).

L'ensemble de ces observations soulève donc des questions quant à l'implication de Jlp2 dans cette voie de détoxification des protéines mHtt. Il serait intéressant de tester le gène rapporteur mHtt103QP, décrit dans la **Figure 41**, dans une souche simplemutante *jlp2Δ* et dans des souches combinant la délétion de *JLP2* avec la délétion des différents membres des complexes RQC afin de déterminer si Jlp2 pourrait avoir un rôle

en lien avec le complexe RQC, non pas dans la dégradation des peptides aberrants de type NSD mais dans la voie de détoxification de protéines de type mHtt.

Matériels et méthodes

Construction de souches de levure

Les souches utilisées dans cette étude ont été construites à partir de fonds génétiques BY4741 ou BY4742 (Brachmann et al., 1998), ou à partir de souches simple-mutantes existantes, par transformation à haute efficacité de produits de PCR. La souche Tac4-CRAC a été construite à partir de souche Tac4-TAP par transformation d'une séquence « CLAP » (CBP-6His-TEV-Protéine A) à la place de l'étiquette TAP en C-terminal. Les souches utilisées sont listées dans l'**annexe 1**.

Test de croissance

Les tests en gouttes ont été effectués à partir de dilutions en série (1/10^{ème}) de cellules resuspendues dans de l'eau stérile à DO₆₀₀=0,5. Pour chaque dilution, 5µL de cellules ont été déposées sur des boîtes contenant du milieu gélosé YPGlu ou Magic-Medium -URA avec et sans hygromycine B (40µg/mL), avec ou sans doxycycline, avec ou sans auxine (100µM). Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 2 jours.

Construction de plasmide

Les plasmides pCM190-JLP2, pCM190-TAC4 et pCM190-SKA1 ont été construits à partir du vecteur pCM190. Le plasmide pCM190 ainsi que le fragment à insérer (produit de PCR ou vecteur contenant l'ORF d'intérêt) sont digérés par 2 enzymes de restriction. Le plasmide et le fragment digérés subissent une étape de ligation puis le tout est transformé par électroporation chez la bactérie *E. Coli*.

Extraction protéique et Western Blot

Méthode NaOH (Kushnirov, 2000)

Les cellules ont été cultivées à 30°C en milieu synthétique galactose-uracile jusqu'à DO₆₀₀=0,6. 5 unités de DO ont été prélevées puis les cellules ont été rincées avec de l'eau froide. Un traitement avec 100µl de NaOH (0,2M) pendant 5 minutes à température ambiante a été effectué. Après centrifugation à 14 000rpm pendant 3 minutes, le surnageant a été éliminé. Le culot a été resuspendu avec 50µL de tampon de dépôt (100mM Tris-HCl pH6,8, 20% glycérol, 0,02% bleu de bromophénol, 8% SDS, 100mM DTT).

Méthode TCA

Les cellules ont été cultivées à 30°C en milieu synthétique galactose-uracile jusqu'à $DO_{600}=0,6$. 5 unités de DO ont été prélevées puis les cellules ont été rincées avec de l'eau froide. Les cellules ont été lysées au TCA 20% avec des billes de verre dans un MagNA Lyser (Roche®) pendant 1 minute à 4 800rpm à 4°C, 3 fois. Une fois les billes de verre retombées, l'extrait a été transféré dans un nouveau tube. Les billes de verre ont été rincées avec du TCA à 5% et le nouvel extrait a été transféré avec le précédent. Le tout a été centrifugé à 14 000rpm pendant 3 minutes à 4°C. Les surnageants ont été éliminés et les culots protéiques ont été resuspendus dans 100µl de tampon de dépôt supplémenté avec 0,1M final de Tris pH9.

Western Blot

Les échantillons ont été incubés à 95°C pendant 5 minutes puis 6µL ont été déposés sur un gel de polyacrylamide 10%. La migration a été effectuée à 150V pendant environ 1 heure. Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose a été effectué avec un système de transfert semi-sec TransBlot SD de Biorad® à 10V pendant 1h30 ou à 25V pendant 10 minutes avec le TransBlot Turbo de Biorad®. La membrane a été colorée dans le Rouge Ponceau, rincée avec du PBS + Tween 1% puis bloquée dans une solution de lait à 4% dans du PBS + Tween 1% pendant 40 minutes. Selon l'anticorps utilisé, l'incubation avec l'anticorps primaire peut se faire pendant 1 ou 2h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C, avec agitation. Les anticorps utilisés sont listés dans l'**annexe 4**. Après 3 lavages de 10 minutes au PBS + Tween 1%, si l'anticorps primaire n'était pas couplé à la peroxydase, une incubation avec l'anticorps secondaire pendant 2h à température ambiante a été réalisée. Les anticorps couplés à la peroxydase ont été révélés par chemiluminescence avec le « Clarity Western ECL substrate » de Biorad® pendant 1 minute. Les temps d'exposition pour la révélation peuvent être très variables selon les anticorps utilisés.

Gradient de polysomes

200mL de cellules ont été cultivées jusqu'à $DO_{600}=0,6$. Les cellules ont été traitées avec 200µL de cycloheximide (50mg/mL) pendant 3 minutes sur glace. Les cellules ont été collectées par centrifugation pendant 10 minutes à 4 000 rpm à 4°C. Les cellules ont été

lavées avec 10mL de tampon « Breaking Buffer » (20mM Tris-HCl pH7,4, 50mM KCl, 10mM MgCl₂ et inhibiteurs de protéase Roche®). Après centrifugation pendant 5 minutes à 4 000rpm, le surnageant a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans 400µL de tampon « Breaking Buffer ». Les cellules ont été lysées avec des billes de verre dans le MagNA Lyser (Roche®) pendant 1 minute à 3 000rpm à 4°C, 3 fois. Après centrifugation à 8 000rpm pendant 5 minutes et élimination des billes de verre, l'extrait a été transféré dans un nouveau tube et centrifugé pendant 5 minutes à 14 000rpm à 4°C. Le surnageant clarifié a été transféré dans un nouveau tube et a pu être stocké à -80°C.

5 à 10 unités de DO des lysats clarifiés ont été déposés sur un gradient de sucrose 10-50% (20mM Tris-HCl pH7,4, 50mM NH₄Cl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT et inhibiteurs de protéase Roche®). Les lysats ont été ultracentrifugés à 39 000g pendant 2h45 à 4°C. Les fractions de gradient ont été collectées puis précipitées au TCA 10%, resuspendues avec 40µL de tampon de dépôt. 10µl des échantillons ont été déposés sur gel de polyacrylamide 10%. La migration du gel et le Western Blot se sont effectués comme dans la partie précédente.

Purification d'affinité

Culture

Selon l'expression de la protéine d'intérêt, les cellules peuvent être cultivées dans 2 à 6L de milieu riche YPGlu. Lorsque la DO₆₀₀=1, les cellules ont été centrifugées pendant 10 minutes à 4 000rpm à 4°C. Les culots ont été lavés avec de l'eau froide et centrifugés de nouveau pendant 5 minutes à 4 000rpm à 4°C. Les culots obtenus peuvent être conservés à -80°C.

Avec une protéine étiquetée 3FLAG

Les culots ont été resuspendus dans 10mL de tampon de lyse (50mM Tris-HCl pH7,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, inhibiteurs de protéase Roche®) pour 5g de culot. Les cellules ont été cassées avec la « French Press » à 1 200psi, 2 fois, à froid. Le lysat cellulaire a été clarifié par centrifugation pendant 20 minutes à 20 000g puis transféré dans un nouveau tube. 50µL de billes magnétiques couplés à des anticorps anti-FLAG, préalablement équilibrées avec le tampon de lyse, ont été ajoutées au lysat clarifié avec de l'IGEPAL à 0,075% final. Le lysat clarifié avec les billes magnétiques a été incubé

pendant 1h30 à 4°C sur roue. Les billes ont été récupérées et lavées 3 fois avec du tampon de lyse avec IGEPAL et 3 fois avec du tampon de lyse sans IGEPAL. L'éluion s'est effectuée dans 400µL de tampon d'éluion (50mM Tris-HCl pH7,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 100µg/mL peptide FLAG) pendant 2-3 heures à 4°C sur roue.

Avec une protéine étiquetée TAP

Les culots ont été resuspendus dans 10mL de tampon de lyse (20mM HepesK pH7,4, 100mM KOAc, 10mM MgCl₂, inhibiteurs de protéase Roche®) pour 5g de culot. Les cellules ont été cassées avec la « French Press » à 1 200psi, 2 fois à froid. Le lysat cellulaire a été clarifié par centrifugation pendant 20 minutes à 20 000g puis transféré dans un nouveau tube. 50µL de billes magnétiques couplés à des IgG, préalablement équilibrées avec le tampon de lyse, ont été ajoutées au lysat clarifié avec de l'IGEPAL à 0,075% final. Le lysat clarifié avec les billes magnétiques a été incubé pendant 40 minutes à 4°C sur roue (Oeffinger et al., 2007). Les billes ont été récupérées et lavées 3 fois avec du tampon de lyse avec IGEPAL et 3 fois avec du tampon de lyse sans IGEPAL. L'éluion s'est effectuée dans 400µL de tampon d'éluion (20mM HepesK pH7,4, 100mM KOAc, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 10µL AcTEV Life Technologie®) pendant 1h45 heures à 18°C sur roue.

Précipitation et SDS-PAGE

L'éluat a été précipité selon la méthode au méthanol/chloroforme. Les 400µL d'éluat ont été mélangés avec 800µL de méthanol, 200µL de chloroforme ont été ajoutés, et 600µL d'eau pure. Le tout a été centrifugé pendant 15-30 minutes à 13 000rpm à 4°C. La phase supérieure a été éliminée en gardant bien l'interphase puis 600µL de méthanol ont été ajoutés. Les échantillons ont été séparés en deux tubes avec ¼ dans l'un et ¾ dans l'autre et ils ont été incubés pendant une nuit à -20°C. Après centrifugation pendant 10-20 minutes à 13 000rpm à 4°C, le surnageant a été éliminé et le culot mis à sec (Wessel and Flügge, 1984). Les ¾ ont été analysés par spectrométrie de masse tandis que le ¼ a été analysé sur un gel NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris (Life Technologie®) puis coloré avec du bleu de Coomassie puis avec du Nitrate d'argent si nécessaire.

Spectrométrie de masse et analyse de données MS

Les acquisitions et analyses de données de spectrométrie de masse ont été effectuées par Abdelkader Namane. Après réduction des ponts disulfures et alcoylation des cystéines, les échantillons protéiques ont été traités successivement avec deux endoprotéases : la Lysine-C (Wako®) et trypsine (Promega®). Les peptides obtenus ont été ensuite dessalés avec des cônes OMIX C18 (Agilent Technologies®) et analysés par LC-MS/MS associant un système de nano HPLC Ultimate 3 000 à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap velos, (Thermo Fisher Scientific®). Les données de MS brutes en provenance du LTQ-Orbitrap ont été analysées avec le logiciel MaxQuant version 1.5.8.3 (Cox and Mann, 2008) qui utilise son propre moteur de recherche Andromeda pour les identifications de protéines (Cox et al., 2011). Les intensités des protéines ont été normalisées par un module interne de MaxQuant pour donner des intensités LFQ (Label Free Quantification). Le traitement statistique et quantitatif de ces données a été réalisé par le logiciel Perseus version 1.5.5.3 faisant partie de la suite MaxQuant. Seules les protéines identifiées avec un Taux de Faux Positif (False Discovery Rate, FDR) inférieur à 0,01% et un minimum de deux peptides identifiés sont éligibles pour ces analyses quantitatives. Enfin, pour distinguer spécifiquement les protéines enrichies par rapport au bruit de fond, les abondances des protéines ont été comparées entre l'échantillon et le contrôle négatif en utilisant un test statistique t de Student et les résultats ont été visualisés sous forme de volcano plots (Hubner and Mann, 2011).

Extraction d'ARN et Northern Blot

Les cellules ont été cultivées dans 30mL de milieu YPgal -URA jusqu'à $DO_{600}=0,6$, elles ont ensuite été centrifugées pendant 5 minutes à 4 000rpm à 4°C. Le culot a été lavé avec de l'eau froide, centrifugé à 14 000g pendant 2 minutes à 4°C, le surnageant a été éliminé. Les ARN des cellules collectées ont été extraits par la méthode de phénol chaud (30 minutes à 65°C). 4µg ont été dénaturés pendant 5 minutes à 65°C puis séparés sur un gel de polyacrylamide 6% pendant environ 1h à 20W. Les ARN ont été transféré sur une membrane Hybond N+ grâce à un système de transfert semi-sec pendant 1h à 10V, les ARN ont ensuite été crosslinkés aux UV à l'aide du Stratalinker. Les sondes oligonucléotidiques marquées en 5' au ^{32}P se sont hybridées sur la séquence polyG de l'ARN messager de PGK1pG ou sur l'ARN messager de SCR1.

