Caractérisation fonctionnelle du complexe RQC dans le contrôle qualité de la traduction et le maintien de l'homéostasie des protéines

Quentin Defenouillere

▶ **To cite this version:**

Quentin Defenouillere. Caractérisation fonctionnelle du complexe RQC dans le contrôle qualité de la traduction et le maintien de l'homéostasie des protéines. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066086 . tel-01296487

HAL Id: tel-01296487

https://theses.hal.science/tel-01296487

Submitted on 1 Apr 2016

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

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

THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

École Doctorale : Complexité du Vivant

Présentée par

Mr QUENTIN DEFENOUILLÈRE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI

Caractérisation fonctionnelle du complexe RQC dans le contrôle qualité de la traduction et le maintien de l'homéostasie des protéines

Soutenue le Lundi 30 Mars 2015 devant le jury composé de :

Mr Frédéric DEVAUX	Président du Jury
Mr Marc GRAILLE	Rapporteur
Mr Olivier NAMY	Rapporteur
Mr Lionel BÉNARD	Examinateur
Mr Sébastien LÉON	Examinateur
Mme Micheline FROMONT-RACINE	Directrice de thèse

THÈSE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

École Doctorale : Complexité du Vivant

Présentée par

Mr QUENTIN DEFENOUILLÈRE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie Paris VI

Caractérisation fonctionnelle du complexe RQC dans le contrôle qualité de la traduction et le maintien de l'homéostasie des protéines

Soutenue le Lundi 30 Mars 2015 devant le jury composé de :

Mr Frédéric DEVAUX	Président du Jury
Mr Marc GRAILLE	Rapporteur
Mr Olivier NAMY	Rapporteur
Mr Lionel BÉNARD	Examinateur
Mr Sébastien LÉON	Examinateur
Mme Micheline FROMONT-RACINE	Directrice de thèse

AVANT-PROPOS

Les mécanismes de contrôle qualité de l'expression des gènes chez les eucaryotes ont fait l'objet d'un intérêt particulier ces dernières années, principalement de par le lien étroit existant entre l'agrégation protéique causée par l'accumulation de protéines défectueuses et l'apparition de pathologies telles que certains cancers et de nombreuses maladies neurodégénératives.

L'accumulation de protéines aberrantes peut résulter d'une saturation des processus de repliement ou de dégradation des protéines causée par un stress cellulaire, ou bien de la traduction de transcrits aberrants, notamment d'ARN messagers causant un blocage des ribosomes en cours de traduction. Ces évènements d'arrêt traductionnel sont reconnus par des facteurs spécifiques permettant à la fois le recyclage des sous-unités ribosomiques bloquées, la dégradation des transcrits aberrants par le complexe SKI et l'exosome cytoplasmique, et enfin l'élimininations des peptides naissants synthétisés à partir de ces ARNm aberrants par le protéasome.

Durant ma thèse, je me suis particulièrement intéressé aux mécanismes de contrôle qualité permettant la reconnaissance et la dégradation de ce type de protéines aberrantes, et ainsi découvert l'existence d'un nouveau complexe, appelé complexe RQC, associé aux particules 60S bloquées et composé des protéines Rqc1, Rqc2, Ltn1 et de Cdc48 et ses co-facteurs Ufd1 et Npl4. Le complexe RQC permet à la fois la polyubiquitinylation du peptide naissant par Ltn1 et son extraction du tunnel de sortie de la 60S par Cdc48, afin que ce peptide soit escorté au protéasome pour être dégradé. De plus, ce complexe permet de déclencher la réponse Hsf1 en cas de stress traductionnel. Par ailleurs, il a été montré récemment que Rqc2 initie la reprise de l'élongation de la traduction par la 60S en coordonnant l'ajout d'alanines et de thréonines en C-terminal du peptide naissant (CAT tails), ce qui constitue un exemple inédit de synthèse protéique en absence de sous-unité 40S et de séquence d'ARN codante.

Notre étude fonctionnelle du facteur Rqc1 a révélé son importance pour le recrutement de Cdc48 sur la 60S bloquée, et pour la prévention de l'agrégation des protéines aberrantes portant des CAT tails afin d'assurer leur dégradation protéasomale. De plus, nous avons découvert d'autres facteurs de contrôle qualité, notamment Tom1 et Dsk2, capables de participer à l'adressage des protéines aberrantes au protéasome lorsque certains composants du complexe RQC sont déficients. Enfin, nos données montrent que le recrutement de co-chaperonnes et de chaperonnes telles que Sis1, Sgt2, Ssa1/2 et Hsp82 participent à la reconnaissance des agrégats de protéines aberrantes et pourraient également avoir un rôle dans la mise en place de la réponse Hsf1 au stress traductionnel.

Ce manuscrit de thèse résume les connaissances actuelles sur les mécanismes de dégradation et de contrôle qualité des ARN messagers et des protéines dans les différents compartiments cellulaires des cellules eucaryotes, et présente l'ensemble des travaux réalisés et des résultats obtenus sur les complexes RQC et SKI au cours de ma thèse.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, grâce à leur soutien durant ces quatre dernières années, à la réalisation et l'aboutissement de cette thèse, aussi bien sur le plan professionnel que personnel.

Je remercie ma directrice de thèse, Micheline Fromont-Racine, de m'avoir intégré dans le projet de recherche qu'elle dirige, de m'avoir encadré et conseillé depuis le début de mon stage M2 jusqu'à aujourd'hui, d'avoir partagé avec moi sa riche expérience dans la recherche fondamentale, et surtout de m'avoir enseigné les bases essentielles du métier de chercheur.

Je remercie les membres de mon jury de thèse, le président du jury Frédéric Devaux, les rapporteurs Marc Graille et Olivier Namy et les examinateurs Lionel Bénard et Sébastien Léon, pour avoir accepté de lire cette thèse de doctorat et de participer à ma soutenance de thèse.

J'adresse également mes remerciements à Alain Jacquier de m'avoir accueilli dans son laboratoire, d'avoir participé à mon encadrement et de m'avoir conseillé à chaque moment important de ce projet de recherche, et enfin de m'avoir fait confiance pour représenter son laboratoire lors des conférences auxquelles j'ai eu la chance de me rendre pour présenter mes travaux de recherche.

Je tiens à remercier tout particulièrement Abdelkader Namane pour ses conseils et pour toutes les analyses de spectrométrie de masse qu'il a réalisées, et qui a ainsi grandement contribué au succès de ce projet de recherche. Je remercie également Yanhua Yao et John Mouaikel pour leur importante contribution à ce projet, Frank Feuerbach pour son aide précieuse concernant la microscopie de fluorescence, Cosmin Saveanu et son équipe pour la réalisation des cribles génétiques, Gwenaël Badis-Bréard pour les expériences de CRAC, ainsi que tous les membres du laboratoire d'Alain Jacquier avec qui j'ai travaillé de 2010 à 2015. Je remercie aussi Lucia Oreus et son équipe, qui ont largement participé à la réussite de cette thèse grâce à leur excellent travail au laboratoire de préparation.

Je tiens à remercier Christian Schmidt, Thomas Becker et Roland Beckmann pour cette collaboration structurale qui m'a apporté énormément sur le plan scientifique, mais aussi pour leur accueil chaleureux à Munich et pour tous les moments passés au Weißbiergarten et au Starkbierfest.

Je remercie mes parents pour m'avoir soutenu tout au long de mes études et pour m'avoir fait confiance dans mes décisions, et sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Je remercie aussi mes grands parents, mes sœurs et mon frère, toute ma merveilleuse famille, ainsi que mes amis pour leur soutien et pour tous ces excellents moments passés ensemble.

Enfin, je remercie du fond du cœur la personne la plus importante dans l'aboutissement de cette thèse, Elena Rensen, qui m'a tant soutenu dans les moments les plus difficiles et qui a toujours été à mes côtés pour partager mes joies. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la fin de ta thèse, et j'espère être un soutien aussi précieux dans sa réalisation que tu l'as été pour la mienne.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS 6

INTRODUCTION 8

1 - Mécanismes de régulation quantitative et qualitative des produits de l'expression des gènes 8

1.1 Processus de régulation quantitative 8

1.2 Mécanismes de contrôle qualité des ARN messagers et des protéines 10

2 - La traduction eucaryote : initiation, élongation, terminaison et recyclage des sous-unités ribosomiques 10

2.1 Le ribosome, au centre de la machinerie de synthèse des protéines 11

2.2 Initiation de la traduction chez les eucaryotes 12

2.3 Mécanisme d'élongation de la traduction 13

2.4 Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes 16

3 - Mécanismes de dégradation et de contrôle qualité des ARNm 18

3.1 Mécanismes nucléaires de contrôle qualité des ARN messagers 18

3.2 Mécanismes cytoplamiques de dégradation des ARN messagers 21

3.3 Processus de contrôle qualité cytoplasmiques des ARN messagers 24

3.3.1 Le Nonsense Mediated mRNA Decay chez *Saccharomyces cerevisiae* 25

3.3.2 Le Nonsense Mediated mRNA Decay chez les métazoaires 28

3.3.3 Transcrits aberrants cytoplasmiques conduisant à un arrêt traductionnel 29

3.3.4 Processus d'arrêt traductionnel induit par la traduction d'ARNm aberrants 31

3.3.5 Mécanisme de recyclage des sous-unités ribosomiques bloquées 33

3.3.6 Dégradation des transcrits aberrants Non-Stop et No-Go 36

3.4 Mécanismes de contrôle qualité de la traduction chez les procaryotes 38

4 - Mécanismes cotraductionnels de contrôle qualité des protéines 40

4.1 Etapes cotraductionnelles de maturation des protéines 40

4.2 L'ubiquitinylation, une étape essentielle pour la dégradation des protéines aberrantes ou défectueuses 41

4.3 L'ubiquitinylation cotraductionnelle : commencer à dégrader avant de finir de synthétiser 44

4.4 Le contrôle qualité de la traduction par le complexe RQC 45

4.5 Contrôle qualité des particules ribosomiques bloquées 56

5 - Autres mécanismes cellulaires de contrôle qualité des protéines 58

5.1 Dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique 58

5.2 Processus nucléaires de contrôle qualité des protéines 61

5.3 Contrôle qualité des protéines mitochondriales 64

6 - Réponses cellulaires au stress traductionnel : le système UPR et la formation d'agrégats protéiques 67

6.1 Le système UPR : Unfolded Protein Response 68
6.2 Systèmes d'adressage et d'élimination des agrégats protéiques 68
6.3 Formation et organisation de l'agrésome 71
7 - Pathologies liées aux mécanismes de contrôle qualité et à l'accumulation d'agrégats protéiques 74
7.1 Pathologies causées par l'accumulation d'agrégats protéiques 74
7.2 Maladies liées à des défauts de contrôle qualité des ARN 76
7.3 Le protéasome et Cdc48/p97, cibles thérapeutiques contre le cancer 78
RÉSULTATS 82
1 - Découverte et caractérisation du complexe RQC 83
2 - Le complexe RQC participe à l'adressage des protéines aberrantes au protéasome après leur extraction de la 60S 98
3 - Systèmes de contrôle qualité éliminant les agrégats protéiques non adressés au protéasome par le complexe RQC 106
4 - Etude structurale du complexe RQC lié à la 60S bloquée 131
4.1 Caractérisation structurale du complexe RQC par cryo-EM 131
4.1.1 Introduction à la cryo-microscopie électronique 132
4.1.2 Purification des particules 60S associées au complexe RQC 134
4.1.3 Analyse par cryo-microscopie électronique des complexes purifiés 135
4.2 Crosslinks protéine-protéine des facteurs du complexe RQC avec les protéines de la particule 60S 145
4.2.1 Description de la méthode de crosslink protéine-protéine au DSS 145
4.2.2 Résultats du crosslink au DSS de l'échantillon Rqc2-TAP 147
4.3 Crosslinks protéine-ARN de Rqc1 et Rqc2 avec l'ARNr 25S 151
4.3.1 Description de la méthode de crosslink protéine-ARN aux UV (CRAC) 151
4.3.2 Résultats de crosslinks obtenus pour Rqc1-CRAC et Rqc2-CRAC 152
5 - Validation *in vivo* de l'interaction du complexe SKI avec les ribosomes bloqués 154
DISCUSSION ET PERSPECTIVES 161
1 - Cibles naturelles du NSD-NGD et signaux de reconnaissance 161
2 - Clivage endonucléolytique et dégradation des ARNm aberrants 163
3 - Hydrolyse du peptidyl-ARNt et extraction du peptide de la 60S 166
4 - Rôle de Rqc1 dans la prévention de l'agrégation protéique 168
5 - Mécanisme d'action des facteurs de contrôle qualité identifiés 170
CONCLUSIONS 173
MATÉRIELS ET MÉTHODES 174
BIBLIOGRAPHIE 182

ANNEXES **200**

Annexe 1 - Résultats des tests de croissance et des cribles génétiques des mutants *tetO$_2$CDC48* et *rqc1*Δ à 30°C et 37°C 201

Annexe 2 - Souches de levure utilisées au cours de cette étude 205

Annexe 3 - Plasmides utilisés au cours de cette étude 209

Annexe 4 - Anticorps utilisés pour les immunodétections 209

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : **A**cide **d**ésoxyribo**n**ucléique

ARN : **A**cide **r**ibo**n**ucléique

ARNm : **ARN m**essager

ARNr : **ARN r**ibosomique

ARNt : **ARN** de **t**ransfert

EJC : **E**xon **j**unction **c**omplex

ER : **R**éticulum **e**ndoplasmique

ERAD : **D**égradation des protéines **a**ssociées au **ER**

IPOD : **D**épôt de **p**rotéines **i**nsolubles

JUNQ : Compartiment **ju**xta**n**ucléaire de contrôle **q**ualité

mRNP : Complexe **m**essager - **r**ibo**n**ucléo**p**rotéines

NGD : **N**o **g**o mRNA **d**ecay

NMD : **N**onsense - **m**ediated mRNA **d**ecay

NPC : **C**omplexe du **p**ore **n**ucléaire

NRD : **N**onfunctional **r**RNA **d**ecay

NSD : **N**on **s**top mRNA **d**ecay

ORF : **O**pen **r**eading **f**rame

PTC : **P**remature **t**ermination **c**odon

RQC : **R**ibosome-bound **q**uality **c**ontrol

SKI : **S**uper**ki**ller

SURF : **S**mg1, **U**pf1 and **r**elease **f**actors

uORF : **U**pstream **o**pen **r**eading **f**rame

UPR : **U**nfolded **p**rotein **r**esponse

UTR : **U**n**tr**anslated region

INTRODUCTION

INTRODUCTION

1 - Mécanismes de régulation quantitative et qualitative des produits de l'expression des gènes

L'expression génétique chez les eucaryotes est constituée d'un ensemble de processus allant de la synthèse d'ARN messagers à partir de l'ADN, qui porte l'information génétique, jusqu'à la production de protéines fonctionnelles à partir de ces ARN messagers. La plupart des étapes de synthèse et de maturation des ARN et des protéines sont finement régulées par des mécanismes moléculaires permettant d'optimiser à la fois la quantité et la qualité de chaque type d'ARN et de protéine présent dans les cellules et nécessaire au bon fonctionnement de celles-ci.