CRAC

Selon les souches, les cellules peuvent être cultivées dans 2 à 8L de milieu YPGlu jusqu'à $DO_{600}=0,8$. Dans 10-15mL de YPGlu, les cellules ont subies une étape de crosslink aux UV (254nm) à l'aide du Stratalinker (1 600mJ/cm²) puis elles ont été congelées à -80°C. Les cellules sont resuspendues dans le « CRAC Breaking Buffer » (50mM Tris-HCl pH7,8, 150mM NaCl, 10mM MgCl₂, 5mM bêta-mercaptoéthanol, inhibiteurs de protéases Roche®) puis cassées à l'aide du MagNA Lyser pendant 90 secondes à 4°C, trois fois. La protéine étiquetée CRAC a été purifiée à l'aide de billes magnétiques couplées aux IgG. Les échantillons sont élués à l'aide de l'AcTEV Life Technologies®. Ils sont ensuite traités avec un cocktail de RNase à 0,01 unité par réaction pendant 4 minutes à 37°C. L'ajout de Guanidium-HCl à 6M final va immédiatement arrêter l'action des RNases. Une deuxième étape de purification à l'aide de billes de Nickel a été effectuée pour faciliter les étapes d'Alcaline Phosphatase, de ligation des adaptateurs aux extrémités 3', de phosphorylation et de ligation des adaptateurs contenant l'index aux extrémités 5'. Les ARN sont séparés sur le Gel Free afin de garder seulement les fragments d'intérêt. Après une étape de digestion par la Protéinase K, les ARN ont subis une étape de rétrotranscription. On obtient les banques en amplifiant les ADN complémentaires obtenus par PCR. Enfin, les banques sont séquencées en « Single-read 100 » (SR100) à la plateforme « Transcriptomique PF2 ».

RIP-Seq

Les différentes souches sont cultivées dans 6L de YPGlu jusqu'à $DO_{600}=0,6$ puis de la cycloheximide à 50µg/mL final est ajouté. Les cellules sont récoltées et congelées à -80°C. Les cellules sont cassées à l'aide de billes en verre dans le MagNA Lyser pendant 90 secondes à 3 000rpm, 2 fois. Les lysats cellulaires sont incubés avec des billes magnétiques d'IgG pour purification. L'éluion s'effectue avec 15µL d'AcTEV Life Technologies® et les ARN sont extraits avec du phénol/chloroforme pH5,2. 5µg d'ARN sont traités avec 8 unités de DNase Turbo. Les ARN ribosomiques sont déplétés grâce au kit Ribo-Zéro d'Illumina®. Les banques sont construites selon les étapes suivantes : fragmentation des ARN, synthèse du 1^{er} brin, synthèse du 2nd brin, purification des banques, ajout d'un A aux extrémités 3', ligation des adaptateurs, purification des banques et amplification par PCR suivie d'une purification des banques. Les banques

sont enfin séquencées en « Single-read 50 » (SR50) à la plateforme « Transcriptomique PF2 ».

Séquençage des bibliothèques de 3'

Préparation des bibliothèques de séquençage

Les cellules ont été cultivées dans 100mL de milieu YPGlu à 30°C jusqu'à DO=0,6 puis 50mL de chaque souche a été traitée avec de l'IAA à 100µM pendant 1h à 30°C. Les ARN ont été extraits avec la méthode de Phénol Chaud. 5µg d'ARN pour chaque souche sont déplétés en ARN ribosomiques grâce au kit « Ribo-Zéro Gold » d'Illumina ® selon le protocole fourni. La moitié des ARN déplétés de chaque souche a subi une étape d'ajout de queue-poly(A) par 5U/µl de PAP en présence de 1mM de cordycépine à 37°C pendant 1h. Les bibliothèques de 3' ont été construites grâce au kit « QuantSeq3 – 3' mRNA-Seq Library Prep Kit » de Lexogen® selon le protocole fourni. Les banques ont été séquencées en « Single-read 100 » (SR100) à la plateforme « Transcriptomique PF2 ».

Microscopie à fluorescence

Les expériences de microscopie à fluorescence ont été effectuées sur des cellules transformées avec le plasmide GFP-NonStop et cultivées sur milieu YPGal –URA puis resuspendues avec de l'eau stérile. L'ADN est coloré avec du Hoeschst 33352 (5µg/mL) pendant 5 minutes puis les cellules sont lavées 2 fois et resuspendues dans de l'eau stérile. 5µL de ces suspensions ont été placés sous une lame de verre et analysés avec un microscope à épifluorescence Leica DMRXA. Les signaux fluorescents ont été collectés avec des filtres passe-bande pour l'excitation de la GFP pendant 3 500 millisecondes, pour le mcherry pendant 800 millisecondes et du Hoescht pour 40 millisecondes. Les images acquises avec une caméra CCD refroidie ORCAII-ER contrôlée par le logiciel Openlab (version 3.5, Improvion) et traitées avec le logiciel Adobe Photoshop CS3 (version 10, Adobe).

Bibliographie

- 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.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* 13, 2148–2158.
- Altamura, N., Groudinsky, O., Dujardin, G., and Slonimski, P.P. (1992). NAM7 nuclear gene encodes a novel member of a family of helicases with a Zn-ligand motif and is involved in mitochondrial functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 224, 575–587.
- Aly, H.H., Suzuki, J., Watashi, K., Chayama, K., Hoshino, S.-I., Hijikata, M., Kato, T., and Wakita, T. (2016). RNA Exosome Complex Regulates Stability of the Hepatitis B Virus X-mRNA Transcript in a Non-stop-mediated (NSD) RNA Quality Control Mechanism. *J. Biol. Chem.* 291, 15958–15974.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D.A., Ghosh, S., and Jacobson, A. (2004). A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* 432, 112–118.
- Andersen, D.S., and Leever, S.J. (2007). The essential *Drosophila* ATP-binding cassette domain protein, pixie, binds the 40 S ribosome in an ATP-dependent manner and is required for translation initiation. *J. Biol. Chem.* 282, 14752–14760.
- Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17, 1497–1506.
- Araki, Y., Takahashi, S., Kobayashi, T., Kajihio, H., Hoshino, S., and Katada, T. (2001). Ski7p G protein interacts with the exosome and the Ski complex for 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 20, 4684–4693.
- Arribere, J.A., and Gilbert, W.V. (2013). Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome Res.* 23, 977–987.
- Atkinson, G.C., Baldauf, S.L., and Hauryliuk, V. (2008). Evolution of nonstop, no-go and nonsense-mediated mRNA decay and their termination factor-derived components. *BMC Evol. Biol.* 8, 290.
- Badis, G., Saveanu, C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2004). Targeted mRNA degradation by deadenylation-independent decapping. *Mol. Cell* 15, 5–15.
- Barthelme, D., Dinkelaker, S., Albers, S.-V., Londei, P., Ermler, U., and Tampé, R. (2011). Ribosome recycling depends on a mechanistic link between the FeS cluster domain and a conformational switch of the twin-ATPase ABCE1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3228–3233.
- 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.

- Baudrimont, A., Voegeli, S., Vilorio, E.C., Stritt, F., Lenon, M., Wada, T., Jaquet, V., and Becskei, A. (2017). Multiplexed gene control reveals rapid mRNA turnover. *Sci. Adv.* *3*, e1700006.
- Bebeacua, C., Förster, A., McKeown, C., Meyer, H.H., Zhang, X., and Freemont, P.S. (2012). Distinct conformations of the protein complex p97-Ufd1-Npl4 revealed by electron cryomicroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 1098–1103.
- Becker, T., Armache, J.-P., Jarasch, A., Anger, A.M., Villa, E., Sieber, H., Motaal, B.A., Mielke, T., Berninghausen, O., and Beckmann, R. (2011). Structure of the no-go mRNA decay complex Dom34-Hbs1 bound to a stalled 80S ribosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 715–720.
- Becker, T., Franckenberg, S., Wickles, S., Shoemaker, C.J., Anger, A.M., Armache, J.-P., Sieber, H., Ungewickell, C., Berninghausen, O., Daberkow, I., et al. (2012). Structural basis of highly conserved ribosome recycling in eukaryotes and archaea. *Nature* *482*, 501–506.
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P.W., Mayer, R.J., and Roelofs, J. (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol.* *20*, 391–401.
- Benard, L., Carroll, K., Valle, R.C., Masison, D.C., and Wickner, R.B. (1999). The ski7 antiviral protein is an EF1- α homolog that blocks expression of non-Poly(A) mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* *73*, 2893–2900.
- Bengtson, M.H., and Joazeiro, C.A.P. (2010). Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* *467*, 470–473.
- Ben-Shem, A., Garreau de Loubresse, N., Melnikov, S., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2011). The structure of the eukaryotic ribosome at 3.0 Å resolution. *Science* *334*, 1524–1529.
- Bessman, M.J., Frick, D.N., and O’Handley, S.F. (1996). The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes. *J. Biol. Chem.* *271*, 25059–25062.
- Blake-Hodek, K.A., Cassimeris, L., and Huffaker, T.C. (2010). Regulation of microtubule dynamics by Bim1 and Bik1, the budding yeast members of the EB1 and CLIP-170 families of plus-end tracking proteins. *Mol. Biol. Cell* *21*, 2013–2023.
- Boeck, R., Tarun, S., Rieger, M., Deardorff, J.A., Müller-Auer, S., and Sachs, A.B. (1996). The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J. Biol. Chem.* *271*, 432–438.
- Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. (2009). The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell* *139*, 547–559.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* *Chichester Engl.* *14*, 115–132.
- Brandman, O., and Hegde, R.S. (2016). Ribosome-associated protein quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 7–15.
- Brandman, O., Stewart-Ornstein, J., Wong, D., Larson, A., Williams, C.C., Li, G.-W., Zhou, S.,

- King, D., Shen, P.S., Weibezahn, J., et al. (2012). A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* *151*, 1042–1054.
- Braun, M.A., Costa, P.J., Crisucci, E.M., and Arndt, K.M. (2007). Identification of Rkr1, a nuclear RING domain protein with functional connections to chromatin modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 2800–2811.
- Bregues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* *310*, 486–489.
- Briggs, M.W., Burkard, K.T., and Butler, J.S. (1998). Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S rRNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.* *273*, 13255–13263.
- Brown, A.J.P. (1989). Messenger RNA stability in yeast. *Yeast* *5*, 239–257.
- Brown, C.E., and Sachs, A.B. (1998). Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6548–6559.
- Brown, J.T., Bai, X., and Johnson, A.W. (2000). The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA N. Y. N* *6*, 449–457.
- Burroughs, A.M., and Aravind, L. (2014). A highly conserved family of domains related to the DNA-glycosylase fold helps predict multiple novel pathways for RNA modifications. *RNA Biol.* *11*, 360–372.
- Butler, J.S., and Mitchell, P. (2011). Rrp6, rrp47 and cofactors of the nuclear exosome. *Adv. Exp. Med. Biol.* *702*, 91–104.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., and Young, R.A. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* *12*, 323–337.
- Celik, A., Kervestin, S., and Jacobson, A. (2015). NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie* *114*, 2–9.
- Chakrabarti, S., Jayachandran, U., Bonneau, F., Fiorini, F., Basquin, C., Domcke, S., Le Hir, H., and Conti, E. (2011). Molecular mechanisms for the RNA-dependent ATPase activity of Upf1 and its regulation by Upf2. *Mol. Cell* *41*, 693–703.
- Chamieh, H., Ballut, L., Bonneau, F., and Le Hir, H. (2008). NMD factors UPF2 and UPF3 bridge UPF1 to the exon junction complex and stimulate its RNA helicase activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 85–93.
- Charenton, C., Taverniti, V., Gaudon-Plesse, C., Back, R., Séraphin, B., and Graille, M. (2016). Structure of the active form of Dcp1-Dcp2 decapping enzyme bound to m(7)GDP and its Edc3 activator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *23*, 982–986.
- Chaudhuri, J., Si, K., and Maitra, U. (1997). Function of eukaryotic translation initiation factor 1A (eIF1A) (formerly called eIF-4C) in initiation of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* *272*, 7883–7891.
- Chavatte, L., Seit-Nebi, A., Dubovaya, V., and Favre, A. (2002). The invariant uridine of stop codons contacts the conserved NIKSR loop of human eRF1 in the ribosome. *EMBO J.* *21*, 5302–5311.
- Chen, J., Chiang, Y.-C., and Denis, C.L. (2002). CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA

- exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J.* **21**, 1414–1426.
- Chen, L., Muhlrads, D., Hauryliuk, V., Cheng, Z., Lim, M.K., Shyp, V., Parker, R., and Song, H. (2010). Structure of the Dom34-Hbs1 complex and implications for no-go decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1233–1240.
- Chen, Z.-Q., Dong, J., Ishimura, A., Daar, I., Hinnebusch, A.G., and Dean, M. (2006). The essential vertebrate ABCE1 protein interacts with eukaryotic initiation factors. *J. Biol. Chem.* **281**, 7452–7457.
- Cheng, Z., Saito, K., Pisarev, A.V., Wada, M., Pisareva, V.P., Pestova, T.V., Gajda, M., Round, A., Kong, C., Lim, M., et al. (2009). Structural insights into eRF3 and stop codon recognition by eRF1. *Genes Dev.* **23**, 1106–1118.
- Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: the exosome. *Biochim. Biophys. Acta* **1829**, 552–560.
- Choe, Y.-J., Park, S.-H., Hassemer, T., Körner, R., Vincenz-Donnelly, L., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2016). Failure of RQC machinery causes protein aggregation and proteotoxic stress. *Nature* **531**, 191–195.
- Chowdhury, A., Mukhopadhyay, J., and Tharun, S. (2007). The decapping activator Lsm1p-7p-Pat1p complex has the intrinsic ability to distinguish between oligoadenylated and polyadenylated RNAs. *RNA N. Y. N* **13**, 998–1016.
- Chowdhury, A., Kalurupalle, S., and Tharun, S. (2014). Pat1 contributes to the RNA binding activity of the Lsm1-7-Pat1 complex. *RNA N. Y. N* **20**, 1465–1475.
- Chu, J., Hong, N.A., Masuda, C.A., Jenkins, B.V., Nelms, K.A., Goodnow, C.C., Glynn, R.J., Wu, H., Masliah, E., Joazeiro, C.A.P., et al. (2009). A mouse forward genetics screen identifies LISTERIN as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2097–2103.
- Clerici, M., Mourão, A., Gutsche, I., Gehring, N.H., Hentze, M.W., Kulozik, A., Kadlec, J., Sattler, M., and Cusack, S. (2009). Unusual bipartite mode of interaction between the nonsense-mediated decay factors, UPF1 and UPF2. *EMBO J.* **28**, 2293–2306.
- Collins, G.A., and Goldberg, A.L. (2017). The Logic of the 26S Proteasome. *Cell* **169**, 792–806.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K., and Linder, P. (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**, 17–37.
- Cox, J., and Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1367–1372.
- Cox, J., Neuhauser, N., Michalski, A., Scheltema, R.A., Olsen, J.V., and Mann, M. (2011). Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J. Proteome Res.* **10**, 1794–1805.
- Crowder, J.J., Geigges, M., Gibson, R.T., Fults, E.S., Buchanan, B.W., Sachs, N., Schink, A., Kreft, S.G., and Rubenstein, E.M. (2015). Rkr1/Ltn1 Ubiquitin Ligase-mediated Degradation of Translationally Stalled Endoplasmic Reticulum Proteins. *J. Biol. Chem.* **290**, 18454–18466.
- Cui, Y., Hagan, K.W., Zhang, S., and Peltz, S.W. (1995). Identification and characterization

of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* 9, 423–436.

Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M.J., Paushkin, S.V., Han, X., Weng, Y., Perlick, H.A., Dietz, H.C., Ter-Avanesyan, M.D., and Peltz, S.W. (1998). The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.* 12, 1665–1677.

Daugeron, M.-C., Mauxion, F., and Séraphin, B. (2001). The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455.

Davidovich, C., Belousoff, M., Bashan, A., and Yonath, A. (2009). The evolving ribosome: from non-coded peptide bond formation to sophisticated translation machinery. *Res. Microbiol.* 160, 487–492.

Decker, C.J., and Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* 7, 1632–1643.

Decker, C.J., Teixeira, D., and Parker, R. (2007). Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 179, 437–449.

Decourty, L., Saveanu, C., Zemam, K., Hantraye, F., Frachon, E., Rousselle, J.-C., Fromont-Racine, M., and Jacquier, A. (2008). Linking functionally related genes by sensitive and quantitative characterization of genetic interaction profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5821–5826.

Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Frachon, E., Rispal, D., Séraphin, B., Feuerbach, F., Jacquier, A., and Saveanu, C. (2014). Long open reading frame transcripts escape nonsense-mediated mRNA decay in yeast. *Cell Rep.* 6, 593–598.

Defenouillère, Q., and Fromont-Racine, M. (2017). The ribosome-bound quality control complex: from aberrant peptide clearance to proteostasis maintenance. *Curr. Genet.*

Defenouillère, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., et al. (2013). Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 5046–5051.

Defenouillère, Q., Zhang, E., Namane, A., Mouaikel, J., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2016). Rqc1 and Ltn1 Prevent C-terminal Alanine-Threonine Tail (CAT-tail)-induced Protein Aggregation by Efficient Recruitment of Cdc48 on Stalled 60S Subunits. *J. Biol. Chem.* 291, 12245–12253.

Defenouillère, Q., Namane, A., Mouaikel, J., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2017). The ribosome-bound quality control complex remains associated to aberrant peptides during their proteasomal targeting and interacts with Tom1 to limit protein aggregation. *Mol. Biol. Cell* 28, 1165–1176.

Delan-Forino, C., Schneider, C., and Tollervey, D. (2017). Transcriptome-wide analysis of alternative routes for RNA substrates into the exosome complex. *PLoS Genet.* 13, e1006699.

Deliz-Aguirre, R., Atkin, A.L., and Kebaara, B.W. (2011). Copper tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* nonsense-mediated mRNA decay mutants. *Curr. Genet.* 57, 421–430.

- Denis, C.L., and Chen, J. (2003). The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* *73*, 221–250.
- Deshmukh, M.V., Jones, B.N., Quang-Dang, D.-U., Flinders, J., Floor, S.N., Kim, C., Jemielity, J., Kalek, M., Darzynkiewicz, E., and Gross, J.D. (2008). mRNA decapping is promoted by an RNA-binding channel in Dcp2. *Mol. Cell* *29*, 324–336.
- Dever, T.E., and Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a013706.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* *21*, 6915–6924.
- Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.* *284*, 10343–10352.
- Doamekpor, S.K., Lee, J.-W., Hepowit, N.L., Wu, C., Charenton, C., Leonard, M., Bengtson, M.H., Rajashankar, K.R., Sachs, M.S., Lima, C.D., et al. (2016). Structure and function of the yeast listerin (Ltn1) conserved N-terminal domain in binding to stalled 60S ribosomal subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E4151-4160.
- Dobson, C.M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature* *426*, 884–890.
- Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* *440*, 561–564.
- Dong, J., Lai, R., Nielsen, K., Fekete, C.A., Qiu, H., and Hinnebusch, A.G. (2004). The essential ATP-binding cassette protein RLI1 functions in translation by promoting preinitiation complex assembly. *J. Biol. Chem.* *279*, 42157–42168.
- Duncan, C.D.S., and Mata, J. (2011). Widespread cotranslational formation of protein complexes. *PLoS Genet.* *7*, e1002398.
- Dunckley, T., and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* *18*, 5411–5422.
- Dupressoir, A., Morel, A.P., Barbot, W., Loireau, M.P., Corbo, L., and Heidmann, T. (2001). Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics* *2*, 9.
- Dykxhoorn, D.M. (2005). P-bodies and RNAi: The missing link? *J. RNAi Gene Silenc. Int. J. RNA Gene Target. Res.* *2*, 105–106.
- Edfors, F., Danielsson, F., Hallström, B.M., Käll, L., Lundberg, E., Pontén, F., Forsström, B., and Uhlén, M. (2016). Gene-specific correlation of RNA and protein levels in human cells and tissues. *Mol. Syst. Biol.* *12*, 883.
- Edskes, H.K., Gray, V.T., and Wickner, R.B. (1999). The [URE3] prion is an aggregated form of Ure2p that can be cured by overexpression of Ure2p fragments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 1498–1503.
- Fabre, A., Charroux, B., Martinez-Vinson, C., Roquelaure, B., Odul, E., Sayar, E., Smith, H., Colomb, V., Andre, N., Hugot, J.-P., et al. (2012). SKIV2L mutations cause syndromic diarrhea, or trichohepatoenteric syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* *90*, 689–692.

- Finley, D. (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 477–513.
- Floor, S.N., Borja, M.S., and Gross, J.D. (2012). Interdomain dynamics and coactivation of the mRNA decapping enzyme Dcp2 are mediated by a gatekeeper tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2872–2877.
- Fourati, Z., Kolesnikova, O., Back, R., Keller, J., Charenton, C., Taverniti, V., Plesse, C.G., Lazar, N., Durand, D., van Tilbeurgh, H., et al. (2014). The C-terminal domain from *S. cerevisiae* Pat1 displays two conserved regions involved in decapping factor recruitment. *PloS One* 9, e96828.
- Frank, J., and Agrawal, R.K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. *Nature* 406, 318–322.
- Franks, T.M., Singh, G., and Lykke-Andersen, J. (2010). Upf1 ATPase-dependent mRNP disassembly is required for completion of nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* 143, 938–950.
- Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrerrio, A.L., Parker, R., and Dietz, H.C. (2002). An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295, 2258–2261.
- Frolova, L., Le Goff, X., Zhouravleva, G., Davydova, E., Philippe, M., and Kisselev, L. (1996). Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA N. Y. N* 2, 334–341.
- Frolova, L., Seit-Nebi, A., and Kisselev, L. (2002). Highly conserved NIKS tetrapeptide is functionally essential in eukaryotic translation termination factor eRF1. *RNA N. Y. N* 8, 129–136.
- Frolova, L.Y., Tsivkovskii, R.Y., Sivolobova, G.F., Oparina, N.Y., Serpinsky, O.I., Blinov, V.M., Tatkov, S.I., and Kisselev, L.L. (1999). Mutations in the highly conserved GGQ motif of class 1 polypeptide release factors abolish ability of human eRF1 to trigger peptidyl-tRNA hydrolysis. *RNA N. Y. N* 5, 1014–1020.
- Fromont-Racine, M., Rain, J.C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat. Genet.* 16, 277–282.
- Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T., and Kobayashi, H. (2002). Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 745–750.
- Gaba, A., Jacobson, A., and Sachs, M.S. (2005). Ribosome occupancy of the yeast CPA1 upstream open reading frame termination codon modulates nonsense-mediated mRNA decay. *Mol. Cell* 20, 449–460.
- Gandhi, R., Manzoor, M., and Hudak, K.A. (2008). Depurination of Brome mosaic virus RNA3 in vivo results in translation-dependent accelerated degradation of the viral RNA. *J. Biol. Chem.* 283, 32218–32228.
- Gao, Y.-G., Selmer, M., Dunham, C.M., Weixlbaumer, A., Kelley, A.C., and Ramakrishnan, V. (2009). The structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the posttranslocational state. *Science* 326, 694–699.
- García-Mata, R., Bebök, Z., Sorscher, E.J., and Sztul, E.S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J. Cell Biol.* 146, 1239–

1254.

Garí, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast Chichester Engl.* *13*, 837–848.

Gasch, A.P. (2007). Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast Chichester Engl.* *24*, 961–976.

Geissler, S., Siegers, K., and Schiebel, E. (1998). A novel protein complex promoting formation of functional alpha- and gamma-tubulin. *EMBO J.* *17*, 952–966.

des Georges, A., Dhote, V., Kuhn, L., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., Frank, J., and Hashem, Y. (2015). Structure of mammalian eIF3 in the context of the 43S preinitiation complex. *Nature* *525*, 491–495.

Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., and Weissman, J.S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* *425*, 737–741.

Goldberg, A.L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* *426*, 895–899.

Graber, J.H., Cantor, C.R., Mohr, S.C., and Smith, T.F. (1999). In silico detection of control signals: mRNA 3’-end-processing sequences in diverse species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 14055–14060.

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

Hakhverdyan, Z., Domanski, M., Hough, L.E., Oroskar, A.A., Oroskar, A.R., Keegan, S., Dilworth, D.J., Molloy, K.R., Sherman, V., Aitchison, J.D., et al. (2015). Rapid, optimized interactomic screening. *Nat. Methods* *12*, 553–560.

Halbach, F., Rode, M., and Conti, E. (2012). The crystal structure of *S. cerevisiae* Ski2, a DExH helicase associated with the cytoplasmic functions of the exosome. *RNA N. Y. N* *18*, 124–134.

Halbach, F., Reichelt, P., Rode, M., and Conti, E. (2013). The Yeast Ski Complex: Crystal Structure and RNA Channeling to the Exosome Complex. *Cell* *154*, 814–826.

Harigaya, Y., and Parker, R. (2010). No-go decay: a quality control mechanism for RNA in translation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *1*, 132–141.

Harigaya, Y., Jones, B.N., Muhlrads, D., Gross, J.D., and Parker, R. (2010). Identification and analysis of the interaction between Edc3 and Dcp2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1446–1456.

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.

Hashem, Y., des Georges, A., Dhote, V., Langlois, R., Liao, H.Y., Grassucci, R.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., and Frank, J. (2013). Structure of the mammalian ribosomal 43S preinitiation complex bound to the scanning factor DHX29. *Cell* *153*, 1108–1119.

He, F., and Jacobson, A. (2001). Upf1p, Nmd2p, and Upf3p regulate the decapping and exonucleolytic degradation of both nonsense-containing mRNAs and wild-type mRNAs.