1.1 Processus de régulation quantitative

Concernant la régulation de la quantité de ces différents produits de l'expression génétique, les études de transcriptomique et de protéomique à grande échelle ont montré qu'il existe de grandes variations du niveau d'expression entre les différentes biomolécules composant un transcriptome ou un protéome. Par exemple, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, alors que certains gènes codent pour des protéines dont le niveau d'expression est estimé à seulement quelques dizaines ou centaines de copies par cellule, d'autres protéines telles que Pma1, Fba1 ou Eno1 ont un niveau d'expression dépassant le million de copies par cellule (**Figure 1**) (Ghaemmaghami et al., 2003; Li et al., 2014). Des analyses de protéomique quantitative effectuées sur le protéome de *Saccharomyces cerevisiae* estiment qu'il y aurait jusqu'à six ordres de magnitude entre les niveaux d'expression des protéines les plus abondantes et les moins abondantes (Picotti et al., 2009).

Ces grandes variations d'abondance des ARN messagers et des protéines au sein d'une même cellule peuvent s'expliquer par des hétérogénéités au niveau des mécanismes d'expression intrinsèques à chaque gène ou famille de gènes (par exemple, la capacité de chaque promoteur de gène à recruter la machinerie de transcription, la demi-vie de l'ARN messager transcrit, le taux de traduction de cet ARN messager, ou encore la demi-vie des protéines produites à partir de cet ARN

messager). Par ailleurs, l'abondance de certains ARN messagers et de certaines protéines varie en fonction de l'environnement extracellulaire, par exemple en fonction des nutriments présents dans le milieu (Hashimoto et al., 1983 ; Nogi et al., 1984) ou de la température (McAlister et al., 1979). Enfin, il existe également des mécanismes d'autorégulation qui permettent notamment l'activation de la transcription (ou de la traduction) de certains gènes lorsque la concentration cellulaire en protéines codées par ce gène est faible, ou la répression transcriptionnelle (ou traductionnelle) de ce gène lorsque la quantité de protéines correspondantes est trop élevée. Ces boucles d'autorégulation permettent de maintenir la concentration cellulaire de certaines protéines à un niveau constant, notamment lors d'une variation des conditions environnementales susceptible d'affecter le niveau d'expression de ces protéines.

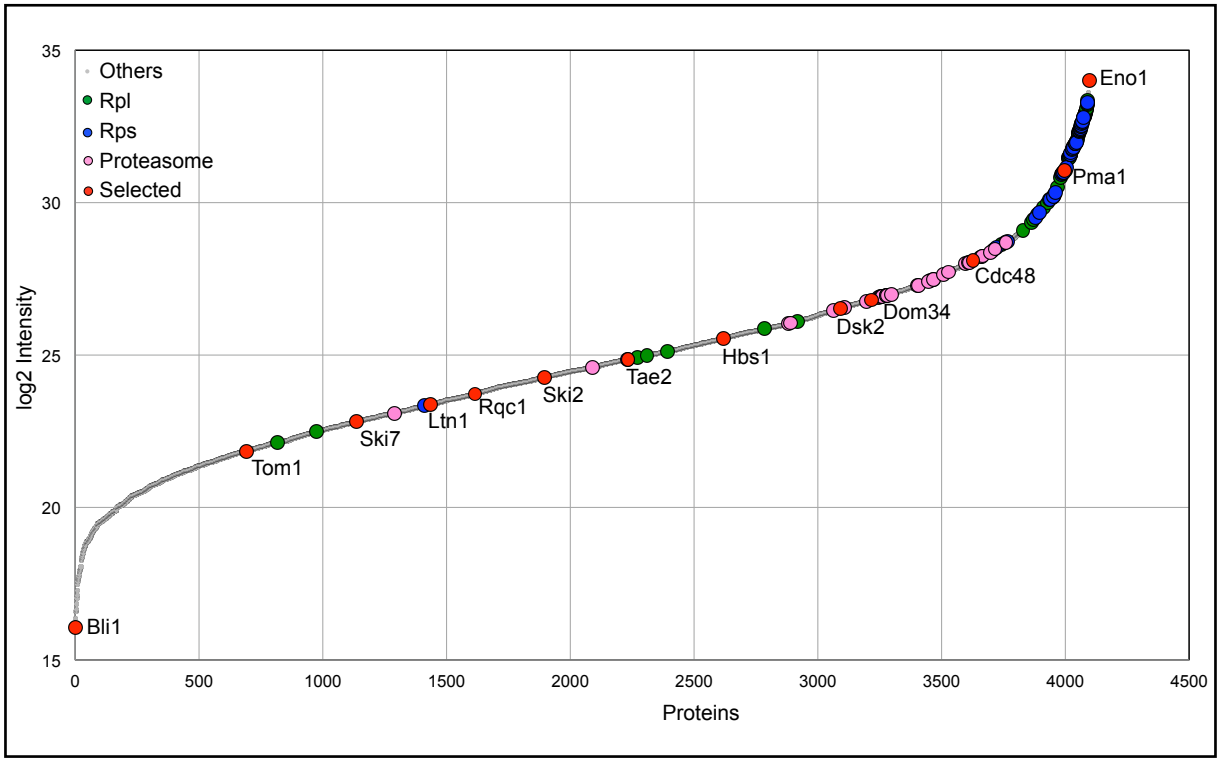


Figure 1. Abondance relative de 66% du protéome de *S. cerevisiae*
Données analysées par Abdelkader Namane à partir de (Nagaraj et al., 2012).
Les 4096 protéines identifiées sont classées selon leur abondance relative.

1.2 Mécanismes de contrôle qualité des ARN messagers et des protéines

Les mécanismes cellulaires contrôlant la qualité des ARN messagers et des protéines ne sont en général pas spécifiques à certains gènes, mais ciblent plutôt l'ensemble du transcriptome et du protéome, respectivement. Ils sont souvent conservés chez tous les eucaryotes, parfois même jusque chez les archées (Atkinson et al., 2008). Des processus de contrôle qualité ont été identifiés et décrits pour la plupart des étapes de synthèse et de maturation des ARNm et des protéines. Leur but est de détecter et d'éliminer les produits défectueux de la transcription et de la traduction, de manière à maintenir la fonctionnalité du transcriptome et du protéome et ainsi préserver l'intégrité de l'information génétique. De plus, les protéines défectueuses (protéines tronquées, mal repliées ou aberrantes) peuvent causer des pertes ou des gains de fonction souvent synonymes de pathologies (Cleary and Ranum, 2013) et ont tendance à former des agrégats protéiques dont l'accumulation peut s'avérer toxique pour la cellule (voir revues Richter et al., 2010; Holmes et al., 2014). Contrôler la qualité des produits de l'expression des gènes est donc un processus fondamental souvent très conservé au cours de l'évolution, qui nécessite de nombreux mécanismes et facteurs qui ne sont pas systématiquement essentiels, mais qui souvent le deviennent en cas de stress affectant l'intégrité des ARN messagers ou l'homéostasie des protéines, tel qu'un stress oxydatif (Li et al., 2006), un choc thermique (Mogk et al., 2003), ou encore une période de carence (Elzen et al., 2014).

2 - La traduction eucaryote : initiation, élongation, terminaison et recyclage des sous-unités ribosomiques

Une grande partie des mécanismes de contrôle qualité cytoplasmiques des ARN messagers et des protéines s'effectuant de manière couplée à la synthèse des protéines (Shoemaker and Green, 2012), il est important de rappeler les principales étapes de cette synthèse avant de détailler les différents processus de contrôle qualité existant chez les eucaryotes. La synthèse des protéines, aussi appelée traduction, est une étape fondamentale de l'expression des gènes qui permet de

décoder l'information génétique alors portée par les ARN messagers afin de synthétiser des protéines fonctionnelles. Les ribosomes jouent un rôle essentiel dans ce processus, allant du décodage de l'information portée par des séquences d'acide ribonucléique jusqu'à la synthèse de polypeptides (ou protéines) composés de chaînes d'aminoacides. La traduction est l'un des mécanismes les plus conservés chez l'ensemble des êtres vivants, que ce soit au niveau de la structure du ribosome, de l'ordre séquentiel des évènements (initiation, élongation, traduction) ou encore des nombreux facteurs impliqués dans chacune de ces étapes (Davidovich et al., 2009; Rodnina and Wintermeyer, 2009). La traduction est un processus cyclique qui nécessite un réservoir de sous-unités ribosomiques libres, dont la régulation s'effectue principalement au niveau de son initiation (voir revue Jackson et al., 2010). En comparaison à la régulation transcriptionnelle, le contrôle de la traduction permet des changements plus rapides au niveau des concentrations cellulaires des protéines codées, permettant aux cellules de maintenir l'homéostasie des protéines et de s'adapter efficacement à des changements de conditions physiologiques ou environnementales (Sonenberg and Hinnebusch, 2009).

2.1 Le ribosome, au centre de la machinerie de synthèse des protéines

Le ribosome est une macromolécule (2,5MDa chez les procaryotes et les archées, 4MDa chez les eucaryotes) composée à la fois d'ARN ribosomique portant une activité catalytique (ribozyme) et de protéines ayant principalement un rôle structural (**Figure 2**). Malgré cette différence de taille des ribosomes entre procaryotes et eucaryotes, les régions fonctionnelles (centre de décodage et centre d'activité peptidyl-transférase) sont toujours portées par des séquences d'ARN ribosomique hautement conservées (Sonenberg et al., 1975). Le ribosome est constitué de 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 contient le centre d'activité peptidyl-transférase qui synthétise la chaîne polypeptidique à partir d'ARN de transfert chargés (aminoacyl-ARNt), ainsi qu'un tunnel de sortie par lequel sort le polypeptide néosynthétisé. La 60S possède également trois sites pouvant contenir des ARN de transfert (A, P et E) par lesquels entrent (site A) et sortent (site E) les ARNt, le site P étant celui où a lieu le transfert de la liaison covalente entre chaque ARNt aminoacylé et le peptide naissant (Sonenberg et al., 1977). La 40S contient le sillon par lequel passe l'ARN messager

au fur et à mesure qu'il est décodé, et est la première des deux sous-unités à être recrutée lors du processus d'initiation de la traduction. Les deux unités s'assemblent à la fin de l'initiation de la traduction pour former des particules 80S, cependant les particules 40S et 60S peuvent également s'assembler indépendamment de la traduction sous formes de ribosomes libres, qui représentent en réalité la grande majorité des ribosomes cellulaires (jusqu'à 70% des ribosomes chez les mammifères) (Cooper et al., 1976).

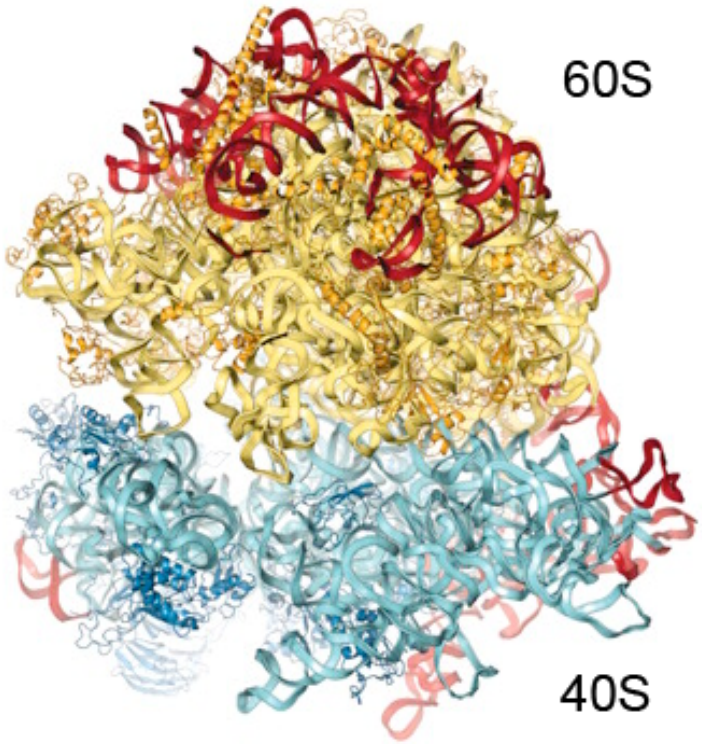


Figure 2. Structure du ribosome 80S de *Saccharomyces cerevisiae*
Les protéines ribosomiques de la 40S sont en bleu foncé, l'ARNr 18S en bleu clair, les protéines de la 60S en jaune foncé et l'ARNr 25S en jaune clair.
Les segments d'expansion des ARNr sont indiqués en rouge.
Structure crystallographique à 4.15 Å (Ben-Shem et al., 2010).

2.2 Initiation de la traduction chez les eucaryotes

L'initiation de la traduction est définie comme l'assemblage sur un ARN messager de ribosomes 80S compétents pour l'élongation. La première étape de l'initiation de la traduction nécessite l'assemblage de deux complexes ribonucléoprotéiques indépendants (voir revue Jackson et al., 2010). D'une part, le complexe de pré-initiation 43S, constitué d'une sous-unité 40S, du complexe ternaire

eIF2-GTP-Met-ARNt$_i^{Met}$ (Levin et al., 1973) et des protéines eIF1, eIF1A, eIF3, et eIF5 (en réalité, eIF3, eIF1 et eIF1A sont recrutés sur la 40S lorsqu'elle est toujours associée à un ARNt et à un ARNm et participent à son recyclage post-traductionnel) (Pisarev et al., 2007). D'autre part, la circularisation du transcrit (rapprochement entre la coiffe en 5' et les protéines PABP liées à la queue poly(A) en 3') coordonnée par le complexe eIF4F (eIF4G-eIF4A-eIF4E) et eIF4B, cette étape étant également appelée "activation de l'ARNm".

Ces deux complexes s'associent alors, permettant l'interaction entre la 40S et la coiffe en 5' de l'ARN messager qui va être traduit (Pisarev et al., 2008). Après déroulement de la structure secondaire de l'ARNm en 5' par le complexe eIF4F et eIF4B (Marintchev et al., 2009), a lieu une étape de "scanning" par la 40S, qui parcourt le transcrit de 5' en 3' jusqu'à ce qu'elle atteigne le codon AUG correspondant au début de la séquence codante (Kozak, 1980). La reconnaissance de ce codon initiateur permet la formation du complexe 48S, constitué de la particule 40S, de l'ARN messager, et de l'ensemble des facteurs d'initiation de la traduction associés (Thomas and R. V. Arnstein, 1984). Les facteurs eIF5 et eIF5B-GTP sont alors recrutés et favorisent l'hydrolyse du GTP porté par eIF2, permettant ainsi le recyclage des facteurs d'initiation de la traduction (ce qui interrompt l'interaction entre la coiffe et la queue poly(A) du transcrit), puis la liaison entre le complexe 40S-ARNm et la sous-unité 60S (Raychaudhuri et al., 1985; Pestova et al., 2000). Enfin, l'hydrolyse du GTP porté par eIF5B permet le recyclage d'eIF5B et eIF1A ; la particule 80S positionnée sur l'AUG de l'ARN messager est alors compétente pour commencer l'élongation de la traduction.

2.3 Mécanisme d'élongation de la traduction

Le ribosome assemblé sur l'ARN messager contient dans son site P un ARN de transfert initiateur méthionine (Met-ARNt$_i^{Met}$) dont la boucle anticodon est appariée avec le codon d'initiation AUG. Le deuxième codon, situé en 3' par rapport au codon AUG, se trouve alors dans le site A du ribosome, et attend l'appariement de l'ARNt-aminoacyl correspondant. En parallèle, le facteur d'élongation de la traduction eEF1A (orthologue d'EF-Tu chez les procaryotes) interagit avec un ARN de transfert chargé de manière GTP-dépendante et guide cet ARNt dans le site A du ribosome (voir **Figure 3**) (Moon et al., 1972). La reconnaissance du codon

complémentaire à la boucle anticodon de l'ARN de transfert déclenche l'hydrolyse du GTP porté par eEF1A, ce qui permet le recyclage de ce dernier et l'accommodation de l'ARNt dans le site A (voir revue Rodnina and Wintermeyer, 2001). La formation de la première liaison peptidique, entre la méthionine portée par l'ARNt$_i^{Met}$ et l'aminoacide porté par l'ARNt accommodé dans le site A, est ensuite catalysée grâce au positionnement des substrats par le centre peptidyl-transférase (PTC) porté par l'ARNr de la sous-unité 60S. La structure de cette région d'ARNr constituant le PTC est presque identique entre la 50S bactérienne et la 60S eucaryote, ce qui suggère que le mécanisme de formation de la liaison peptidique est universellement conservé chez tous les êtres vivants (Ben-Shem et al., 2010; Klinge et al., 2011).

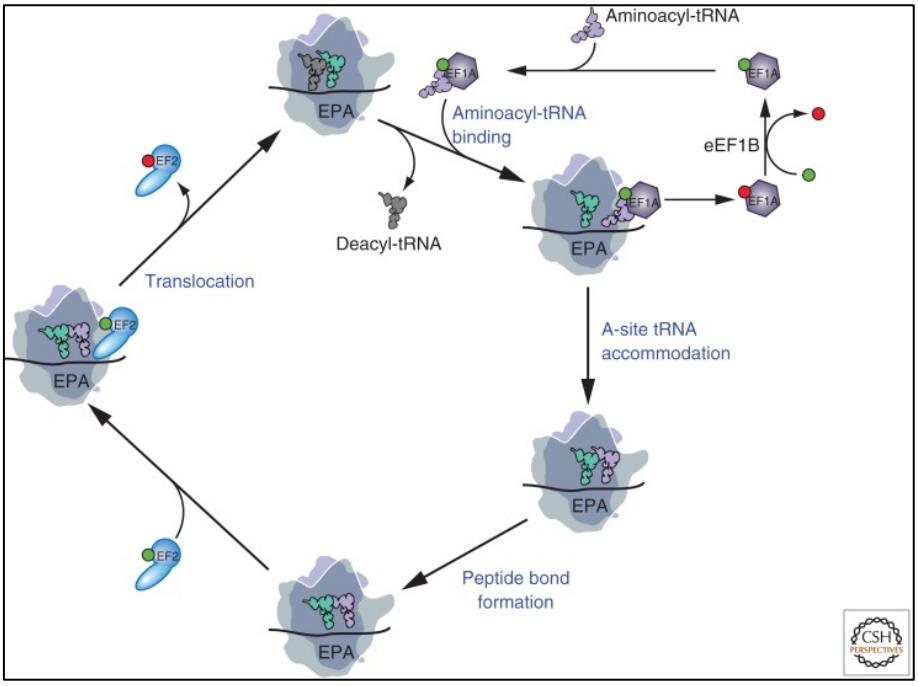


Figure 3. Elongation de la traduction eucaryote
Schéma issu de Dever and Green, CSH Perspectives Biology, 2012

L'étape suivante est la rotation des sous-unités ribosomiques, mouvement appelé "ratcheting" (Frank and Agrawal, 2000), qui permet le déplacement des ARNt vers les états hybrides A/P et P/E, respectivement. Le recrutement de la GTPase eEF2 (EF-G chez les procaryotes) et l'hydrolyse de GTP par eEF2 stabilise cet état hybride des ARNt, et un changement de conformation d'eEF2 va permettre la translocation des ARN de transfert et de l'ARN messager à l'intérieur du ribosome en cours d'élongation et le maintien de ce dernier dans un état de post-translocation (Gao et al., 2009). Dans cet état, le site E du ribosome contient un ARNt-acyl qui est

relargué de manière indépendante à l'accomodation de l'ARNt suivant dans le site A (Uemura et al., 2010). Le site P contient un ARNt lié covalemment à la chaîne peptidique en cours de synthèse, entité appelée "peptidyl-ARNt". Enfin, le site A du ribosome est à nouveau libre et positionné sur le troisième codon de l'ARN messager, prêt à accueillir l'ARNt-aminoacyl suivant (voir revue Dever and Green, 2012).

En parallèle, le facteur eEF1A est recyclé au moment de l'hydrolyse de GTP en GDP et se lie à eEF1B qui effectue un échange de nucléotides GDP-GTP sur eEF1A. Le complexe eEF1A-GTP ainsi reconstitué pourra interagir de nouveau avec un ARNt-aminoacyl et réaliser l'accomodation de ce dernier dans le site A d'un ribosome. Alors que les facteurs eEF1A et EF-Tu présentent une forte homologie structurale, leur recyclage GDP-GTP est réalisé par des mécanismes distincts entre procaryotes et eucaryotes (Rodnina and Wintermeyer, 2009). En plus d'eEF1A et eEF2, il existe un troisième facteur d'élongation de la traduction spécifique des champignons, eEF3. Alors que eEF1A et eEF2 se lient au niveau du site A du ribosome, l'ATPase eEF3 s'associe au ribosome à plusieurs endroits : protubérance centrale de la 60S, tête de la 40S, ainsi qu'à proximité du site E (Andersen et al., 2006). L'hydrolyse d'ATP par eEF3 est nécessaire pour sa dissociation du ribosome après translocation, et il a été suggéré que eEF3 pouvait avoir un rôle dans le recyclage de l'ARNt-acyl présent dans le site E, bien qu'il ne soit pas requis pour l'élongation de la traduction chez les métazoaires. Une étude a également proposé un rôle pour eEF3 dans le recyclage des ribosomes et de l'ARN messager lors de la terminaison de la traduction (Kurata et al., 2010).

Enfin, le facteur eIF5A (EF-P chez les procaryotes), initialement décrit comme participant à l'initiation de la traduction car il favorise la liaison covalente entre la méthionine de l'$ARNt_i$ et l'ARN de transfert suivant (Kemper et al., 1976), semble avoir un rôle important dans l'élongation de la traduction car il stimule la réactivité entre le peptidyl-ARNt dans le site P et l'ARNt-aminoacyl présent dans le site A du ribosome (Gregio et al., 2009; Saini et al., 2009). Même si la fonction d'eIF5A dans l'élongation de la traduction n'est pas entièrement connue, il possède une modification post-traductionnelle très rare appelée hypusination, nécessaire pour toutes les activités connues d'eIF5A liées à la traduction (Park et al., 2010).

L'élongation de la traduction se poursuit ainsi de manière cyclique, avec le recrutement de chacun des facteurs (eEF1A, eEF2, et probablement eEF3 et eIF5A) à chaque étape de transfert de la chaîne peptidique sur l'ARNt-aminoacyl accommodé dans le site A et de translocation du ribosome, jusqu'à ce que ce ribosome atteigne la fin de la séquence codante et qu'un codon de terminaison de la traduction (UGA, UAG ou UGA) en phase, porté par l'ARN messager, entre dans le site A.

2.4 Terminaison de la traduction et recyclage des ribosomes

Chez les eucaryotes, la terminaison de la traduction est catalysée par deux facteurs, eRF1 et eRF3 (voir revue Dever and Green, 2012). La protéine eRF1 est un homologue structural d'ARN de transfert, constituée de trois domaines distincts. Le domaine N-terminal contient une boucle avec un motif NIKS, nécessaire à la reconnaissance du codon de terminaison par décodage du codon avec des interactions similaires à l'interaction codon:anticodon (Chavatte et al., 2002; Frolova et al., 2002). Le domaine M central, analogue fonctionnel de la boucle acceptrice d'un ARNt, est inséré près du centre peptidyl-transférase du ribosome (Song et al., 2000). Il contient un motif GGQ qui coordonne l'hydrolyse du peptidyl-ARNt et ainsi permet la libération du polypeptide néosynthétisé (Frolova et al., 1999). Enfin, le domaine C-terminal d'eRF1 facilite les interactions physiques avec la GTPase traductionnelle eRF3 (Merkulova et al., 1999; Cheng et al., 2009). Alors que le domaine C-terminal d'eRF3 est important pour l'interaction avec les domaines M et C-ter d'eRF1, la partie N-terminale d'eRF3 est peu conservée et non essentielle à la terminaison de la traduction eucaryote. Cependant, ce domaine N-terminal est impliqué dans des interactions physiques avec PABP et Upf1 (voir paragraphe **3.3.1**) (Hoshino et al., 1999; Ivanov et al., 2008). Le complexe ternaire eRF1-eRF3-GTP se lie aux ribosomes contenant un codon STOP dans le site A (voir **Figure 4**). L'hydrolyse de GTP par eRF3 permet le positionnement du domaine N-terminal d'eRF1 près du codon STOP, et du domaine M d'eRF1 à proximité du PTC, ce qui va permettre par la suite la catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidyl-ARNt (Frolova et al., 1996; Alkalaeva et al., 2006). Le complexe eRF3-GDP est alors dissocié du ribosome, tandis que eRF1 est maintenu dans le site A (Pisarev et al., 2007).