Mol. Cell. Biol. 21, 1515–1530.

He, F., and Jacobson, A. (2015a). Control of mRNA decapping by positive and negative regulatory elements in the Dcp2 C-terminal domain. RNA N. Y. N 21, 1633–1647.

He, F., and Jacobson, A. (2015b). Nonsense-Mediated mRNA Decay: Degradation of Defective Transcripts Is Only Part of the Story. Annu. Rev. Genet. 49, 339–366.

He, F., Peltz, S.W., Donahue, J.L., Rosbash, M., and Jacobson, A. (1993). Stabilization and ribosome association of unspliced pre-mRNAs in a yeast upf1- mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 7034–7038.

He, F., Brown, A.H., and Jacobson, A. (1997). Upf1p, Nmd2p, and Upf3p are interacting components of the yeast nonsense-mediated mRNA decay pathway. Mol. Cell. Biol. 17, 1580–1594.

Heuer, A., Gerovac, M., Schmidt, C., Trowitzsch, S., Preis, A., Kötter, P., Berninghausen, O., Becker, T., Beckmann, R., and Tampé, R. (2017). Structure of the 40S-ABCE1 post-splitting complex in ribosome recycling and translation initiation. Nat. Struct. Mol. Biol. 24, 453–460.

Hilal, T., Yamamoto, H., Loerke, J., Bürger, J., Mielke, T., and Spahn, C.M.T. (2016). Structural insights into ribosomal rescue by Dom34 and Hbs1 at near-atomic resolution. Nat. Commun. 7, 13521.

Hilgers, V., Teixeira, D., and Parker, R. (2006). Translation-independent inhibition of mRNA deadenylation during stress in Saccharomyces cerevisiae. RNA N. Y. N 12, 1835–1845.

Hoepfner, D., Helliwell, S.B., Sadlish, H., Schuierer, S., Filipuzzi, I., Brachat, S., Bhullar, B., Plikat, U., Abraham, Y., Altorfer, M., et al. (2014). High-resolution chemical dissection of a model eukaryote reveals targets, pathways and gene functions. Microbiol. Res. 169, 107–120.

Holmes, W.M., Klaips, C.L., and Serio, T.R. (2014). Defining the limits: Protein aggregation and toxicity in vivo. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 49, 294–303.

van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E., and Parker, R. (2000). Function of the ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to-5' degradation of mRNA. Mol. Cell. Biol. 20, 8230–8243.

van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., and Parker, R. (2002). Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. Science 295, 2262–2264.

Hook, B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., and Wickens, M. (2007). Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. J. Biol. Chem. 282, 15430–15438.

Hoshino, S., Imai, M., Kobayashi, T., Uchida, N., and Katada, T. (1999). The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. J. Biol. Chem. 274, 16677–16680.

Hsu, C.L., and Stevens, A. (1993). Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. Mol. Cell. Biol. 13, 4826–4835.

Hubner, N.C., and Mann, M. (2011). Extracting gene function from protein-protein

interactions using Quantitative BAC InteraCtomics (QUBIC). *Methods San Diego Calif* 53, 453–459.

Ito, K., and Chiba, S. (2013). Arrest peptides: cis-acting modulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* 82, 171–202.

Ito-Harashima, S., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2007). Translation of the poly(A) tail plays crucial roles in nonstop mRNA surveillance via translation repression and protein destabilization by proteasome in yeast. *Genes Dev.* 21, 519–524.

Ivanov, P.V., Gehring, N.H., Kunz, J.B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2008). Interactions between UPF1, eRFs, PABP and the exon junction complex suggest an integrated model for mammalian NMD pathways. *EMBO J.* 27, 736–747.

Izawa, T., Tsuboi, T., Kuroha, K., Inada, T., Nishikawa, S., and Endo, T. (2012). Roles of dom34:hbs1 in nonstop protein clearance from translocators for normal organelle protein influx. *Cell Rep.* 2, 447–453.

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113–127.

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2012). Termination and post-termination events in eukaryotic translation. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* 86, 45–93.

Jahn, T.R., and Radford, S.E. (2005). The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.* 272, 5962–5970.

Januszyk, K., and Lima, C.D. (2010). Structural components and architectures of RNA exosomes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 702, 9–28.

Jenner, L., Melnikov, S., Garreau de Loubresse, N., Ben-Shem, A., Iskakova, M., Urzhumtsev, A., Meskauskas, A., Dinman, J., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2012). Crystal structure of the 80S yeast ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 759–767.

Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J. Cell Biol.* 143, 1883–1898.

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

Kadlec, J., Izaurralde, E., and Cusack, S. (2004). The structural basis for the interaction between nonsense-mediated mRNA decay factors UPF2 and UPF3. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 330–337.

Kaganovich, D., Kopito, R., and Frydman, J. (2008). Misfolded proteins partition between two distinct quality control compartments. *Nature* 454, 1088–1095.

Kapp, L.D., and Lorsch, J.R. (2004). The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 657–704.

Kebaara, B.W., and Atkin, A.L. (2009). Long 3'-UTRs target wild-type mRNAs for nonsense-mediated mRNA decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 37, 2771–2778.

Kitamura, A., Kubota, H., Pack, C.-G., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R.I., and Nagata, K. (2006). Cytosolic chaperonin prevents

- polyglutamine toxicity with altering the aggregation state. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1163–1170.
- Kobayashi, K., Kikuno, I., Kuroha, K., Saito, K., Ito, K., Ishitani, R., Inada, T., and Nureki, O. (2010). Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 17575–17579.
- Kostova, K.K., Hickey, K.L., Osuna, B.A., Hussmann, J.A., Frost, A., Weinberg, D.E., and Weissman, J.S. (2017). CAT-tailing as a fail-safe mechanism for efficient degradation of stalled nascent polypeptides. *Science* *357*, 414–417.
- Krobitsch, S., and Lindquist, S. (2000). Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 1589–1594.
- Kruk, J.A., Dutta, A., Fu, J., Gilmour, D.S., and Reese, J.C. (2011). The multifunctional Ccr4-Not complex directly promotes transcription elongation. *Genes Dev.* *25*, 581–593.
- Kulkarni, M., Ozgur, S., and Stoecklin, G. (2010). On track with P-bodies. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 242–251.
- Kuroha, K., Akamatsu, M., Dimitrova, L., Ito, T., Kato, Y., Shirahige, K., and Inada, T. (2010). Receptor for activated C kinase 1 stimulates nascent polypeptide-dependent translation arrest. *EMBO Rep.* *11*, 956–961.
- Kushnirov, V.V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast Chichester Engl.* *16*, 857–860.
- Łabno, A., Tomecki, R., and Dziembowski, A. (2016). Cytoplasmic RNA decay pathways - Enzymes and mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta* *1863*, 3125–3147.
- LaGrandeur, T., and Parker, R. (1999). The cis acting sequences responsible for the differential decay of the unstable MFA2 and stable PGK1 transcripts in yeast include the context of the translational start codon. *RNA N. Y. N* *5*, 420–433.
- Lawless, C., Holman, S.W., Brownridge, P., Lanthaler, K., Harman, V.M., Watkins, R., Hammond, D.E., Miller, R.L., Sims, P.F.G., Grant, C.M., et al. (2016). Direct and Absolute Quantification of over 1800 Yeast Proteins via Selected Reaction Monitoring. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *15*, 1309–1322.
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Séraphin, B. (2008). Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* *456*, 993–996.
- Lee, D., Ohn, T., Chiang, Y.-C., Quigley, G., Yao, G., Liu, Y., and Denis, C.L. (2010). PUF3 acceleration of deadenylation in vivo can operate independently of CCR4 activity, possibly involving effects on the PAB1-mRNP structure. *J. Mol. Biol.* *399*, 562–575.
- Lee, W.S., Teo, K.M., Ng, R.T., Chong, S.Y., Kee, B.P., and Chua, K.H. (2016). Novel mutations in SKIV2L and TTC37 genes in Malaysian children with trichohepatoenteric syndrome. *Gene* *586*, 1–6.
- Leeds, P., Peltz, S.W., Jacobson, A., and Culbertson, M.R. (1991). The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. *Genes Dev.* *5*, 2303–2314.
- Leeds, P., Wood, J.M., Lee, B.S., and Culbertson, M.R. (1992). Gene products that promote mRNA turnover in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 2165–2177.
- Leitner, A., Joachimiak, L.A., Bracher, A., Mönkemeyer, L., Walzthoeni, T., Chen, B.,

- Pechmann, S., Holmes, S., Cong, Y., Ma, B., et al. (2012). The molecular architecture of the eukaryotic chaperonin TRiC/CCT. *Struct. Lond. Engl.* 1993 20, 814–825.
- Levin, D.H., Kyner, D., and Acs, G. (1973). Protein initiation in eukaryotes: formation and function of a ternary complex composed of a partially purified ribosomal factor, methionyl transfer RNA, and guanosine triphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 41–45.
- Liu, J.-J., Bratkowski, M.A., Liu, X., Niu, C.-Y., Ke, A., and Wang, H.-W. (2014). Visualization of distinct substrate-recruitment pathways in the yeast exosome by EM. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 95–102.
- Liu, J.-J., Niu, C.-Y., Wu, Y., Tan, D., Wang, Y., Ye, M.-D., Liu, Y., Zhao, W., Zhou, K., Liu, Q.-S., et al. (2016). CryoEM structure of yeast cytoplasmic exosome complex. *Cell Res.* 26, 822–837.
- Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* 127, 1223–1237.
- Lorsch, J.R., and Herschlag, D. (1999). Kinetic dissection of fundamental processes of eukaryotic translation initiation in vitro. *EMBO J.* 18, 6705–6717.
- Losson, R., and Lacroute, F. (1979). Interference of nonsense mutations with eukaryotic messenger RNA stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 5134–5137.
- Lu, J., and Deutsch, C. (2008). Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. *J. Mol. Biol.* 384, 73–86.
- Lu, K., Psakhye, I., and Jentsch, S. (2014). Autophagic clearance of polyQ proteins mediated by ubiquitin-Atg8 adaptors of the conserved CUET protein family. *Cell* 158, 549–563.
- Lyumkis, D., Oliveira dos Passos, D., Tahara, E.B., Webb, K., Bennett, E.J., Vinterbo, S., Potter, C.S., Carragher, B., and Joazeiro, C.A.P. (2014). Structural basis for translational surveillance by the large ribosomal subunit-associated protein quality control complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 15981–15986.
- Makino, D.L., Baumgärtner, M., and Conti, E. (2013). Crystal structure of an RNA-bound 11-subunit eukaryotic exosome complex. *Nature* 495, 70–75.
- Makino, D.L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumgärtner, M., Basquin, C., and Conti, E. (2015). RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* 524, 54–58.
- Malabat, C., Feuerbach, F., Ma, L., Saveanu, C., and Jacquier, A. (2015). Quality control of transcription start site selection by nonsense-mediated-mRNA decay. *ELife* 4.
- Malet, H., Topf, M., Clare, D.K., Ebert, J., Bonneau, F., Basquin, J., Drazkowska, K., Tomecki, R., Dziembowski, A., Conti, E., et al. (2010). RNA channelling by the eukaryotic exosome. *EMBO Rep.* 11, 936–942.
- von der Malsburg, K., Shao, S., and Hegde, R.S. (2015). The ribosome quality control pathway can access nascent polypeptides stalled at the Sec61 translocon. *Mol. Biol. Cell* 26, 2168–2180.
- Marintchev, A., Edmonds, K.A., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., Herdy, B., Sonenberg, N., and Wagner, G. (2009). Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* 136, 447–460.