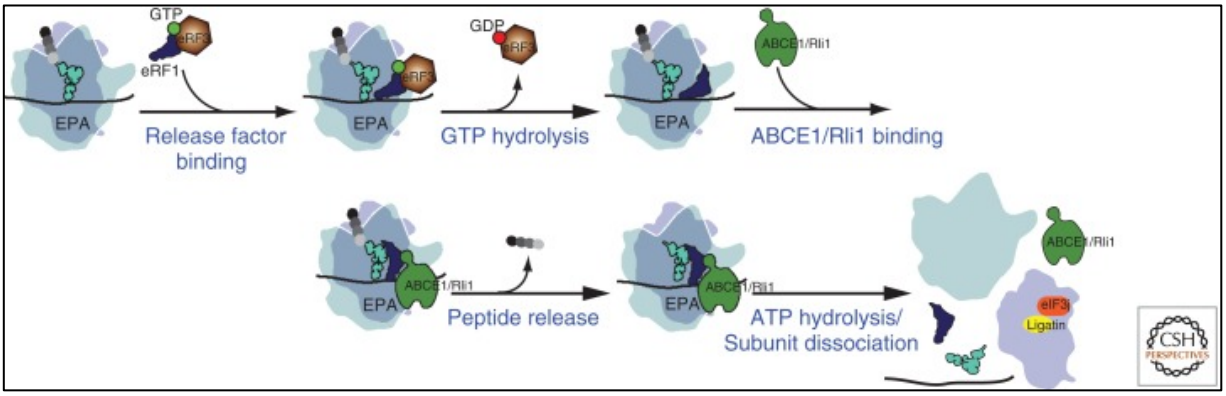


Figure 4. Terminaison de la traduction et recyclage des sous-unités 60S et 40S
Schéma issu de Dever and Green, CSH Perspectives Biology, 2012

Après recyclage d'eRF3-GDP, le facteur ABCE1 (Rli1 chez la levure) est recruté sur le complexe 80S-eRF1, et va permettre au domaine M d'eRF1 de coordonner l'hydrolyse du peptidyl-ARNt : le polypeptide traduit est alors transféré sur une molécule d'H_2O (Shoemaker and Green, 2011; Becker et al., 2012; Preis et al., 2014). En effet, alors que les études précédentes proposaient que l'hydrolyse du peptidyl-ARNt avait lieu avant recyclage d'eRF3-GDP (Frolova et al., 1996), les structures des complexes 80S-eRF1-eRF3 et 80S-eRF1-Rli1 obtenues par cryo-microscopie électronique ont montré que le décodage du codon STOP et la libération du polypeptide sont des étapes découplées, réalisées par eRF1 avec la coopération respective d'eRF3 et de Rli1/ABCE1 (Preis et al., 2014). L'hydrolyse d'ATP par Rli1/ABCE1 permet alors le recyclage de la sous-unité ribosomique 60S (Pisarev et al., 2010). Nous verrons par la suite qu'un autre hétérodimère, Dom34-Hbs1, homologue d'eRF1-eRF3, est requis pour la reconnaissance des ribosomes bloqués lors de la traduction de certains ARN messagers aberrants (voir paragraphe **3.3.5**). Cependant, le facteur Rli1/ABCE1 est nécessaire pour le recyclage des ribosomes que ce soit lors de la terminaison de la traduction canonique ou aberrante (Shoemaker and Green, 2011). Enfin, le complexe 40S-ARNm-ARNt-acyl est dissocié par les facteurs d'initiation de la traduction eIF3, eIF1, eIF1A et eIF3j, une étape favorisée par le facteur eIF2D/Ligatin, permettant ainsi le recyclage de ces éléments pour qu'ils puissent être réengagés dans de nouveaux cycles de traduction (Becker et al., 2012; Jackson et al., 2012).

3 - Mécanismes de dégradation et de contrôle qualité des ARNm

Toutes les étapes de production et de maturation des ARN messagers ont lieu dans le noyau, et c'est principalement après maturation complète qu'ils sont exportés vers le cytoplasme où ils rempliront leur principale fonction d'intermédiaire entre l'information génétique portée par l'ADN et la machinerie de synthèse des protéines. Cette compartimentation entre synthèse, maturation et fonction des ARN messagers nécessite un suivi du bon déroulement de chaque étape de maturation par des mécanismes de contrôle qualité nucléaires, afin de limiter la production et l'accumulation de transcrits aberrants et d'éviter l'export d'ARN messagers défectueux dans le cytoplasme qui pourraient engendrer des protéines aberrantes s'ils sont engagés dans des cycles de traduction. En effet, l'ARN messager étant le garant de la correspondance entre l'information génétique contenue dans le noyau et la synthèse des protéines dans le cytoplasme, il est essentiel que les ARN messagers qui traversent la membrane nucléaire reflètent le plus précisément possible l'information génétique portée par l'ADN, de manière à préserver l'intégrité de cette information lorsqu'elle parvient à la machinerie de traduction, et à assurer la qualité des protéines produites. Plusieurs mécanismes de contrôle qualité nucléaires des ARN messagers ont ainsi été découverts, dont le but est d'éliminer les transcrits n'ayant pas suivi correctement certaines étapes de maturation, afin d'optimiser la qualité du transcriptome avant qu'il ne soit exporté vers le cytoplasme.

3.1 Mécanismes nucléaires de contrôle qualité des ARN messagers

Chez les eucaryotes, l'ARN polymérase II constitue la machinerie de synthèse des ARN messagers, ainsi que d'autres types d'ARN non codants tels que la majeure partie des ARNsn ou les ARNsno. Les ARNm passent par plusieurs étapes de maturation au cours de leur synthèse : apposition d'une coiffe en 5' (m^7G triphosphate), excision des introns (épissage), ajout d'une queue poly(A) en 3', et assemblage avec des protéines sous forme de mRNP (complexe messager - ribonucléoprotéine) pour l'export vers le cytoplasme. Le grand nombre de transcrits produits et la complexité du processus de maturation rendent inévitable l'apparition de produits aberrants de la transcription, et ces transcrits aberrants doivent être éliminés car ils peuvent interférer avec le métabolisme nucléaire des ARN messagers ou bien générer des protéines toxiques s'ils sont exportés vers le

cytoplasme et traduits. C'est pourquoi il existe des mécanismes nucléaires de contrôle qualité des ARN messagers qui dégradent les produits aberrants de la transcription, les retiennent dans le noyau pour prévenir leur export, ou encore répriment leur transcription, afin d'optimiser la qualité du transcriptome nucléaire qui sera ensuite exporté vers le cytoplasme et engagé dans des cycles de traduction (voir revue Schmid and Jensen, 2010).

Des mécanismes de contrôle qualité nucléaires des ARN messagers ont été identifiés pour toutes les étapes de leur maturation. Dans la plupart des cas, la finalité de ces mécanismes est la dégradation du transcrit par l'une des deux machineries de dégradation exonucléolytique présentes dans le noyau : l'exonucléase Rat1, dégradant l'ARN du 5' vers le 3', et l'exosome nucléaire, fonctionnant du 3' vers le 5'. L'exosome nucléaire est composé de neuf sous-unités composant le "cœur" de l'exosome appelé Exo9, ainsi que de deux sous-unités catalytiques, Rrp6 et Dis3/Rrp44. Ces deux enzymes ont une activité exonucléolytique capable de dégrader l'ARN du 3' vers le 5', mais seule Dis3/Rrp44 possède une activité endonucléolytique. Alors que Dis3/Rrp44 est nécessaire pour l'activité de l'exosome aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme, Rrp6 est spécifique de l'exosome nucléaire. Le co-facteur principal de Rat1 est Rai1, alors que l'exosome nucléaire en possède plusieurs : le complexe TRAMP de polyadénylation (Trf4/5, Air1/2, Mtr4), les facteurs de liaison à l'ARN Rrp47 et Mpp6, et le complexe de terminaison de la transcription Nrd1-Nab3-Sen1 (voir revue Butler and Mitchell, 2010). Cependant, ces co-facteurs de l'exosome nucléaire sont principalement impliqués dans la dégradation de transcrits non codants, et non d'ARN messagers nucléaires.

Le coiffage en 5' est un processus co-transcriptionnel qui protège les ARN messagers naissants de la dégradation exonucléolytique 5' - 3', et qui stimule leur maturation, leur export et enfin leur traduction (Cougot et al., 2004). En cas de dysfonctionnement au moment du coiffage, les transcrits nucléaires sont dégradés et leur transcription est arrêtée, ces deux phénomènes nécessitant la présence de Rat1 (Jimeno-González et al., 2010). Ce couplage entre transcription et coiffage permet de s'assurer que seuls les ARN messagers correctement coiffés seront entièrement transcrits, et de limiter la transcription et l'accumulation d'ARN aberrants. L'exonucléase Rat1 nécessite une extrémité d'ARN 5' monophosphate pour initier la

dégradation du transcrit, et dans les cas où l'extrémité du transcrit mal coiffé est 5' triphosphate, il a été montré que la pyrophosphohydrolase Rai1, co-facteur de Rat1, convertit ce triphosphate en monophosphate, permettant la dégradation de l'ARN aberrant par Rat1 (Xiang et al., 2009).

Même si la proportion de gènes contenant des introns est très faible chez *Saccharomyces cerevisiae*, la complexité du mécanisme d'épissage peut générer des transcrits aberrants mal épissés qui risquent de s'accumuler dans le noyau ou bien d'être exportés et traduits. Plusieurs voies de contrôle qualité sont impliquées dans la rétention et la dégradation de certains pré-ARNm : l'exosome nucléaire, Rat1, et l'endonucléase Swt1, en absence desquels il a été montré que certains pre-ARNm défecteux pouvaient s'accumuler sans pour autant poursuivre le processus d'épissage (Bousquet-Antonelli et al., 2000; Skruzný et al., 2009). Il est possible que le mécanisme de détection des pré-ARNm défectueux parmi l'ensemble des pre-ARNm soit régulé par une compétition cinétique entre dégradation et épissage. Ainsi, un ARN intermédiaire dans la réaction d'épissage serait sujet à la dégradation s'il n'est pas rapidement engagé dans l'étape d'épissage suivante, alors que si l'épissage de cet ARN se déroule de manière correcte et rapide, il a peu de chances d'être reconnu et dégradé.

Par analogie avec le coiffage en 5', la polyadénylation des ARN messagers en 3' à la fin de la transcription permet de les protéger de la dégradation par l'exosome nucléaire. En effet, dans des souches mutantes pour les facteurs de maturation des ARNm en 3' Rna14, Rna15 ou Pap1, les transcrits déficients ne sont détectables qu'en absence de l'exosome nucléaire, suggérant l'existence d'un équilibre entre polyadénylation et dégradation des transcrits et donc d'un mécanisme de contrôle qualité au niveau de la polyadénylation des ARN messagers (Hilleren et al., 2001; Libri et al., 2002).

Le contrôle qualité de l'assemblage des mRNP a été mis en évidence par des mutations au niveau du complexe d'export des ARN messagers (complexe THO) et de l'hélicase associée à ce complexe, Sub2 (Libri et al., 2002; Rougemaille et al., 2008). Le niveau d'expression de certains transcrits est fortement réduit dans ces mutants, mais ce phénotype peut être supprimé par des mutations de l'exosome nucléaire ou du complexe TRAMP. En plus d'un défaut au niveau de l'export des

ARNm, les mutants du complexe THO et Sub2 affectent également l'efficacité de polyadénylation des transcrits, ce qui favorise leur dégradation par l'exosome et suggère un couplage entre les processus de polyadénylation et d'assemblage des mRNP (Saguez et al., 2008). Ici encore, une délétion de l'exosome ou du complexe TRAMP supprime ce phénotype de défaut de polyadénylation, ce qui suggère que l'exosome nucléaire et le complexe TRAMP participent activement à l'inhibition de la polyadénylation des transcrits présentant un défaut d'assemblage et d'export du mRNP, facilitant ainsi leur élimination par l'activité exonucléolytique du 3' vers le 5' de Rrp6 (Libri et al., 2002).

Au-delà de son implication dans la dégradation des ARN messagers aberrants, l'exosome nucléaire participe également à un autre mécanisme de contrôle qualité qui cible certains ARN non codants transcrits par l'ARN Pol II (Wyers et al., 2005). Ces transcrits sont une conséquence de la transcription pervasive, et sont reconnus par l'intermédiaire du complexe NNS (Nrd1-Nab3-Sen1) qui termine leur transcription prématurément et déclenche leur dégradation afin de limiter la transcription et l'accumulation de ces transcrits cryptiques dans le noyau (LaCava et al., 2005). Même si la dégradation de ces ARN n'est pas strictement un processus de contrôle qualité des ARN messagers, nous verrons par la suite qu'en cas de déplétion de Nrd1 ces transcrits sont exportés vers le noyau, traduits par des ribosomes, et dégradés par un mécanisme de contrôle qualité cytoplasmique des ARN appelé Nonsense Mediated mRNA Decay (voir paragraphe **3.3.1**).

3.2 Mécanismes cytoplamiques de dégradation des ARN messagers

Les ARN messagers ayant subi l'ensemble des étapes de maturation (coiffage, polyadénylation, épissage, et assemblage du mRNP pour l'export) sans avoir été reconnus comme aberrants et dégradés par les mécanismes de contrôle qualité nucléaires sont exportés *via* le complexe du pore nucléaire (NPC) vers le cytoplasme, où ils seront engagés dans des cycles de traduction avec des ribosomes par la machinerie de synthèse des protéines. Malgré l'efficacité des mécanismes de contrôle qualité nucléaires, plusieurs types d'ARN messagers aberrants pouvant s'accumuler dans le cytoplasme ont été identifiés (voir paragraphe **3.3**), ce qui montre que le transcriptome exporté vers le cytoplasme n'est pas dépourvu d'erreurs

et de dysfonctionnements pouvant conduire à la production de protéines aberrantes. Cependant, on trouve également dans le cytoplasme des machineries spécifiques de dégradation des ARN messagers, permettant d'éliminer les transcrits endommagés ou non traduits, ce qui assure le maintien de la qualité du transcriptome cytoplasmique par un renouvellement continu des ARN messagers qui le composent.

On distingue principalement deux machineries de dégradation des transcrits cytoplasmiques : l'exonucléase Xrn1 d'une part, et l'exosome cytoplasmique d'autre part (voir **Figure 5** et revue Parker and Song, 2004). Xrn1 dégrade les ARN du 5' vers le 3' et nécessite une extrémité 5' libre pour initier la dégradation, ce qui implique une étape de decapping (hydrolyse de la coiffe en 5') par le complexe Dcp1-Dcp2 (Dunckley and Parker, 1999) ou de clivage endonucléolytique du transcrit (Gatfield and Izaurralde, 2004) avant que Xrn1 ne puisse le reconnaître et le dégrader. L'exosome cytoplasmique est un complexe composé de neuf sous-unités régulatrices et d'une sous-unité catalytique, Dis3/Rrp44 (Mitchell et al., 1997), qui possède une activité endonucléolytique ainsi qu'une activité exonucléolytique 3' - 5'. L'exosome a ainsi la capacité de dégrader les ARN dans le sens opposé à Xrn1, du 3' vers le 5', mais de manière similaire à Xrn1, nécessite une extrémité libre (3'OH dans ce cas). Par conséquent, la déadénylation du transcrit (enlèvement de la queue poly(A)) par les complexes Ccr4-Pop2-NOT et Pan2-Pan3 (Brown et al., 1996; Tucker et al., 2001) est essentielle afin d'initier le processus de dégradation par l'exosome. Le coiffage et la polyadénylation des transcrits sont donc des processus de maturation essentiels mais réversibles, et les mécanismes inverses, decapping et déadénylation, sont des étapes critiques pour la régulation du taux de dégradation des ARN messagers par Xrn1 et l'exosome, respectivement.

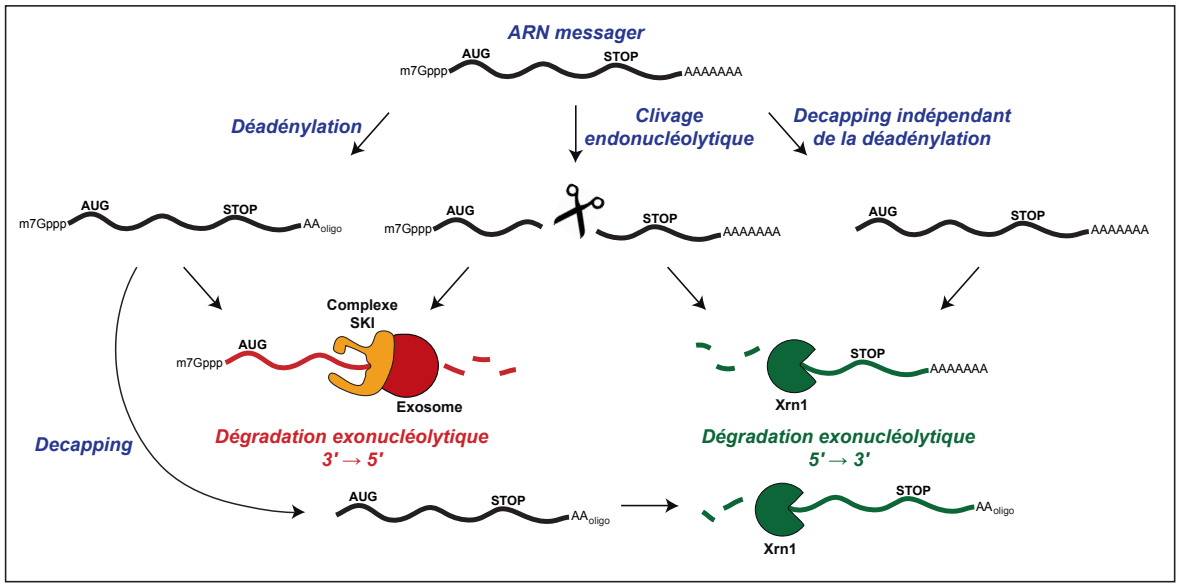


Figure 5. Mécanismes cytoplasmiques de dégradation des ARN messagers

Par ailleurs, l'exosome cytoplasmique nécessite le recrutement du complexe SKI, un cofacteur de l'exosome possédant une activité hélicase et capable de se lier à l'ARN (voir paragraphe **3.3.6**), pour reconnaître les ARN messagers cibles et procéder à leur dégradation (voir **Figure 5** et Anderson and Parker, 1998). Les transcrits ne portant pas de queue poly(A) ont ainsi une demi-vie très courte dans le cytoplasme car ils sont rapidement reconnus et dégradés par le complexe SKI et l'exosome cytoplasmique (à l'exception de certains transcrits spécifiques tels que les ARNm codant pour des histones), c'est notamment le cas des ARN messagers viraux de levure qui ne sont pas polyadénylés et sont sujets à la dégradation par l'exosome *via* le complexe SKI (Widner and Wickner, 1993). Au-delà de son importance pour la dégradation de certains ARN messagers dans le cytoplasme (Anderson and Parker, 1998), le système SKI-exosome constitue donc aussi un mécanisme de protection antivirale car il dégrade les ARN messagers viraux, limitant ainsi l'expression et l'accumulation de protéines virales.

Alors que l'exosome joue un rôle prépondérant dans la dégradation des transcrits nucléaires en comparaison à l'exonucléase Rat1, le processus de dégradation cytoplasmique est en réalité effectué majoritairement par l'exonucléase Xrn1 : il commence par une déadénylation partielle du transcrit par Pan2-Pan3 puis par le complexe Ccr4-Pop2-NOT (Tucker et al., 2002) de manière à retirer les protéines liées à la queue poly(A) (Pab1 chez la levure) (Muhlrad et al., 1995), ce qui permet de déstabiliser l'interaction entre la queue poly(A) et les protéines liées à la

coiffe du transcrit. S'en suit alors une étape de decapping par l'enzyme Dcp2 (Coller and Parker, 2004), fonctionnant au sein du complexe Dcp1-Dcp2 et avec les co-facteurs Edc1-Edc2-Edc3, ce qui va permettre le recrutement de Xrn1 et ainsi la dégradation de l'ARNm cible. Il est intéressant de constater que la dégradation des ARN messagers dans le cytoplasme se fait majoritairement dans le sens 5' - 3' alors qu'elle est initiée par une déadénylation partielle du transcrit qui pourrait aussi permettre le recrutement de l'exosome. L'hypothèse souvent avancée pour expliquer ce paradoxe est que la dégradation par Xrn1 n'affecte pas l'avancée des ribosomes déjà en cours de traduction sur l'ARN messager cible, tandis qu'une dégradation en 3' par l'exosome pourrait générer des protéines tronquées si la région 3' de la partie codante de l'ARNm est déjà dégradée alors que des ribosomes sont toujours en cours d'élongation de traduction. Il a notamment été montré que la dégradation des transcrits par Xrn1 pouvait avoir lieu de manière cotraductionnelle (Hu et al., 2009) alors que les études précédentes avaient observé cette dégradation médiée par Xrn1 uniquement au niveau de mRNP non traduits localisés dans les P-bodies (Parker and Sheth, 2007).

En effet, si une partie de la dégradation des ARNm cytoplasmiques a bien lieu dans le cytosol, il existe chez les eucaryotes des compartiments cellulaires appelés P-bodies (pour processing bodies) (Sheth and Parker, 2003) qui sont des centres de stockage et de dégradation des ARN, contenant des protéines impliquées dans la dégradation des ARN (Xrn1, Dcp1-Dcp2, Pop2-Ccr4, Pan2-Pan3...) (Kulkarni et al., 2010) et vers lesquels sont dirigés les ARN messagers qui ne sont pas traduits. Ils constituent un mécanisme alternatif de répression de la traduction, car les ARNm cibles qui sont transportés et sequestrés dans les P-bodies sont ainsi maintenus à l'écart de la machinerie de traduction (Dykxhoorn, 2004). Cependant, les ARNm stockés dans ces compartiments ne sont pas systématiquement dégradés ; il a en effet été montré que certains transcrits contenus dans les P-bodies peuvent en sortir et être réengagés dans des cycles de traduction (Brengues et al., 2005).

3.3 Processus de contrôle qualité cytoplasmiques des ARN messagers

Les transcrits aberrants pouvant s'accumuler dans le cytoplasme comprennent plusieurs classes : les ARNm contenant un codon de terminaison de la traduction précoce (PTC) appelés transcrits non-sens, ceux ne contenant pas de codon STOP

en phase (non-stop) et ceux contenant une séquence ou une structure d'ARN capable de bloquer les ribosomes lors de l'élongation de la traduction (no-go). Ils sont reconnus et dégradés par trois mécanismes de contrôle qualité distincts ciblant chacune de ces classes, respectivement le NonSense Mediated mRNA decay (NMD), le Non-Stop mRNA Decay (NSD) et le No-Go mRNA Decay (NGD) (voir revue Shoemaker and Green, 2012).

3.3.1 Le Nonsense Mediated mRNA Decay chez *Saccharomyces cerevisiae*

Les transcrits aberrants cytoplasmiques contenant un codon STOP précoce, ainsi que leur instabilité due à un mécanisme de dégradation associé, ont été les premiers à avoir été identifiés (Losson and Lacroute, 1979), ce qui a mené par la suite à la découverte du premier contrôle qualité cytoplasmique des transcrits aberrants appelé Nonsense mediated mRNA decay (Brown, 1989; Leeds et al., 1991). Les cibles du NMD qui ont été proposées en premier lieu étaient les ARN messagers contenant un codon STOP précoce, qui peuvent apparaître à cause de mutations génomiques ou d'erreurs lors de la transcription (Wagner and Lykke-Andersen, 2002). D'autres ARN messagers contenant un PTC ont ensuite été identifiés, notamment les transcrits mal épissés possédant encore un intron qui contient un codon STOP en phase (Mitrovich and Anderson, 2000), les transcrits contenant un long 3'UTR suite à une erreur de site de polyadénylation (Muhlrad and Parker, 1999), ou encore ceux contenant une ORF en amont du site canonique d'initiation de la traduction (uORF en amont de l'AUG) (Ruiz-Echevarría and Peltz, 2000). Plus récemment, il a été montré que le NMD pouvait également cibler et dégrader les transcrits non codants n'ayant pas été éliminés par les mécanismes de contrôle qualité nucléaires dépendants de Nrd1, notamment les transcrits antisens de gènes, les CUTs et les SUTs (Ingolia et al., 2014; Smith et al., 2014), qui sont exportés vers le cytoplasme et traduits, et qui contiennent en général des ORF courtes et des codons STOP précoces.

La reconnaissance et la dégradation des transcrits aberrants non-sens par le NMD nécessite leur traduction par un ribosome (Leeds et al., 1991 ; He et al., 1993), cependant l'élongation de la traduction ne s'effectue pas jusqu'au codon STOP canonique de manière à produire une protéine complète et s'arrête au niveau du codon STOP précoce, ce qui génère une protéine tronquée qui peut être toxique.

Plusieurs modèles ont été proposés concernant la reconnaissance d'un codon STOP précoce par le premier ribosome en cours de traduction (voir revue Hentze and Izaurralde, 2013). L'un des éléments importants pour l'initiation du processus de NMD est la distance entre le codon STOP reconnu par les ribosomes et la queue poly(A), autrement dit la longueur du 3'UTR du transcrit (Kebaara and Atkin, 2009; Hogg and Goff, 2010). Ce phénomène est à l'origine du modèle appelé "modèle du faux 3'UTR" (Amrani et al., 2004; Kervestin et al., 2012). Les transcrits possédant un long 3'UTR sont en général plus sensibles à la dégradation par le NMD, ce qui suggère qu'il y aurait compétition pour la reconnaissance du PTC et la terminaison de la traduction entre le facteur Upf1 et la protéine liée à la queue poly(A), PABP (Singh et al., 2008). Cependant, une étude récente montre que ceci n'est vrai que pour les transcrits ayant une région codante courte, les transcrits ayant une longue ORF et un long 3'UTR n'étant pas sensibles au NMD (Decourty et al., 2014). Il est donc possible que d'autres éléments affectent l'initiation du processus de NMD, par exemple la composition des facteurs liés aux ribosomes qui pourrait évoluer au cours de l'élongation de la traduction.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le NMD est coordonné par trois facteurs, Upf1, Upf2 et Upf3, qui se lient aux ribosomes arrêtés sur un codon STOP précoce et déclenchent le decapping et la dégradation du transcrit aberrant par Xrn1 (voir **Figure 6** et He and Jacobson, 2001). Bien que le rôle de chacun de ces facteurs ne soit pas encore clairement établi, l'hétérodimère eRF1-eRF3, également nécessaire pour le processus de terminaison canonique de la traduction, est essentiel pour la reconnaissance du codon non-sens et pour le recyclage des sous-unités ribosomiques bloquées sur le PTC (Kashima et al., 2006). Upf1 possède une activité ATPase essentielle pour son association avec la 40S, pour le désassemblage du mRNP et pour le recyclage des facteurs du NMD (voir revue Celik et al.; Chakrabarti et al., 2011). Il possède également une activité ARN hélicase qui est stimulée par le recrutement de Upf2 et Upf3 (Chamieh et al., 2008), qui lui permet de remodeler les structures d'ARN, et une activité translocase suggérant que Upf1 pourrait se déplacer le long du transcrit. Les étapes suivant le recrutement du complexe UPF sur un PTC ne sont pas encore entièrement caractérisées chez la levure, néanmoins il semblerait que Upf1, Upf2 et Upf3 régulent le recrutement de Dcp1-Dcp2, permettant ainsi le decapping du transcrit aberrant et donc sa

dégradation exonucléolytique par Xrn1 (He and Jacobson, 2001). Un mécanisme alternatif indépendant du decapping a également été proposé, pour lequel la déadénylation du transcrit aberrant précède sa dégradation par l'exosome cytoplasmique via les facteurs Ski7, Rrp4 et Ski2 (Mitchell and Tollervey, 2003).