- Matsuda, R., Ikeuchi, K., Nomura, S., and Inada, T. (2014). Protein quality control systems associated with no-go and nonstop mRNA surveillance in yeast. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *19*, 1–12.
- Matsuo, Y., Ikeuchi, K., Saeki, Y., Iwasaki, S., Schmidt, C., Udagawa, T., Sato, F., Tsuchiya, H., Becker, T., Tanaka, K., et al. (2017). Ubiquitination of stalled ribosome triggers ribosome-associated quality control. *Nat. Commun.* *8*, 159.
- Meriin, A.B., Zhang, X., He, X., Newnam, G.P., Chernoff, Y.O., and Sherman, M.Y. (2002). Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J. Cell Biol.* *157*, 997–1004.
- Merkulova, T.I., Frolova, L.Y., Lazar, M., Camonis, J., and Kisselev, L.L. (1999). C-terminal domains of human translation termination factors eRF1 and eRF3 mediate their in vivo interaction. *FEBS Lett.* *443*, 41–47.
- Millán-Zambrano, G., and Chávez, S. (2014). Nuclear functions of prefoldin. *Open Biol.* *4*.
- Milligan, L., Decourty, L., Saveanu, C., Rappsilber, J., Ceulemans, H., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2008). A yeast exosome cofactor, Mpp6, functions in RNA surveillance and in the degradation of noncoding RNA transcripts. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 5446–5457.
- Mitchell, P., and Tollervey, D. (2003). An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol. Cell* *11*, 1405–1413.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Houalla, R., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Tollervey, D. (2003). Rrp47p is an exosome-associated protein required for the 3' processing of stable RNAs. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6982–6992.
- Moon, H.M., Redfield, B., and Weissbach, H. (1972). Interaction of eukaryote elongation factor EF 1 with guanosine nucleotides and aminoacyl-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *69*, 1249–1252.
- Muhlrad, D., and Parker, R. (1992). Mutations affecting stability and deadenylation of the yeast MFA2 transcript. *Genes Dev.* *6*, 2100–2111.
- Muhlrad, D., and Parker, R. (1994). Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* *370*, 578–581.
- Muhlrad, D., and Parker, R. (1999). Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. *RNA N. Y. N* *5*, 1299–1307.
- Muhlrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* *8*, 855–866.
- Muhlrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1995). Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2145–2156.
- de Nadal, E., Ammerer, G., and Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 833–845.
- Nagaraj, N., Kulak, N.A., Cox, J., Neuhauser, N., Mayr, K., Hoerning, O., Vorm, O., and Mann, M. (2012). System-wide perturbation analysis with nearly complete coverage of the yeast proteome by single-shot ultra HPLC runs on a bench top Orbitrap. *Mol. Cell. Proteomics MCP* *11*, M111.013722.
- Natan, E., Wells, J.N., Teichmann, S.A., and Marsh, J.A. (2017). Regulation, evolution and

consequences of cotranslational protein complex assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **42**, 90–97.

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

Nyström, T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**, 1311–1317.

Oeffinger, M., Wei, K.E., Rogers, R., DeGrasse, J.A., Chait, B.T., Aitchison, J.D., and Rout, M.P. (2007). Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat. Methods* **4**, 951–956.

Olivas, W., and Parker, R. (2000). The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J.* **19**, 6602–6611.

Osuna, B.A., Howard, C.J., Kc, S., Frost, A., and Weinberg, D.E. (2017). In vitro analysis of RQC activities provides insights into the mechanism and function of CAT tailing. *ELife* **6**.

Ozsolak, F., Kapranov, P., Foissac, S., Kim, S.W., Fishilevich, E., Monaghan, A.P., John, B., and Milos, P.M. (2010). Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. *Cell* **143**, 1018–1029.

Parsell, D.A., Kowal, A.S., and Lindquist, S. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J. Biol. Chem.* **269**, 4480–4487.

Passos, D.O., Doma, M.K., Shoemaker, C.J., Muhlrud, D., Green, R., Weissman, J., Hollien, J., and Parker, R. (2009). Analysis of Dom34 and its function in no-go decay. *Mol. Biol. Cell* **20**, 3025–3032.

Pedro-Segura, E., Vergara, S.V., Rodríguez-Navarro, S., Parker, R., Thiele, D.J., and Puig, S. (2008). The Cth2 ARE-binding protein recruits the Dhh1 helicase to promote the decay of succinate dehydrogenase SDH4 mRNA in response to iron deficiency. *J. Biol. Chem.* **283**, 28527–28535.

Pelechano, V., Wei, W., and Steinmetz, L.M. (2015). Widespread Co-translational RNA Decay Reveals Ribosome Dynamics. *Cell* **161**, 1400–1412.

Peltz, S.W., Brown, A.H., and Jacobson, A. (1993). mRNA destabilization triggered by premature translational termination depends on at least three cis-acting sequence elements and one trans-acting factor. *Genes Dev.* **7**, 1737–1754.

Pestova, T.V., Borukhov, S.I., and Hellen, C.U. (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**, 854–859.

Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., and Hellen, C.U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* **403**, 332–335.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612.

Piccirillo, C., Khanna, R., and Kiledjian, M. (2003). Functional characterization of the mammalian mRNA decapping enzyme hDcp2. *RNA N. Y. N* **9**, 1138–1147.

Pisarev, A.V., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* **131**, 286–299.

- Pisarev, A.V., Kolupaeva, V.G., Yusupov, M.M., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2008). Ribosomal position and contacts of mRNA in eukaryotic translation initiation complexes. *EMBO J.* 27, 1609–1621.
- Pisarev, A.V., Skabkin, M.A., Pisareva, V.P., Skabkina, O.V., Rakotondrafara, A.M., Hentze, M.W., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). The role of ABCE1 in eukaryotic posttermination ribosomal recycling. *Mol. Cell* 37, 196–210.
- Pisareva, V.P., and Pisarev, A.V. (2016). DHX29 and eIF3 cooperate in ribosomal scanning on structured mRNAs during translation initiation. *RNA N. Y. N* 22, 1859–1870.
- Pisareva, V.P., Pisarev, A.V., Komar, A.A., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2008). Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* 135, 1237–1250.
- Porrua, O., and Libri, D. (2013). RNA quality control in the nucleus: the Angels' share of RNA. *Biochim. Biophys. Acta* 1829, 604–611.
- Preis, A., Heuer, A., Barrio-Garcia, C., Hauser, A., Eyler, D.E., Berninghausen, O., Green, R., Becker, T., and Beckmann, R. (2014). Cryoelectron microscopic structures of eukaryotic translation termination complexes containing eRF1-eRF3 or eRF1-ABCE1. *Cell Rep.* 8, 59–65.
- Preissler, S., Reuther, J., Koch, M., Scior, A., Bruderek, M., Frickey, T., and Deuerling, E. (2015). Not4-dependent translational repression is important for cellular protein homeostasis in yeast. *EMBO J.* 34, 1905–1924.
- Presnyak, V., Alhusaini, N., Chen, Y.-H., Martin, S., Morris, N., Kline, N., Olson, S., Weinberg, D., Baker, K.E., Graveley, B.R., et al. (2015). Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. *Cell* 160, 1111–1124.
- Qiu, H., Hu, C., Yoon, S., Natarajan, K., Swanson, M.J., and Hinnebusch, A.G. (2004). An array of coactivators is required for optimal recruitment of TATA binding protein and RNA polymerase II by promoter-bound Gcn4p. *Mol. Cell. Biol.* 24, 4104–4117.
- Qu, X., Yang, Z., Zhang, S., Shen, L., Dangel, A.W., Hughes, J.H., Redman, K.L., Wu, L.C., and Yu, C.Y. (1998). The human DEVH-box protein Ski2w from the HLA is localized in nucleoli and ribosomes. *Nucleic Acids Res.* 26, 4068–4077.
- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., and Jentsch, S. (2001). Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell* 107, 667–677.
- Raychaudhuri, P., Chaudhuri, A., and Maitra, U. (1985). Formation and release of eukaryotic initiation factor 2 X GDP complex during eukaryotic ribosomal polypeptide chain initiation complex formation. *J. Biol. Chem.* 260, 2140–2145.
- Rendl, L.M., Bieman, M.A., and Smibert, C.A. (2008). *S. cerevisiae* Vts1p induces deadenylation-dependent transcript degradation and interacts with the Ccr4p-Pop2p-Not deadenylase complex. *RNA N. Y. N* 14, 1328–1336.
- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoegel, C., and Jentsch, S. (2005). A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 120, 73–84.
- Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. *Mol. Cell* 40, 253–266.

- Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2009). Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 435–443.
- Rogers, D.W., Böttcher, M.A., Traulsen, A., and Greig, D. (2017). Ribosome reinitiation can explain length-dependent translation of messenger RNA. *PLoS Comput. Biol.* *13*, e1005592.
- Ruiz-Echevarría, M.J., and Peltz, S.W. (2000). The RNA binding protein Pub1 modulates the stability of transcripts containing upstream open reading frames. *Cell* *101*, 741–751.
- Saarikangas, J., and Barral, Y. (2016). Protein aggregation as a mechanism of adaptive cellular responses. *Curr. Genet.* *62*, 711–724.
- Sachs, A.B., Davis, R.W., and Kornberg, R.D. (1987). A single domain of yeast poly(A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell Biol.* *7*, 3268–3276.
- Sayani, S., Janis, M., Lee, C.Y., Toesca, I., and Chanfreau, G.F. (2008). Widespread Impact of Nonsense-Mediated mRNA Decay on the Yeast Intronome. *Mol. Cell* *31*, 360–370.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M., and van Hoof, A. (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 56–62.
- Schaeffer, D., Clark, A., Klauer, A.A., Tsanova, B., and van Hoof, A. (2011). Functions of the cytoplasmic exosome. *Adv. Exp. Med. Biol.* *702*, 79–90.
- Schmidt, C., Kowalinski, E., Shanmuganathan, V., Defenouillère, Q., Braunger, K., Heuer, A., Pech, M., Namane, A., Berninghausen, O., Fromont-Racine, M., et al. (2016). The cryo-EM structure of a ribosome–Ski2–Ski3–Ski8 helicase complex. *Science* *354*, 1431–1433.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., and Tollervey, D. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Res.* *37*, 1127–1140.
- Schuller, A.P., and Green, R. (2017). The ABC(E1)s of Ribosome Recycling and Reinitiation. *Mol. Cell* *66*, 578–580.
- Schwartz, D.C., and Parker, R. (2000). mRNA decapping in yeast requires dissociation of the cap binding protein, eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol. Cell Biol.* *20*, 7933–7942.
- Serdar, L.D., Whiteside, D.L., and Baker, K.E. (2016). ATP hydrolysis by UPF1 is required for efficient translation termination at premature stop codons. *Nat. Commun.* *7*, 14021.
- Shao, S., and Hegde, R.S. (2014). Reconstitution of a minimal ribosome-associated ubiquitination pathway with purified factors. *Mol. Cell* *55*, 880–890.
- Shao, S., von der Malsburg, K., and Hegde, R.S. (2013). Listerin-dependent nascent protein ubiquitination relies on ribosome subunit dissociation. *Mol. Cell* *50*, 637–648.
- Shao, S., Brown, A., Santhanam, B., and Hegde, R.S. (2015). Structure and assembly pathway of the ribosome quality control complex. *Mol. Cell* *57*, 433–444.
- She, M., Decker, C.J., Sundramurthy, K., Liu, Y., Chen, N., Parker, R., and Song, H. (2004). Crystal structure of Dcp1p and its functional implications in mRNA decapping. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 249–256.

- She, M., Decker, C.J., Chen, N., Tumati, S., Parker, R., and Song, H. (2006). Crystal structure and functional analysis of Dcp2p from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 63–70.
- She, M., Decker, C.J., Svergun, D.I., Round, A., Chen, N., Muhlrads, D., Parker, R., and Song, H. (2008). Structural basis of dcp2 recognition and activation by dcp1. *Mol. Cell* *29*, 337–349.
- Shen, P.S., Park, J., Qin, Y., Li, X., Parsawar, K., Larson, M.H., Cox, J., Cheng, Y., Lambowitz, A.M., Weissman, J.S., et al. (2015). Protein synthesis. Rqc2p and 60S ribosomal subunits mediate mRNA-independent elongation of nascent chains. *Science* *347*, 75–78.
- Sheth, U., and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* *300*, 805–808.
- Sheth, U., and Parker, R. (2006). Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* *125*, 1095–1109.
- Shoemaker, C.J., and Green, R. (2011). Kinetic analysis reveals the ordered coupling of translation termination and ribosome recycling in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, E1392–1398.
- Shoemaker, C.J., and Green, R. (2012). Translation drives mRNA quality control. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 594–601.
- Shoemaker, C.J., Eyler, D.E., and Green, R. (2010). Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* *330*, 369–372.
- Singh, G., Rebbapragada, I., and Lykke-Andersen, J. (2008). A competition between stimulators and antagonists of Upf complex recruitment governs human nonsense-mediated mRNA decay. *PLoS Biol.* *6*, e111.
- Sitron, C.S., Park, J.H., and Brandman, O. (2017). Asc1, Hel2, and Slh1 couple translation arrest to nascent chain degradation. *RNA N. Y. N* *23*, 798–810.
- Skabkin, M.A., Skabkina, O.V., Dhote, V., Komar, A.A., Hellen, C.U.T., and Pestova, T.V. (2010). Activities of Ligatin and MCT-1/DENR in eukaryotic translation initiation and ribosomal recycling. *Genes Dev.* *24*, 1787–1801.
- Sonenberg, N., Wilchek, M., and Zamir, A. (1977). Mapping of 23-S rRNA at the ribosomal peptidyl-transferase center by photo-affinity labeling. *Eur. J. Biochem.* *77*, 217–222.
- Song, H., Mugnier, P., Das, A.K., Webb, H.M., Evans, D.R., Tuite, M.F., Hemmings, B.A., and Barford, D. (2000). The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell* *100*, 311–321.
- Spiess, C., Meyer, A.S., Reissmann, S., and Frydman, J. (2004). Mechanism of the eukaryotic chaperonin: protein folding in the chamber of secrets. *Trends Cell Biol.* *14*, 598–604.
- Stansfield, I., Jones, K.M., and Tuite, M.F. (1995). The end in sight: terminating translation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* *20*, 489–491.
- Staudt, M.W., Kruzel, E.K., Shimizu, K., and Hull, C.M. (2010). Characterizing the role of the microtubule binding protein Bim1 in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* *FG B 47*, 310–317.
- Steiger, M., Carr-Schmid, A., Schwartz, D.C., Kiledjian, M., and Parker, R. (2003). Analysis

of recombinant yeast decapping enzyme. *RNA* 9, 231–238.