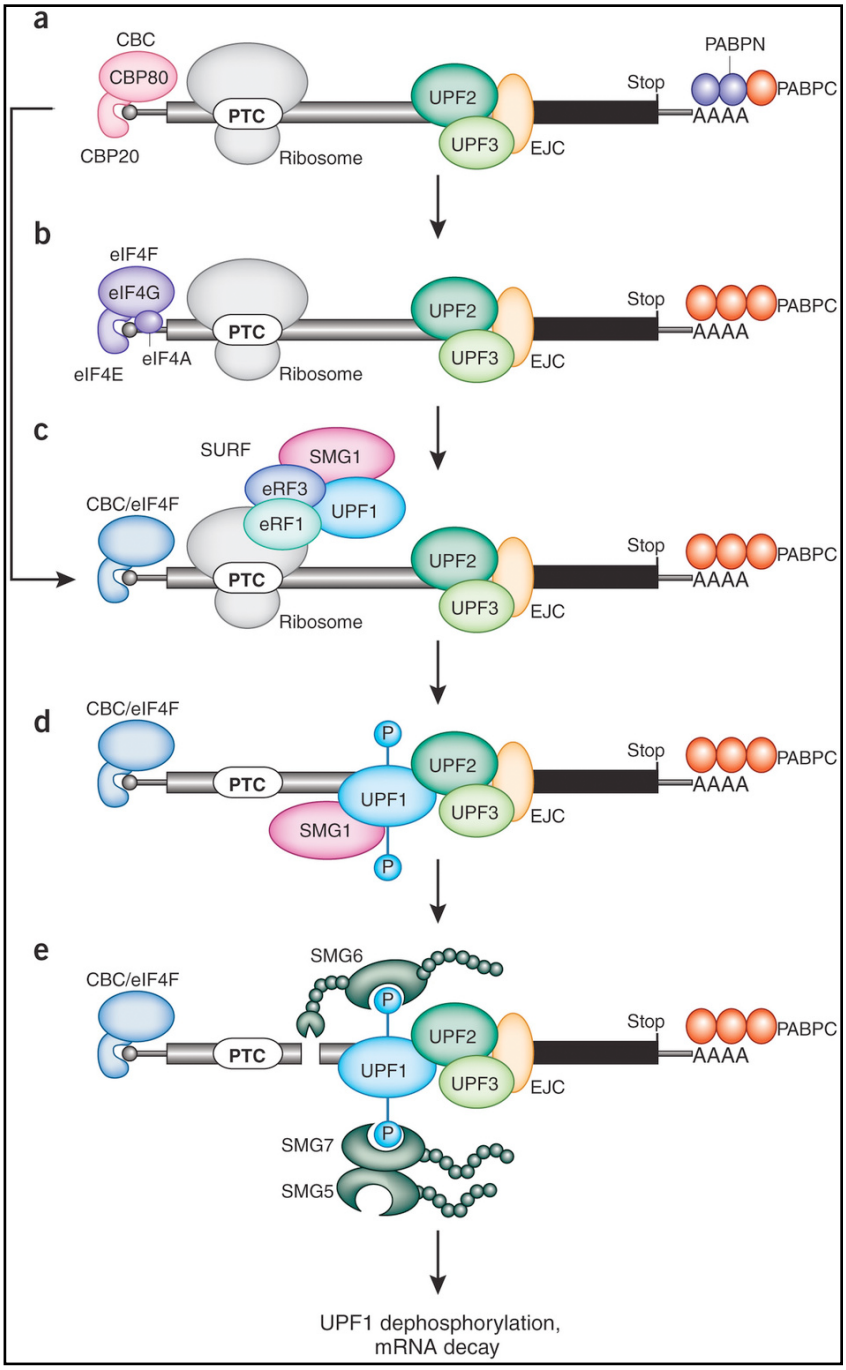


Figure 6. Mécanisme du NMD ciblant les ARNm liés au CBC ou à eIF4E
Le système du NMD chez la levure fait uniquement intervenir Upf1, Upf2 et Upf3 (les protéines SMG et l'EJC n'étant pas conservés chez *Saccharomyces cerevisiae*). CBC=Cap Binding Complex. Figure issue de (Hentze and Izaurralde, 2013)

3.3.2 Le Nonsense Mediated mRNA Decay chez les métazoaires

Le mécanisme du NMD est cependant plus complexe chez les métazoaires (voir **Figure 6** et revue Nicholson et al., 2010) : le ribosome bloqué sur un PTC est reconnu par le complexe SURF, constitué d'Upf1, du complexe Smg1-Smg8-Smg9, et de l'hétérodimère eRF1-eRF3 (Kashima et al., 2006). S'en suit le recrutement de Upf2 et Upf3 qui sont nécessaires pour la phosphorylation de Upf1 par la kinase Smg1, permettant ainsi le recrutement de l'hétérodimère Smg5-Smg7 (Jonas et al., 2013) et de l'endonucléase Smg6 qui procède au clivage endonucléolytique de l'ARNm aberrant (Gatfield and Izaurralde, 2004; Huntzinger et al., 2008; Eberle et al., 2009). Les fragments 5' et 3' du transcrit clivé sont alors reconnus et dégradés par l'activité exonucléase de l'exosome cytoplasmique et de Xrn1, respectivement. Alors que des modèles initiaux proposaient que le recrutement de Smg5-Smg7 déclenchait la déadénylation du transcrit par le complexe Ccr4-NOT permettant ainsi le decapping par Dcp1-Dcp2 (Lejeune et al., 2003; Loh et al., 2013), ou encore la possibilité que le complexe de decapping soit recruté directement sur Upf1 (Lykke-Andersen, 2002) ou via PNRC2 (Cho et al., 2009, 2013) et donc de manière indépendante de la déadénylation du transcrit, une étude récente suggère que la dégradation des transcrits portant un PTC serait principalement initiée par le clivage endonucléolytique catalysé par Smg6, de manière indépendante du decapping ou de la déadénylation de l'ARN (Lykke-Andersen et al., 2014).

Au-delà de l'importance des complexes UPF, SURF et SMG dans la reconnaissance d'un PTC et dans le recrutement des facteurs de dégradation du transcrit aberrant, il a aussi été montré chez les métazoaires que le complexe EJC (Exon Junction Complex) composé des protéines MAGOH, Y14, eIF4AIII et MLN51, qui marque les jonctions entre exons après épissage des ARN messagers (Le Hir et al., 2000), avait un rôle dans la stimulation de la dégradation des transcrits contenant un PTC par le NMD (Gehring et al., 2003). En effet, l'association entre le complexe SURF et l'EJC semble être nécessaire pour la phosphorylation de Upf1 via des interactions directes entre Smg1 et Upf2 ou Y14, et donc pour le recrutement des facteurs Smg5, Smg7 et Smg6 (Kashima et al., 2006). Bien que le mécanisme de NMD puisse fonctionner en absence de l'EJC, comme par exemple chez certaines levures où les protéines composant l'EJC ne sont pas conservées, il semble que la

présence de l'EJC augmente l'efficacité de dégradation des transcrits portant un PTC (voir revue Nicholson et al., 2010).

Néanmoins, le NMD n'est pas seulement considéré comme un mécanisme de dégradation de transcrits aberrants cytoplasmiques, car il participe aussi à la régulation de l'expression de nombreux ARN messagers (Mendell et al., 2004; Rehwinkel et al., 2006). Certains gènes ont même développé des éléments leur permettant de résister à la dégradation par le NMD, tel qu'un intron dans le 3'UTR, des uORF, un frameshift programmé ou encore des triplets UGA permettant l'incorporation de sélénocystéines (voir revue Nicholson et al., 2010). Le NMD est impliqué dans la régulation de 3% à 10% des ARN messagers chez les eucaryotes (He et al., 2003; Mendell et al., 2004), et joue aussi un rôle important dans le caractère récessif d'allèles portant des mutations non-sens par la dégradation des transcrits issus de l'allèle muté. Le NMD peut en effet avoir un rôle protecteur chez les individus hétérozygotes portant un allèle délétère, dans le cadre de pathologies telles que la thalassémie β (voir revue Holbrook et al., 2004).

3.3.3 Transcrits aberrants cytoplasmiques conduisant à un arrêt traductionnel

Deux autres types d'ARN messagers aberrants peuvent s'accumuler dans le cytoplasme : ceux ne contenant pas de codon STOP en phase avec le codon d'initiation de la traduction, appelés ARN messagers "non-stop" (Frischmeyer et al., 2002; Hoof et al., 2002) et ceux contenant une structure ou une séquence susceptible de bloquer les ribosomes en cours d'élongation de la traduction, appelés transcrits "no-go" (Doma and Parker, 2006; Dimitrova et al., 2009). Ces transcrits aberrants sont respectivement reconnus et dégradés par des mécanismes de contrôle qualité des ARN messagers appelés Non-Stop mRNA Decay (NSD) et No-Go mRNA Decay (NGD) (voir **Figure 7**). Bien que les substrats respectifs de ces deux voies de dégradation soient clairement distincts, la plupart des facteurs agissant en *trans* impliqués dans le NSD et le NGD sont identiques (Tsuboi et al., 2012; Saito et al., 2013). La frontière entre NGD et NSD relève donc plus d'une spécificité de substrats que de différences mécanistiques entre les deux processus.

On distingue deux types de transcrits "non-stop" : les transcrits tronqués ne possédant pas de queue poly(A) et ceux étant polyadénylés. Cette distinction est importante car les mécanismes de contrôle qualité qui les détectent et les éliminent

ne sont pas exactement les mêmes, notamment pour ce qui est de l'implication de certains facteurs (voir paragraphe **3.3.6**). Par ailleurs, les E3 ubiquitine ligases impliquées dans la dégradation des peptides naissants aberrants synthétisés à partir de ces deux types de transcrits ont des spécificités de substrat en fonction de la présence ou non d'une queue poly(A) (voir paragraphe **4.3**). Le processus de contrôle qualité des ARN messagers sans codon STOP appelé Non-Stop mRNA Decay, tel qu'il a été initialement décrit à l'aide de gènes rapporteurs, cible les transcrits aberrants polyadénylés (Frischmeyer et al., 2002; Hoof et al., 2002). Ces substrats naturels peuvent provenir de mutations génomiques ou d'erreurs lors de la transcription au niveau des codons de terminaison de la traduction. De plus, certaines conditions physiologiques, telles que la présence de prions ou d'antibiotiques, peuvent affecter l'efficacité de reconnaissance des codons STOP par les ribosomes, ce qui provoque des évènements de "readthrough" (Baudin-Baillieu et al., 2014). Les ribosomes passent le codon STOP sans terminer la traduction en incorporant un aminoacide à la place (Blanchet et al., 2014) et poursuivent ainsi l'élongation de la traduction sur le 3'UTR. Enfin, il a été montré que le clivage précédent la polyadénylation des ARN messagers pouvait dans certains cas avoir lieu en amont du codon STOP, et ce à cause de la présence de sites cryptiques de polyadénylation (Ozsolak et al., 2010). Ce phénomène de terminaison précoce de la transcription peut aussi générer des transcrits "non-stop" polyadénylés.

Pour ce qui est des transcrits sans codon STOP ni queue poly(A) présents dans le cytoplasme, on suppose que la majorité d'entre eux correspondent à des transcrits endommagés ou à des intermédiaires de dégradation, comme le fragment 5' d'un clivage endonucléolytique par exemple (Orban and Izaurralde, 2005; Doma and Parker, 2006). Même si ces ARN sont normalement reconnus et dégradés par le système SKI-exosome, il arrive que leur traduction par des ribosomes cause un arrêt traductionnel à l'extrémité 3', dû à l'absence de codon dans le site A, indispensable pour le processus de translocation. Le ribosome ainsi bloqué à l'extrémité 3' protège le transcrit aberrant de la dégradation par l'exosome, par conséquent le recrutement de l'hétérodimère Dom34-Hbs1 est essentiel pour le recyclage des sous-unités ribosomiques, et par la suite à la dégradation de ces ARNm non-stop non polyadénylés (voir paragraphe **3.3.5**) (Tsuboi et al., 2012). Cependant, de par la non-nécessité de certains facteurs tels que Ski7, le processus de contrôle qualité qui les

élimine n'est pas strictement défini comme étant du Non-Stop mRNA Decay (voir paragraphe **3.3.6** et Meaux and Hoof, 2006).

Enfin, les transcrits "no-go" sont considérés comme aberrants car ils contiennent une structure ou une séquence capable de bloquer l'avancée des ribosomes pendant l'élongation de la traduction : il n'est donc pas possible pour la machinerie de traduction de synthétiser des protéines complètes à partir de ces ARN messagers ni de recycler les ribosomes alors bloqués (Doma and Parker, 2006). Cet arrêt traductionnel peut être dû à la présence d'une structure tige-boucle d'ARN, d'un enchainement de codons rares ou difficiles à décoder, ou encore d'une répétition de codons correspondant à des aminoacides chargés positivement (lysines ou arginines) (Dimitrova et al., 2009). Des analyses bioinformatiques chez *Saccharomyces cerevisiae* ont permis d'identifier plusieurs ARN messagers contenant des enchainements de codons basiques (lysine et arginine), et la caractérisation expérimentale de certains d'entre eux a montré qu'ils sont naturellement ciblés par le NGD car leur abondance augmente lorsque ce mécanisme de contrôle qualité est déplété (Dimitrova et al., 2009; Brandman et al., 2012).