Svidritskiy, E., Brilot, A.F., Koh, C.S., Grigorieff, N., and Korostelev, A.A. (2014). Structures of Yeast 80S Ribosome-tRNA Complexes in the Rotated and Nonrotated Conformations. *Structure* 22, 1210–1218.

Synowsky, S.A., and Heck, A.J.R. (2008). The yeast Ski complex is a hetero-tetramer. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 17, 119–125.

Takahashi, S., Araki, Y., Sakuno, T., and Katada, T. (2003). Interaction between Ski7p and Upf1p is required for nonsense-mediated 3'-to-5' mRNA decay in yeast. *EMBO J.* 22, 3951–3959.

Tam, S., Geller, R., Spiess, C., and Frydman, J. (2006). The chaperonin TRiC controls polyglutamine aggregation and toxicity through subunit-specific interactions. *Nat. Cell Biol.* 8, 1155–1162.

Tashiro, E., Zako, T., Muto, H., Ito, Y., Sörgjerd, K., Terada, N., Abe, A., Miyazawa, M., Kitamura, A., Kitaura, H., et al. (2013). Prefoldin protects neuronal cells from polyglutamine toxicity by preventing aggregation formation. *J. Biol. Chem.* 288, 19958–19972.

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

Tharun, S. (2009). Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 272, 149–189.

Tharun, S., and Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell* 8, 1075–1083.

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

Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L., and Parker, R. (2001). The Transcription Factor Associated Ccr4 and Caf1 Proteins Are Components of the Major Cytoplasmic mRNA Deadenylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 377–386.

Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 777–788.

Ulbricht, R.J., and Olivas, W.M. (2008). Puf1p acts in combination with other yeast Puf proteins to control mRNA stability. *RNA N. Y. N* 14, 246–262.

Valkov, E., Muthukumar, S., Chang, C.-T., Jonas, S., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2016). Structure of the Dcp2-Dcp1 mRNA-decapping complex in the activated conformation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 574–579.

Verma, R., Oania, R.S., Kolawa, N.J., and Deshaies, R.J. (2013). Cdc48/p97 promotes degradation of aberrant nascent polypeptides bound to the ribosome. *ELife* 2, e00308.

Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999). The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015–1068.

- Wagner, E., and Lykke-Andersen, J. (2002). mRNA surveillance: the perfect persist. *J. Cell Sci.* *115*, 3033–3038.
- Wahle, E., and Winkler, G.S. (2013). RNA decay machines: deadenylation by the Ccr4-not and Pan2-Pan3 complexes. *Biochim. Biophys. Acta* *1829*, 561–570.
- Walsh, P., Bursać, D., Law, Y.C., Cyr, D., and Lithgow, T. (2004). The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Rep.* *5*, 567–571.
- Wan, C., Borgeson, B., Phanse, S., Tu, F., Drew, K., Clark, G., Xiong, X., Kagan, O., Kwan, J., Bezginov, A., et al. (2015). Panorama of ancient metazoan macromolecular complexes. *Nature* *525*, 339–344.
- Wang, H.-W., Wang, J., Ding, F., Callahan, K., Bratkowski, M.A., Butler, J.S., Nogales, E., and Ke, A. (2007). Architecture of the yeast Rrp44–exosome complex suggests routes of RNA recruitment for 3' end processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 16844–16849.
- Wang, L., Lewis, M.S., and Johnson, A.W. (2005). Domain interactions within the Ski2/3/8 complex and between the Ski complex and Ski7p. *RNA N. Y.* *11*, 1291–1302.
- Wang, Y., Meriin, A.B., Zaarur, N., Romanova, N.V., Chernoff, Y.O., Costello, C.E., and Sherman, M.Y. (2009). Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *23*, 451–463.
- Welch, E.M., and Jacobson, A. (1999). An internal open reading frame triggers nonsense-mediated decay of the yeast *SPT10* mRNA. *EMBO J.* *18*, 6134–6145.
- Wells, J.N., Bergendahl, L.T., and Marsh, J.A. (2015). Co-translational assembly of protein complexes. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 1221–1226.
- Weng, Y., Czaplinski, K., and Peltz, S.W. (1996a). Genetic and biochemical characterization of mutations in the ATPase and helicase regions of the Upf1 protein. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 5477–5490.
- Weng, Y., Czaplinski, K., and Peltz, S.W. (1996b). Identification and characterization of mutations in the UPF1 gene that affect nonsense suppression and the formation of the Upf protein complex but not mRNA turnover. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 5491–5506.
- Wery, M., Descrimes, M., Vogt, N., Dallongeville, A.-S., Gautheret, D., and Morillon, A. (2016). Nonsense-Mediated Decay Restricts LncRNA Levels in Yeast Unless Blocked by Double-Stranded RNA Structure. *Mol. Cell* *61*, 379–392.
- Wessel, D., and Flügge, U.I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* *138*, 141–143.
- Wilson, D.N., Arenz, S., and Beckmann, R. (2016). Translation regulation via nascent polypeptide-mediated ribosome stalling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *37*, 123–133.
- Wilson, M.A., Meaux, S., and van Hoof, A. (2007). A genomic screen in yeast reveals novel aspects of nonstop mRNA metabolism. *Genetics* *177*, 773–784.
- Yang, J., Hao, X., Cao, X., Liu, B., and Nyström, T. (2016). Spatial sequestration and detoxification of Huntingtin by the ribosome quality control complex. *ELife* *5*.
- Ye, Y., Meyer, H.H., and Rapoport, T.A. (2003). Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J. Cell Biol.* *162*, 71–84.

Bibliographie

- Yonashiro, R., Tahara, E.B., Bengtson, M.H., Khokhrina, M., Lorenz, H., Chen, K.-C., Kigoshi-Tansho, Y., Savas, J.N., Yates, J.R., Kay, S.A., et al. (2016). The Rqc2/Tae2 subunit of the ribosome-associated quality control (RQC) complex marks ribosome-stalled nascent polypeptide chains for aggregation. *ELife* 5, e11794.
- Young, D.J., Guydosh, N.R., Zhang, F., Hinnebusch, A.G., and Green, R. (2015). Rli1/ABCE1 Recycles Terminating Ribosomes and Controls Translation Reinitiation in 3'UTRs In Vivo. *Cell* 162, 872–884.
- Zaborske, J.M., Zeitler, B., and Culbertson, M.R. (2013). Multiple Transcripts from a 3'-UTR Reporter Vary in Sensitivity to Nonsense-Mediated mRNA Decay in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS ONE* 8, e80981.
- Zhang, S., Welch, E.M., Hogan, K., Brown, A.H., Peltz, S.W., and Jacobson, A. (1997). Polysome-associated mRNAs are substrates for the nonsense-mediated mRNA decay pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA N. Y. N* 3, 234–244.
- Zhouravleva, G., Frolova, L., Le Goff, X., Le Guellec, R., Inge-Vechtomov, S., Kisselev, L., and Philippe, M. (1995). Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *EMBO J.* 14, 4065–4072.

Annexes

Annexe 1 – Souches de levure utilisées

Souche	Génotype	Ploidie	Référence
Wild-type			
BY4741	<i>ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0</i>	MAT α	Brachmann et al., 1998
BY4742	<i>ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0</i>	MAT α	Brachmann et al., 1998
Souches utilisées lors de l'étude de JLP2			
LMA843	<i>yel068cΔ ::PrαNATMX4, ydl242wΔ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA2304	<i>yel068cΔ ::PrαNATMX4, jlp2Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA1921	<i>yel068cΔ ::PrαNATMX4, ltn1Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA2305	<i>ltn1Δ ::PrαNATMX4, jlp2Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA2306	<i>yel068cΔ ::PrαNATMX4, rqc1Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA3860	<i>rqc1Δ ::PrαNATMX4, jlp2Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA836	<i>rqc2Δ ::PrαNATMX4, yel068c ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA3906	<i>jlp2Δ ::PrαNATMX4, rqc2Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA2165	<i>ski3Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Euroscarf
LMA3862	<i>ski3Δ ::PrαNATMX4, jlp2Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA1966	<i>ski7Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Euroscarf
LMA3864	<i>ski7Δ ::PrαNATMX4, jlp2Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA2135	<i>rqc2Δ ::PrαNATMX4, rqc1Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA2296	<i>ski2Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Euroscarf
LMA830	<i>rqc2Δ ::PrαNATMX4, ski2Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA2352	<i>Jlp2-TAP :HIS3MX6</i>	MAT α	Ghaemmaghmi et al., 2003
LMA2419	<i>Jlp2-TAP :HIS3MX6, ltn1Δ ::KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA3661	<i>Jlp2-3FLAG :KANMX4</i>	MAT α	Cette étude
LMA3662	<i>Jlp2-3FLAG :KANMX4, ltn1Δ ::URA3</i>	MAT	Cette étude
Souches utilisées lors de l'étude de TAC4			
LMA2653	<i>Tac4-TAP :HIS3MX6</i>	MAT α	Ghaemmaghmi et al., 2003
LMA2195	<i>Rpl16a-TAP :HIS3MX6</i>	MAT α	Ghaemmaghmi et al.,

LMA3329	<i>Tac4-CRAC :URA3</i>	MATa	2003 Cette étude
Souches utilisées lors de l'étude de SKA1			
LMA1966	<i>ski7Δ::KANMX4</i>	MATα	Euroscarf
LMA2165	<i>ski3Δ::KANMX4</i>	MATα	Euroscarf
LMA2178	<i>ska1Δ::KANMX4</i>	MATα	Euroscarf
LMA4799	<i>ska1Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA2626	<i>ski2Δ::KANMX4</i>	MATa	Euroscarf
LMA4728	<i>Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1</i>	MATa	Cette étude
LMA4797	<i>Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, ski2Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA4798	<i>Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, ski3Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA4839	<i>Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, Ski3-TAP:HIS3MX6</i>	MATa	Cette étude
LMA4786	<i>Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, ska1Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA4840	<i>Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, Ska1-TAP:HIS3MX6</i>	MATa	Cette étude
LMA2158	<i>Ski3-TAP:HIS3MX6</i>	MATa	Ghaemmaghmi et al., 2003
LMA2159	<i>Ski8-TAP:HIS3MX6</i>	MATa	Ghaemmaghmi et al., 2003
LMA4516	<i>Ska1-TAP:HIS3MX6</i>	MATa	Ghaemmaghmi et al., 2003
LMA2195	<i>Rpl16-TAP:HIS3MX6</i>	MATa	Ghaemmaghmi et al., 2003
LMA2613	<i>Pab1-TAP:HIS3MX6</i>	MATα	Cette étude
LMA3450	<i>Ski3-TAP:HIS3MX6, ski7Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA3607	<i>Ski8-TAP:HIS3MX6, ski3Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA3612	<i>Ski3-TAP:HIS3MX6, ski8Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA4477	<i>Ski3-TAP:HIS3MX6, ski2Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA4670	<i>Ski3-TAP:HIS3MX6, ska1Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA4674	<i>Ska1-TAP:HIS3MX6, ski3Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude
LMA4676	<i>Ska1-TAP:HIS3MX6, ski2Δ::KANMX4</i>	MATa	Cette étude

Annexe 2 – Plasmides utilisés

Plasmide	Marqueur	Référence
<i>Plasmides utilisés lors de l'étude de JLP2</i>		
pAV188	URA3	van Hoof et al., 2002
pTAP-NonStop	URA3	Defenouillère et al., 2013
pCM190	URA3	Garí et al., 1997
pCM190-JLP2	URA3	Cette étude
<i>Plasmides utilisés lors de l'étude de TAC4</i>		
pCM190	URA3	Garí et al., 1997
pCM190-TAC4	URA3	Cette étude
pCM190- <i>tac4m</i>	URA3	Cette étude
<i>Plasmides utilisés lors de l'étude de SKA1</i>		
pTAP-Stop	URA3	
pTAP-NonStop	URA3	Defenouillère et al., 2013
pTAP-Stop-LEU	LEU2	Cette étude
pTAP-NonStop-LEU	LEU2	Cette étude
pRP485 (MFA2pG)	URA3	Decker and Parker, 1993
pRP469 (PGK1pG)	URA3	Decker and Parker, 1993
P416GDPp-GFP-FLAG-HIS3-CYC1ter	URA3	Dimitrova et al., 2009
P416GDPp-GFP-Rz-FLAG-HIS3-CYC1ter	URA3	Kobayashi et al., 2010
pCM190	URA3	Garí et al., 1997
pCM190-SKA1	URA3	Cette étude

Annexe 3 – Oligonucléotides utilisés

Nom	Description	Séquence
MFR802	JLP2 – 5'-UTR - Fw	CTGTAGACCAGAGGACTGCC
MFR803	JLP2 – 3'-UTR - Rv	ACGTGATCACGATGTAAGTAC
YY281	LTN1 – 3'-UTR - Rv	ACTGAAAACAAGGCCTGAAC
YY282	LTN1 – 5'-UTR - Fw	CCCAGATTATGCCCAACAT
MFR797	RQC1 – 5'-UTR - Fw	TACAGTCCACCAGTTGAAGG
MFR798	RQC1 – 3'UTR - Rv	CACACCCTTTCTGAACTATGC
YY132	RQC2 – 5'-UTR - Fw	CCTCTACCTCAACTCTGTGG
YY212	RQC2 – 3'-UTR - Rv	CACAAGGCAAAGCGGATAGA
QD233	JLP2 – Construction Jlp2-3FLAG - Fw	AAAAGAAGAAGAACAACAGTCTAAAG ATGAGGTTACTGACGATATGCAACTGGA AGTACGGATCCCCgggtaattaa
QD234	JLP2 – Construction Jlp2-3FLAG - Rv	ATGTAAGTACAAATGGTACTCTATTTTG AAGCGTCTACGTTATGTAGATGATATCA GAATTCGAGCTCGTTTAAACTGG GTGTTAAGTTGGGATGATGACGC
MFR952	SKA1 – 5'-UTR - Fw	TTCTTAGAGGCAGCCACACG
MFR947	SKA1 – 3'-UTR - Rv	TCACGACGGACGAAGTATTG
YY223	SKI2 – 5'-UTR - Fw	GTCCGCCCGTTGCTTACATG
YY224	SKI2 – 3'-UTR - Rv	CATAATCTGCCATCGCTGTG
YY225	SKI7 – 5'-UTR - Fw	GCTGCTGGAAGAACTGCTAA
YY226	SKI7 – 3'-UTR - Rv	CGTTAGCGATTCACTATGGTCC
MFR958	SKI3 – 5'-UTR - Fw	GAGGTTGCTATCGCTTTGGG
MFR859	SKI3 – 3'UTR - Rv	

Annexe 4 – Anticorps utilisés pour les immunodétections

Protéine ciblée	Anticorps	Dilution
TAP-tagged proteins	PAP (Peroxydase anti-peroxydase complex) Sigma-Aldrich®	1/10,000
G6PDH	Rabbit Polyclonal	1/100,000
Nog1	Rabbit Polyclonal	1/5,000
Rpl3	Mouse Monoclonal, cadeau de J. Warner	1/5,000
Rps8	Rabbit Polyclonal, cadeau de G. Dieci	1/5,000
Sis1	Rabbit Polyclonal	1/3,000

Table 1 Yeast strains

Strains	Genotypes	References
Wild type		
BY4741	<i>MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4742	<i>MATalpha, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0</i>	(Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
Fusion proteins		
LMA2158	as <i>BY4741</i> , <i>Ski3-TAP:HIS3MX6</i>	(Ghaemmaghmi <i>et al.</i> , 2003)
LMA2159	as <i>BY4741</i> , <i>Ski8-TAP:HIS3MX6</i>	(Ghaemmaghmi <i>et al.</i> , 2003)
LMA4516	as <i>BY4741</i> , <i>Ska1-TAP:HIS3MX6</i>	(Ghaemmaghmi <i>et al.</i> , 2003)
LMA2195	as <i>BY4741</i> , <i>Rpl16a-TAP:HIS3MX6</i>	(Ghaemmaghmi <i>et al.</i> , 2003)
LMA2613	as <i>BY4742</i> , <i>Pab1-TAP:HIS3MX6</i>	This study
LMA3450	as <i>BY4741</i> , <i>Ski3-TAP:HIS3MX6, ski7Δ::KANMX4</i>	This study
LMA3607	as <i>BY4741</i> , <i>Ski8-TAP:HIS3MX6, ski3Δ::KANMX4</i>	This study
LMA3612	as <i>BY4741</i> , <i>Ski3-TAP:HIS3MX6, ski8Δ::KANMX4</i>	This study
LMA4477	as <i>BY4741</i> , <i>Ski3-TAP:HIS3MX6, ski2Δ::KANMX4</i>	This study
LMA4670	as <i>BY4741</i> , <i>Ski3-TAP:HIS3MX6, ska1Δ::KANMX4</i>	This study
LMA4674	as <i>BY4741</i> , <i>Ska1-TAP:HIS3MX6, ski3Δ::KANMX4</i>	This study
LMA4676	as <i>BY4741</i> , <i>Ska1-TAP:HIS3MX6, ski2Δ::KANMX4</i>	This study
Mutants		
LMA1966	as <i>BY4742</i> , <i>ski7Δ::KANMX4</i>	Euroscarf
LMA2165	as <i>BY4742</i> , <i>ski3Δ::KANMX4</i>	Euroscarf
LMA2178	as <i>BY4742</i> , <i>ska1Δ::KANMX4</i>	Euroscarf
LMA4799	as <i>BY4741</i> , <i>ska1Δ::KANMX4</i>	This study
LMA2626	as <i>BY4741</i> , <i>ski2Δ::KANMX4</i>	Euroscarf

LMA4728	as BY4741, Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1	This study
LMA4797	as BY4741, Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, ski2Δ::KANMX4	This study
LMA4798	as BY4741, Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, ski3Δ::KANMX4	This study
LMA4839	as BY4741, Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, Ski3-TAP:HIS3MX6	This study
LMA4786	as BY4741, Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, ska1Δ::KANMX4	This study
LMA4840	as BY4741, Dcp2-3FlagAID-NATMX6-TIR1, Ska1-TAP:HIS3MX6	This study

Table 2. Plasmids used in this study

Plasmid	Marker	Reference
pTAP Stop	URA3	
pTAP Non-Stop	URA3	(Defenouillère <i>et al.</i> , 2013)
pTAP Stop Leu	LEU2	This study
pTAP Non-Stop Leu	LEU2	This study
pRP485 (<i>MFA2pG</i>)	URA3	(Decker and Parker, 1993)
pRP469 (<i>PGK1pG</i>)	URA3	(Decker and Parker, 1993)
p416GPDp-GFP-FLAG-HIS3-CYC1ter	URA3	(Dimitrova <i>et al.</i> , 2009)
p416GPDp-GFP-Rz-FLAG-HIS3-CYC1ter	URA3	(Kobayashi <i>et al.</i> , 2010)
pCM190	URA3	(Garí <i>et al.</i> , 1997)
pCM190-SKA1	URA3	This study

Table 3. Antibodies used for immunodetection

Target	Antibody	Dilution
TAP-tagged proteins	PAP (Peroxydase anti-Peroxidase complex), Sigma-Aldrich	1/10,000
Nog1	Rabbit Polyclonal	1/5,000
Rps8	Rabbit Polyclonal, Gift of Georgio Dieci	1/5,000
G6PDH	Rabbit Polyclonal	1/100,000
GFP		

Supplemental Figures

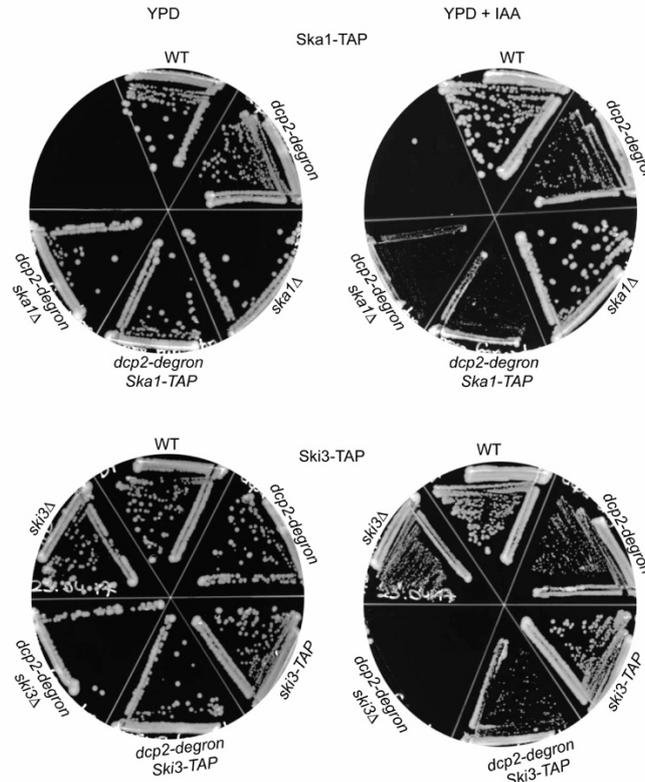


Figure S1

Fig. S1 Ski3-TAP is functional but Ska1-TAP is partially functional

Single (*ski3Δ*, *ska1Δ*, Ska1-TAP, Ski3-TAP, *dcp2-degron*) or double (*dcp2-degron ski3Δ*, *dcp2-degron ska1Δ*, *dcp2-degron* Ski3-TAP, *dcp2-degron* Ska1-TAP) mutant strains were spread on rich medium plates with or without auxin and incubated for 48h at 30°C.

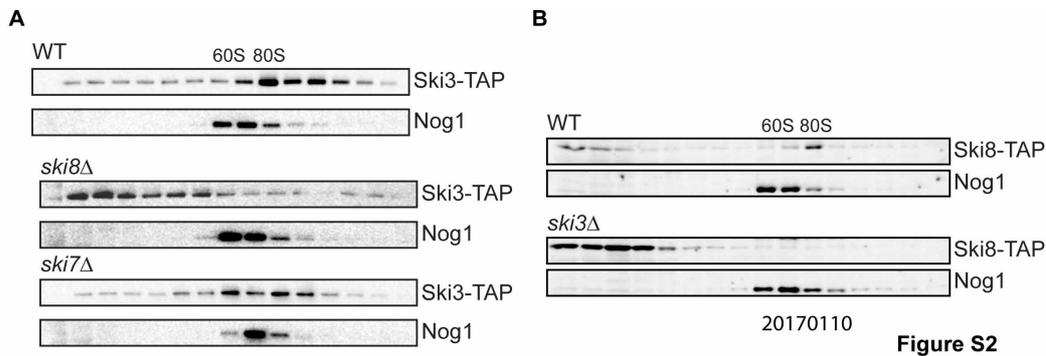


Figure S2

Fig. S2 a complete SKI complex is required for its assembly to the ribosome (A) Total cellular extracts from cells expressing Ski3-TAP in wild type or in *ski8Δ* or *ski7Δ* strains were treated as in Fig. 3. (B) Total cellular extracts from cells expressing Ski8-TAP in wild type or in *ski3Δ* strains were treated as in Fig. 3.

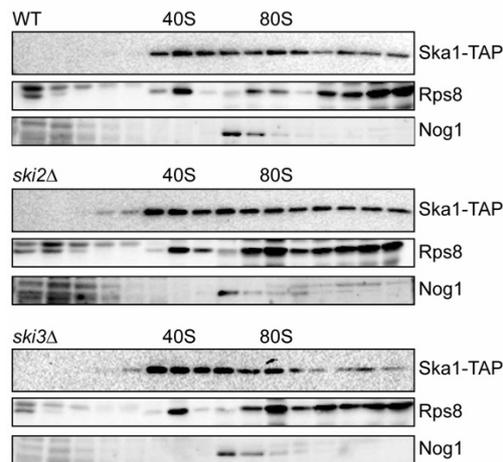


Figure S3

Fig. S3 The SKI complex is not required for the association of Ska1 to the ribosome Total cellular extracts from cells expressing Ska1-TAP in wild type or in *ski2Δ* or *ski3Δ* strains were treated as in Fig. 3.

References

- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J. D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* *Chichester Engl.* *14*, 115–132.
- Decker, C. J., and Parker, R. (1993). A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* *7*, 1632–1643.
- Defenouillère, Q. *et al.* (2013). Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5046–5051.
- Dimitrova, L. N., Kuroha, K., Tatematsu, T., and Inada, T. (2009). Nascent Peptide-dependent Translation Arrest Leads to Not4p-mediated Protein Degradation by the Proteasome. *J. Biol. Chem.* *284*, 10343–10352.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *Chichester Engl.* *13*, 837–848.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephore, N., O’Shea, E. K., and Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* *425*, 737–741.
- Kobayashi, K., Kikuno, I., Kuroha, K., Saito, K., Ito, K., Ishitani, R., Inada, T., and Nureki, O. (2010). Structural basis for mRNA surveillance by archaeal Pelota and GTP-bound EF1 α complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 17575–17579.