Ces différents types de transcrits aberrants peuvent provoquer une toxicité cellulaire, d'une part car les protéines synthétisées lors de leur traduction sont aberrantes (protéines tronquées ou allongées par la traduction du 3'UTR) et peuvent être non fonctionnelles, et d'autre part car les ribosomes qui les traduisent ne sont pas en mesure de terminer la traduction de façon canonique et doivent donc être recyclés pour être à nouveau engagés dans des cycles de traduction. C'est pourquoi il existe des mécanismes de contrôle qualité cytoplasmiques permettant à la fois le recyclage des ribosomes bloqués et la dégradation de ces transcrits aberrants.

3.3.4 Processus d'arrêt traductionnel induit par la traduction d'ARNm aberrants

Lors de la traduction de transcrits non-stop polyadénylés, les ribosomes en cours d'élongation poursuivent la traduction jusqu'à ce qu'ils atteignent la queue poly(A). Pour ce qui est des ARNm ayant subi une polyadénylation précoce, leur traduction génère une protéine tronquée, alors que pour les ARNm portant une mutation dans le codon STOP canonique, la traduction continue sur le 3'UTR jusqu'à la queue poly(A) (à condition qu'il n'y ait pas d'autre codon STOP en phase), ce qui

donne naissance à une protéine allongée. La traduction d'une queue poly(A) par un ribosome donne naissance à une chaine de lysines à l'extrémité C-terminale du peptide naissant, et il a été montré que les interactions électrostatiques entre la polylysine (chargée positivement) et l'ARN ribosomique constituant le tunnel de sortie (chargé négativement) pouvaient ralentir, voire arrêter le ribosome en cours d'élongation de la traduction (Lu and Deutsch, 2008). Pour ce qui est de la traduction des ARN messagers no-go, l'arrêt traductionnel se fait dans la séquence codante, et les ribosomes bloqués n'ont pas la possibilité d'atteindre le codon STOP en 3' (Doma and Parker, 2006). Ce mécanisme d'arrêt traductionnel a principalement été caractérisé par le laboratoire de Toshifumi Inada : des tests avec des rapporteurs contenant des répétitions de différents aminoacides leur ont permis de montrer que douze codons Lysine, Arginine ou Tryptophane étaient suffisants pour déclencher le blocage des ribosomes (Dimitrova et al., 2009). De manière attendue, plus les répétitions sont longues, plus le pourcentage de ribosomes arrêtés en cours d'élongation augmente, et de moins en moins de ribosomes parviennent à traverser la séquence bloquante. Ce même laboratoire a ensuite réalisé un crible génétique, en utilisant un gène rapporteur contenant une succession de douze codons difficiles à décoder (CGA), codant pour l'amino-acide arginine (R_{12}), entre les séquences codant pour la protéine fluorescente GFP et la protéine His3, essentielle pour la croissance des levures en absence d'histidine (Kuroha et al., 2010). La séquence R_{12} provoquant le blocage du ribosome, seuls des mutants incapables de réaliser l'arrêt traductionnel peuvent synthétiser la partie His3 du rapporteur et donc pousser en absence d'histidine. Ils ont ainsi observé que des mutations dans deux gènes, *ASC1* et *HEL2*, pouvaient restaurer la croissance des levures en absence d'histidine, et découvert que les protéines Asc1 et Hel2 sont toutes deux essentielles au processus d'arrêt de traduction des ribosomes.

Asc1 (RACK1 chez les mammifères) est une protéine de la sous-unité ribosomique 40S dont la région de fixation est proche du tunnel de sortie de l'ARN messager (Nilsson et al., 2004; Jenner et al., 2012). Bien que le mécanisme moléculaire médié par Asc1 et nécessaire à l'arrêt traductionnel ne soit pas connu, Asc1 est essentielle pour arrêter les ribosomes traduisant des régions aberrantes, évènement qui permet de déclencher le clivage endonucléolytique du transcrit (voir paragraphe ci-dessous) (Kuroha et al., 2010). Hel2 est une E3 ubiquitine ligase qui

fonctionne avec l'E2 ubiquitine ligase Ubc4. En absence de Hel2, il a été montré que les ribosomes traduisaient les polylysines et polyarginines sans s'arrêter, ce qui souligne l'importance du recrutement de Hel2 sur les polysomes pour déclencher l'arrêt traductionnel (voir **Figure 7**). Une analyse des protéines polyubiquitinylées liées aux ribosomes a permis d'identifier deux protéines ribosomiques de la sous-unité 40S, Rps3 et Rps20, qui sont ubiquitinylées par Hel2 sur les lysines K212 et K6/K8, respectivement. L'ubiquitinylation du N-ter de Rps20 s'avère être un signal essentiel pour l'arrêt traductionnel, et donc pour la reconnaissance et la dégradation du transcrit aberrant no-go, ainsi que pour la dégradation des protéines aberrantes synthétisées à partir de cet ARN messager, et enfin pour la dégradation de la sous-unité 40S polyubiquitinylée (Inada T. *et al.*, résultats présentés à la conférence CSHL Translational Control, Septembre 2014).

3.3.5 Mécanisme de recyclage des sous-unités ribosomiques bloquées

Que ce soit lors de la traduction d'une queue poly(A) (non-stop) ou d'une séquence blocante (no-go), le ribosome se trouve arrêté sur l'ARN messager, cependant le site A de la grande sous-unité 60S ne contient pas de codon de terminaison (UAA, UAG ou UGA) ce qui ne permet pas le recrutement des facteurs de terminaison canoniques eRF1 et eRF3. C'est alors l'hétérodimère Dom34-Hbs1, homologue structural d'eRF1-eRF3, qui reconnait le site A vide du ribosome bloqué (voir **Figure 7**) (Doma and Parker, 2006; Tsuboi et al., 2012). Dom34, de manière similaire à eRF1, possède une structure proche de celle d'un ARN de transfert, les domaines N-terminal et central correspondant à la boucle anticodon et au bras accepteur d'un ARNt (Graille et al., 2008; van den Elzen et al., 2010; Becker et al., 2011). Hbs1 fait partie de la famille des GTPases traductionnelles et nécessite la reconnaissance du site A vide par Dom34 pour se fixer au ribosome bloqué. Contrairement à eRF1-eRF3, la liaison de Dom34-Hbs1 au ribosome se fait indépendamment du codon présent dans le site A (Shoemaker et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré que l'hétérodimère Dom34-Hbs1 est nécessaire pour la dissociation des 80S reconstituées (Pisareva et al., 2011), ce qui augmente la disponibilité en sous-unités 60S et 40S libres de manière à rapidement réinitier la traduction après un stress traductionnel, tel qu'une carence en glucose chez la levure (Elzen et al., 2014). Dom34 permet également la dissociation des ribosomes bloqués sur des régions d'ARN non codantes telles que des 3'UTR (Guydosh and Green,

2014). Le transcrit aberrant subit ensuite un clivage endonucléolytique à proximité du ribosome bloqué par une endonucléase inconnue à ce jour, mais dont l'activité est stimulée par Dom34-Hbs1, et qui nécessite au préalable l'arrêt traductionnel dépendant de Asc1 (Doma and Parker, 2006; Kuroha et al., 2010). L'hydrolyse de GTP par Hbs1 permet alors un changement conformationnel de Dom34, qui adopte une conformation similaire à l'état "A/A" du tRNA observée lorsque le complexe EF-Tu-ARNt lie le ribosome bactérien (Becker et al., 2011). Hbs1 est alors recyclé, et c'est le facteur canonique de recyclage des ribosomes en fin de traduction, Rli1 (ABCE1 chez les mammifères), qui est recruté et qui va permettre la dissociation du 80S bloqué et le recyclage des sous-unités ribosomiques grâce à l'hydrolyse d'ATP (voir **Figure 7**) (Shoemaker et al., 2010; Pisareva et al., 2011).

Les différences majeures entre terminaison de la traduction canonique et aberrante proviennent de la présence d'un site A contenant un codon STOP ou non, déterminant le recrutement d'eRF1-eRF3 ou de Dom34-Hbs1 (qui est déterminé par la présence d'un motif NIKS chez eRF1 alors que ce motif est absent chez Dom34), et de l'absence de motif GGQ chez Dom34 par rapport à eRF1 : en effet, le motif GGQ d'eRF1 coordonne l'hydrolyse de la liaison peptidyl-ARNt, permettant ainsi la libération du peptide naissant, mais dans le cas de Dom34, l'absence de motif GGQ maintient le peptide naissant covalemment lié à l'ARNt dans le site P (Graille et al., 2008). Par conséquent, lorsque Rli1 dissocie la 60S, cette dernière contient toujours un peptidyl-ARNt, alors que pour la terminaison canonique, la 60S dissociée est libre et peut être réengagé dans des cycles de traduction. Les 60S recyclées via Dom34-Hbs1 à partir de ribosomes arrêtés sont donc bloquées car elles contiennent toujours un peptidyl-ARNt qui sera également reconnu et dégradé (voir paragraphe **4.4**). De plus, alors que la régulation de la traduction canonique s'effectue principalement au niveau de l'initiation, il a été montré que la régulation de la traduction des ARN messagers aberrants avait lieu à une étape postérieure à l'initiation (Inada and Aiba, 2005; voir revue Jackson et al., 2010).

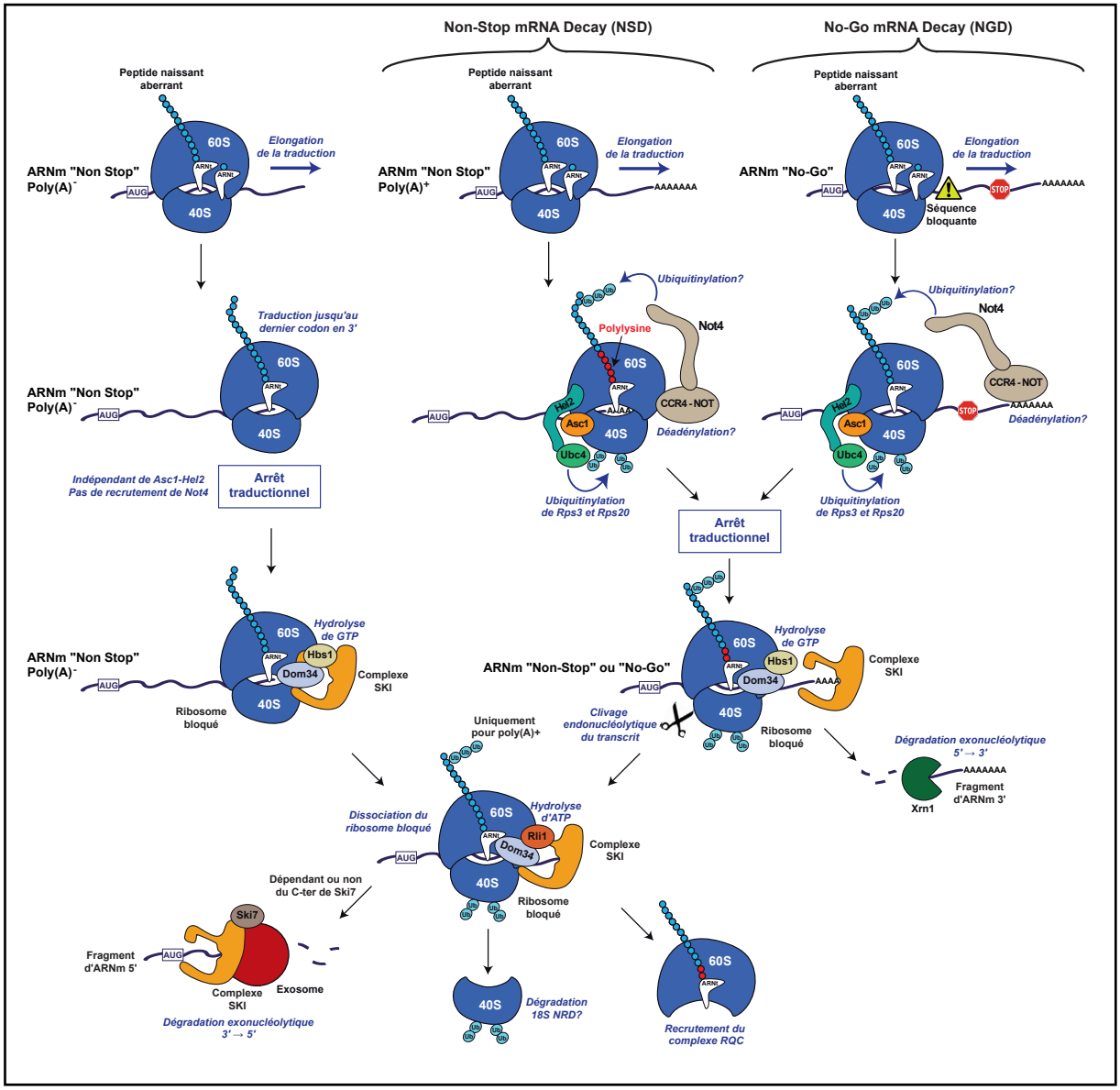


Figure 7. Mécanismes de contrôle qualité des ARNm aberrants (NSD et NGD)

La traduction d'un ARNm "Non-Stop" ou "No-Go" entraîne l'arrêt traductionnel par le recrutement de Asc1 et de Hel2-Ubc4 sur le ribosome (Inada *et al.*, 2014). Le complexe CCR4-NOT est alors recruté et Not4 ubiquitinyle le peptide naissant (Dimitrova et al., 2009). La traduction d'un ARN "Non-Stop Non-Poly(A)" provoque un arrêt traductionnel à l'extrémité 3' de manière indépendante de Asc1 et Hel2, et qui n'est pas reconnu par Not4. S'en suit le recrutement du complexe SKI et de Dom34-Hbs1, et l'hydrolyse de GTP par Hbs1 permet un changement conformationnel de Dom34. Après clivage endonucléolytique du transcrit, Hbs1 est recyclé et Rli1 hydrolyse de l'ATP pour dissocier les sous-unités ribosomiques bloquées. Les fragments 5' et 3' de l'ARNm aberrant sont dégradés par l'exosome (en association avec le complexe SKI et Ski7) et Xrn1, respectivement. Cependant, le C-ter de Ski7 n'est pas requis pour dégrader les transcrits non-poly(A). Le peptidyl-ARNt bloqué dans le tunnel de sortie de la 60S est reconnu par le complexe RQC, et la 40S ubiquitinylée par Hel2-Ubc4 est possiblement dégradée *via* le 18S NRD.