Supplemental Material

Table S1. Yeast strains

Strains	Genotypes	References
Wild type		
BY4741	<i>MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
BY4742	<i>MAT αpha, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0</i>	(Brachmann et al., 1998)
LMA1967	as <i>BY4742, rqc1Δ::KANMX4</i>	Euroscarf
LMA843	as <i>BY4742, yel068cΔ:: PralphaNATMX4, ydl242wΔ::KANMX4</i>	(Defenouillère et al., 2013)
LMA2306	as <i>BY4742, yel068cΔ:: PralphaNATMX4, rqc1Δ::KANMX4</i>	(Defenouillère et al., 2013)
LMA836	as <i>BY4742, rqc2Δ:: PralphaNATMX4yel068cΔ::KANMX4</i>	(Defenouillère et al., 2013)
LMA1921	as <i>BY4742, yel068cΔ:: PralphaNATMX4, ltn1Δ::KANMX4</i>	(Defenouillère et al., 2013)
LMA1920	as <i>BY4742, rqc2Δ:: PralphaNATMX4, ltn1Δ::KANMX4</i>	(Defenouillère et al., 2013)
LMA3768	as <i>BY4742, rqc1Δ:: PralphaNATMX4, ltn1Δ::KANMX4,</i>	This study
LMA2135	as <i>BY4742, rqc1Δ::KANMX4, rqc2Δ:: PralphaNATMX4</i>	This study
LMA3124	as <i>BY4742, PralphaNATMX4:PrTetO2:CDC48, yel068cΔ::KANMX4</i>	This study
LMA3121	as <i>BY4742, PralphaNATMX4:PrTetO2:CDC48, rqc1Δ::KANMX4</i>	This study
LMA3041	as <i>BY4741, erg6Δ::LEU2</i>	This study
LMA3120	as <i>BY4741, erg6Δ::LEU2, rqc1Δ::KANMX4</i>	This study

Table S2. Plasmids used in this study

Plasmid	Markers	Reference
pTAP Non-Stop	URA3	(Defenouillère et al., 2013)
pGFP Non-Stop	URA3	This study
pRS315	LEU2	(Shen et al., 2015)
pRS315-RQC2-WT	LEU2	(Shen et al., 2015)
pRS315-RQC2aaa	LEU2	(Shen et al., 2015)

Table. S3. Antibodies used for immunodetection

Target	Antibody	Dilution
TAP-tagged proteins	PAP (Peroxidase anti-Peroxidase complex), Sigma-Aldrich	1/10,000
Nog1	Rabbit Polyclonal	1/5,000
G6PDH	Rabbit Polyclonal	1/100,000
Rpl3	Mouse Polyclonal, Gift of Jonathan Warner	1/5,000
Rpt5	Rabbit Polyclonal, Biomol	1/5,000
Sis1	Rabbit Polyclonal	1/1,000
Ubiquitin	P4D1, monoclonal, Covance	1/1,000

References

Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., and Boeke, J.D. (1998). Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast Chichester Engl.* *14*, 115–132.

Defenouillère, Q., Yao, Y., Mouaikel, J., Namane, A., Galopier, A., Decourty, L., Doyen, A., Malabat, C., Saveanu, C., Jacquier, A., et al. (2013). Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 5046–5051.

Kushnirov, V.V. (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast Chichester Engl.* *16*, 857–860.

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

Supplemental figure legends

FIGURE S1.

Aberrant nascent peptides form cytosolic aggregates in the absence of Rqc1.

WT, *rqc2* Δ , *rqc1* Δ and *ltn1* Δ strains expressing the GFP-NonStop reporter gene were analyzed by fluorescence microscopy. Yeast cells are shown in the left column (Nomarski), GFP and Hoechst fluorescent signals are displayed in middle columns and merged in the right column (scale bar = 5 μ m).

FIGURE S2.

Ltn1 is also essential to prevent the accumulation of aberrant protein aggregates.

A, Polysome extracts from *rqc1* Δ , *ltn1* Δ and *rqc1* $\Delta*ltn1* Δ cells expressing the TAP-NonStop reporter were prepared and separated on a sucrose gradient (10-50%), TCA-precipitated fractions were migrated on polyacrylamide gels and analyzed by Western blotting using antibodies against the TAP-NonStop (PAP) and Nog1 as a loading control and a marker of the 60S-sedimenting fractions. Aggregated species of the TAP-NS accumulating in the stacking gel are annotated.$

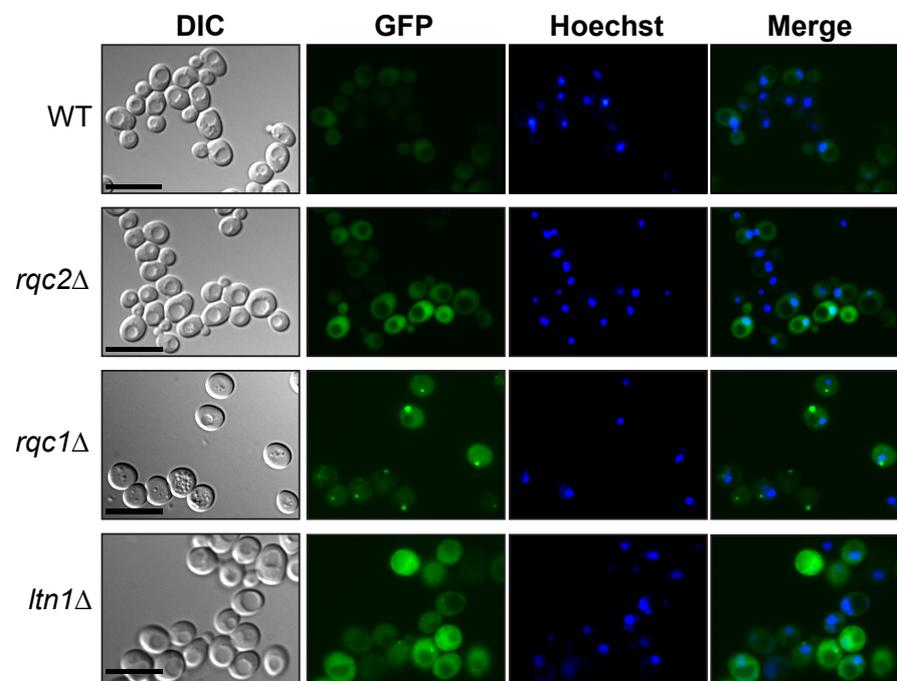


Figure S1

A

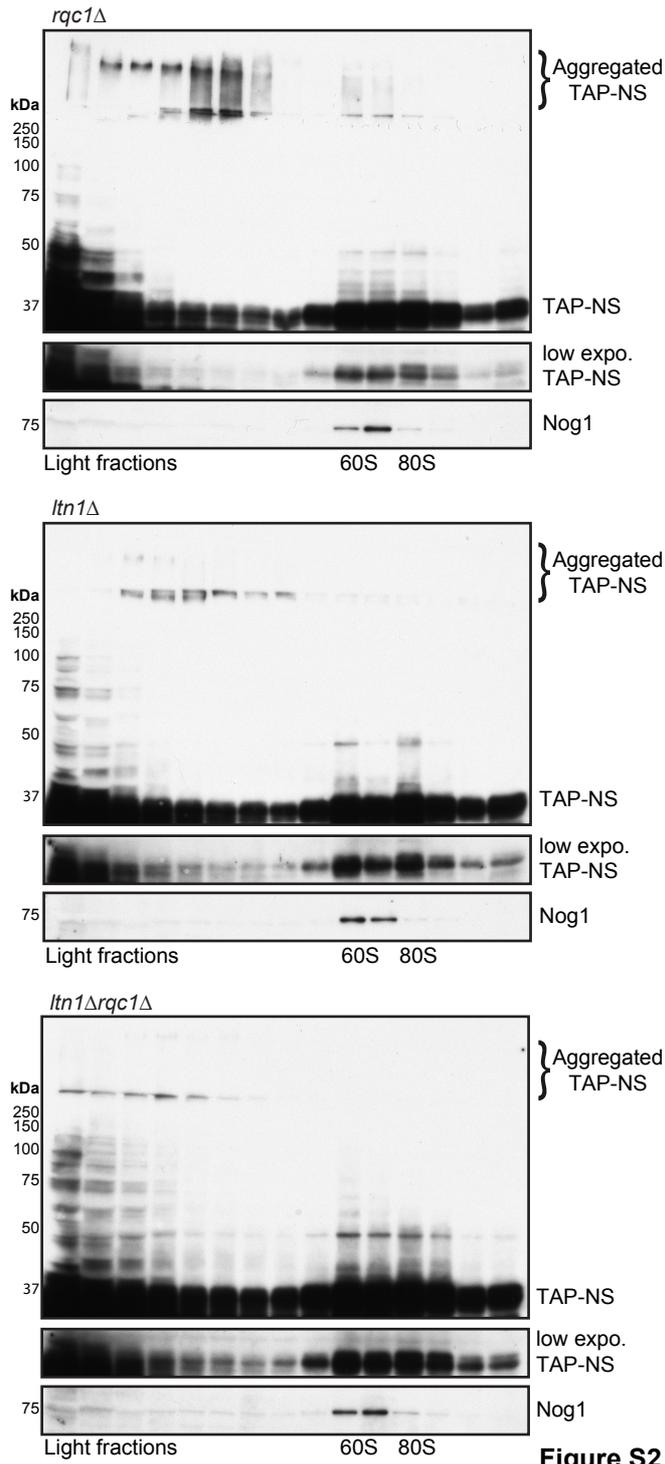


Figure S2

Résumé

Les mécanismes de régulation et contrôle-qualité de l'expression des gènes permettent respectivement de maintenir un équilibre entre synthèse et dégradation des ARN messagers répondant aux besoins cellulaires et d'empêcher l'expression d'ARN messagers ou de protéines aberrants potentiellement toxiques pour la cellule. Afin de mieux comprendre les processus cytoplasmiques de contrôle-qualité, je me suis intéressée à trois facteurs protéiques, Jlp2, Tac4 et Ska1, ayant des liens physiques ou fonctionnels avec des acteurs du contrôle-qualité des ARN messagers et peptides appartenant aux complexes RQC et SKI. Jlp2 montre des liens de létalité synthétique avec les membres des complexes RQC et SKI mais son absence n'altère pas la voie de NonStop mRNA Decay (NSD), suggérant qu'elle pourrait être impliquée dans une autre voie de contrôle dépendante des complexes RQC et SKI. Tac4 est une ARN hélicase putative associée aux ribosomes, plus précisément au niveau de l'hélice H16 de l'ARN ribosomique 18S, comme son homologue putatif DHX29 chez les mammifères. Elle interagit également au niveau des séquences 3'-UTR des ARN messagers. Prises dans leur ensemble, ces observations suggèrent que Tac4 pourrait être impliquée dans la réinitiation de la traduction et le sauvetage de ribosomes non-dissociés récemment identifiés dans la région 3'-UTR d'ARN messagers. Enfin, nous avons identifié un nouveau facteur, Ska1, appartenant à une nouvelle sous-population de complexes SKI. Nos données suggèrent que ce complexe SKI-Ska1 est impliqué dans la voie de dégradation de transcrits dépourvus de ribosome. Nous proposons un modèle selon lequel le complexe SKI agirait en deux étapes. Dans un premier temps, il participerait avec Ska1 à la dégradation des 3'-UTR par l'exosome, puis dans un deuxième temps, lorsque le complexe SKI-Ska1-exosome arrive dans la région codante et rencontre un ribosome, Ska1 se dissocierait du complexe SKI afin de lui permettre d'interagir directement avec le ribosome afin de poursuivre la dégradation de 3' vers 5' de l'ARN messager.

The mechanisms responsible for the regulation of gene expression and its quality-control are required, respectively, for maintaining an equilibrium between mRNA synthesis and degradation and to prevent the synthesis of aberrant mRNAs and proteins potentially toxic for the cells. To better understand these quality-control mechanisms, I studied three factors, Jlp2, Tac4 and Ska1, with physical and functional links described with factors involved in mRNA and protein quality-control, the RQC and SKI complexes. Jlp2 shows synthetic lethality with the RQC and SKI complexes but his deletion has no effect on NonStop mRNA Decay (NSD), suggesting that Jlp2 could be implicated in another control pathway linked to the RQC and SKI complexes. Tac4 is a putative RNA helicase bound to ribosomes, on the 18S ribosomal RNA H16 helix, as its mammalian putative homologue DHX29. DHX29 was reported to play a role in translation initiation. But, surprisingly, Tac4 interacts, in addition to ribosomes, with mRNA 3'-UTRs. Taken together, these observations suggest that Tac4 could be implicated in translation reinitiation and rescue of non-dissociated-ribosomes, which were recently described within mRNA 3'-UTRs. Finally, we identified Ska1, a new factor associated to a SKI complex subpopulation. Our observations suggest that the SKI-Ska1 complex is implicated in the degradation of transcripts devoid of ribosomes. It suggests a model by which the SKI complex would proceed in two steps. First, the SKI complex associated with Ska1 could assist the cytoplasmic exosome to degrade the 3'-UTR regions of mRNAs and then, when the SKI-Ska1-exosome complex reaches the coding region and encounter a ribosome, ska1 would leave the SKI complex and allow it to directly interact with ribosomes to proceed further in the 3' to 5' mRNA degradation.