3.3.6 Dégradation des transcrits aberrants Non-Stop et No-Go

Parallèlement au recrutement de Dom34-Hbs1, le complexe SKI est recruté en 3' des ribosomes bloqués, qui en partenariat avec Ski7, une protéine de la famille de GTPases traductionnelles eEF1A (Benard et al., 1999; Schaeffer and van Hoof, 2011), permet le recrutement de l'exosome cytoplasmique à l'extrémité 3' du transcrit non-stop (voir **Figures 7** et **8**) (Frischmeyer et al., 2002; Hoof et al., 2002), ou du fragment 5' issu du clivage endonucléolytique de l'ARNm no-go (Doma and Parker, 2006). Cette reconnaissance du ribosome bloqué par le complexe SKI est essentielle au recrutement de l'exosome cytoplasmique, et donc au processus de contrôle qualité des ARN messagers aberrants non-stop et no-go. Le complexe SKI est composé de quatre protéines : Ski2, Ski3, et deux unités de Ski8 (Brown et al., 2000; Synowsky and Heck, 2008). Il possède des activités ATPase et ARN hélicase, toutes deux portées par Ski2, sous-unité catalytique du complexe et homologue de l'hélicase Mtr4. Alors que la région N-terminale de Ski2 lui permet d'interagir avec Ski3 et Ski8 (Wang et al., 2005), la partie hélicase située en C-ter contient un domaine catalytique ATPase (dont l'activité dépend de l'ARN) de la famille DExH, ainsi qu'un domaine permettant de lier l'ARN (Halbach et al., 2012). Ski3 et Ski8 ont des rôles structuraux importants pour la fonction du complexe SKI, car ils positionnent le domaine hélicase de Ski2 au centre du complexe, favorisant ainsi la liaison du complexe à l'ARN (Halbach et al., 2013). De plus, un mécanisme allostérique permet à Ski3 et Ski8 de moduler les activités ATPase et hélicase de Ski2. Il est supposé que le complexe SKI et l'exosome formeraient alors un tunnel par lequel l'ARN messager, rendu simple brin par l'activité hélicase de Ski2, est acheminé pour atteindre l'exonucléase Dis3/Rrp44 qui va procéder à sa dégradation à partir de son extrémité 3'. Ce tunnel formé par le complexe SKI et l'exosome pourrait permettre le couplage entre les activités hélicase et exonucléase (voir **Figure 8**). Alors que les premières études ayant identifié l'importance de Ski7 pour le processus de Non-Stop mRNA Decay proposaient la possibilité que Ski7, en tant qu'homologue structural d'eRF3 et de Hbs1, pourrait reconnaitre les ribosomes bloqués en se liant à proximité du site A vide (Hoof et al., 2002), il a été découvert par la suite que Ski7 a la capacité de se lier à la fois au complexe SKI et à l'exosome (Araki et al., 2001), suggérant que Ski7 favoriserait la liaison entre ces deux complexes. Cette propriété expliquerait l'importance de Ski7 dans l'initiation du

processus de dégradation exonucléolytique des transcrits aberrants polyadénylés du 3' vers le 5' par l'exosome. La protéine Ski7 constitue une des différences mécanistiques majeures entre contrôle qualité des ARNm aberrants Non-Stop polyadénylés ou non, car les domaines N-ter et C-ter de Ski7 sont tous deux essentiels pour la dégradation des transcrits polyadénylés, alors que le C-ter de Ski7 n'est pas requis pour la dégradation des transcrits non-poly(A) : c'est la raison pour laquelle le processus de contrôle qualité qui élimine ces transcrits non-poly(A) a été défini comme indépendant du Non-Stop mRNA Decay (Meaux and Hoof, 2006).

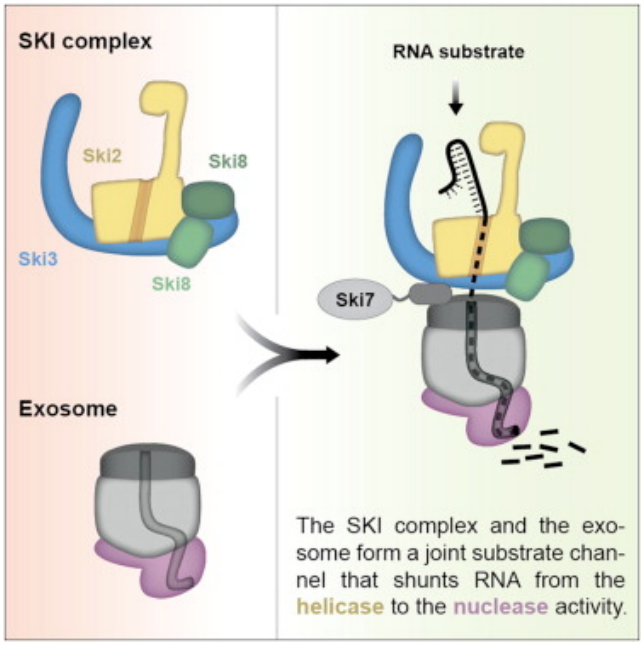


Figure 8. Schéma du tunnel de l'ARN formé par le complexe SKI et l'exosome
Abstract graphique issu de Halbach et al., Cell, 2013 © 2013 Elsevier

Les transcrits aberrants non-stop sont donc principalement dégradés de manière exonucléolytique du 3' vers le 5' par l'exosome cytoplasmique, et plus spécifiquement par l'exonucléase Dis3/Rrp44. Cependant, cette enzyme possède également une activité endonucléase, et il a été montré que contrairement à la dégradation des ARN messagers normaux par la voie SKI-exosome, les ARN messagers aberrants non-stop peuvent aussi être éliminés par l'activité endonucléase de Dis3/Rrp44 lorsque son activité exonucléase est délétée (Schaeffer and Van Hoof, 2011). Ceci est vrai indépendamment de la présence ou de l'absence d'une queue poly(A) en 3' du transcrit. Cependant, cette étude a également montré

que Dis3/Rrp44 n'était pas l'enzyme responsable du clivage endonucléolytique des ARN messagers aberrants no-go qui précède la dissociation du 80S bloqué. Alors que le fragment 5' de ce clivage endonucléolytique est dégradé par le complexe SKI et l'exosome, le fragment 3' est lui reconnu et éliminé par l'exonucléase 5' - 3' Xrn1 (Doma and Parker, 2006). Il est intéressant de remarquer que contrairement aux processus de dégradation des ARN messagers normaux, les mécanismes de contrôle qualité des ARN messagers aberrants non-stop et no-go initient la dégradation de manière indépendante du decapping et de la déanylation des transcrits. L'expression des ARN messagers aberrants non-stop et no-go est ainsi régulée à au moins trois niveaux : stabilité du transcrit (Hoof et al., 2002; Doma and Parker, 2006), répression de la traduction après initiation (Inada and Aiba, 2005), et enfin stabilité des protéines synthétisées à partir de ces transcrits (Dimitrova et al., 2009; Bengtson and Joazeiro, 2010).

3.4 Mécanismes de contrôle qualité de la traduction chez les procaryotes

Bien que ces processus de contrôle qualité des ARN messagers soient conservés chez tous les eucaryotes et en partie conservés chez les archées (Atkinson et al., 2008), on trouve chez les bactéries un système de contrôle qualité de la traduction dont le mécanisme de fonctionnement est sensiblement différent du système eucaryote. Il fait intervenir une molécule d'ARN qui n'existe pas chez les eucaryotes, appelée tmRNA pour "ARN de transfert messager" (voir revues Moore and Sauer, 2007; Keiler, 2008). Ce mécanisme intervient lorsque le ribosome procaryote traduit un ARN messager jusqu'à l'extrémité 3' de ce dernier (ARNm non-stop), ou lorsque le ribosome pause durant l'élongation de la traduction (ARNm no-go), étape alors suivie d'un clivage endonucléolytique de l'ARN messager (Hayes and Sauer, 2003). Le tmRNA fonctionne à la fois comme un ARN de transfert (alanyl-tRNA) et comme un ARN messager (voir **Figure 9**). Il forme un complexe avec la protéine SmpB (Karzai et al., 1999) et se lie au ribosome arrêté en cours de traduction, grâce à son association avec le facteur d'élongation EF-Tu·GTP (voir paragraphe **2.3**). Après reconnaissance du ribosome bloqué, le peptide naissant est transféré sur l'alanine portée covalemment par le tmRNA, et l'élongation de la traduction continue sur la courte phase ouverte de lecture (constituée de 10 codons) contenue dans la partie messager du tmRNA. Cette reprise de l'élongation de la traduction, initiée par un mécanisme appelé "*trans*-translation", conduit à l'ajout d'une

étiquette polypeptidique appelée "ssrA" à l'extrémité C-terminale du peptide naissant qui va par la suite permettre la dégradation protéolytique de ce produit aberrant de la traduction (Tu et al., 1995; Keiler et al., 1996). En parallèle, la *trans*-translation par le tmRNA facilite la dégradation du transcrit aberrant non-stop ou no-go par le recrutement de plusieurs ribonucléases, dont la RNase R, au niveau des ribosomes bloqués (Yamamoto et al., 2003; Richards et al., 2006). Enfin, la séquence codante du tmRNA est suivie d'un codon STOP qui permet la libération du peptide naissant étiqueté et le recyclage des sous-unités ribosomiques par un processus indépendant du facteur de recyclage canonique RRF et du mécanisme de *trans*-translation (Hirokawa et al., 2004), ce qui suggère que le tmRNA possèderait sa propre activité de recyclage des ribosomes bloqués. L'existence d'un mécanisme alternatif de recyclage des ribosomes a ainsi été proposée (Moore and Sauer, 2005), dont l'action reste encore inconnue à ce jour.

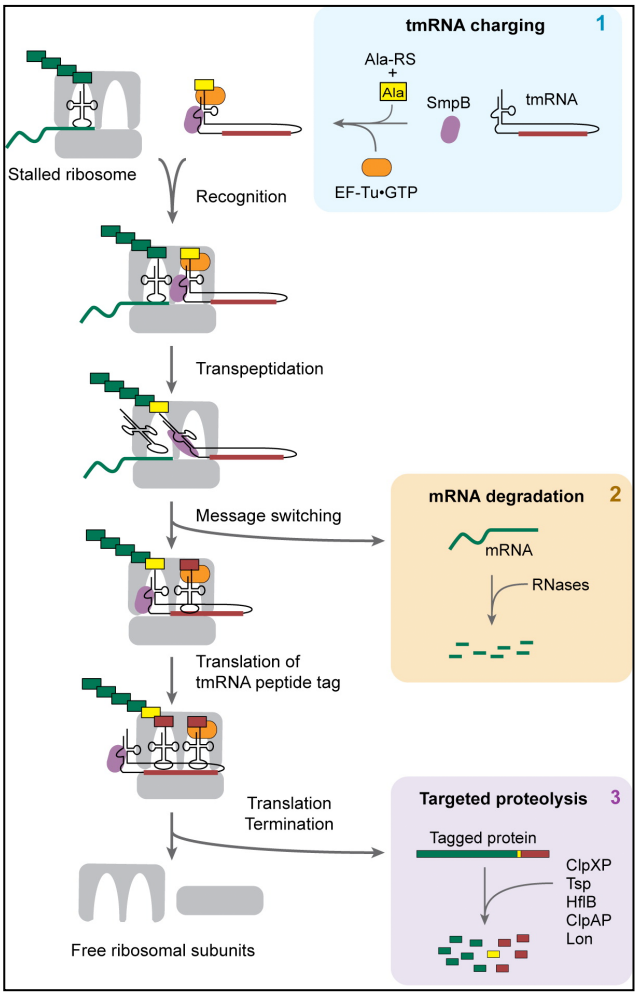


Figure 9. Mécanisme de contrôle qualité de la traduction par le tmRNA
Schéma issu de Kenneth C. Keiler, Annu. Rev. Microbiol., 2008

Au-delà de son importance pour le contrôle qualité de la traduction procaryote, la *trans*-translation médiée par le tmRNA fait aujourd'hui l'objet d'un intérêt médical majeur dans le cas de pathologies telles que la tuberculose ou l'adénite mésentérique. Il a notamment été montré que l'absence du tmRNA chez *Yersinia pseudotuberculosis* rendait cette bactérie avirulente (Okan et al., 2006). Par ailleurs, le pyrazinamide (PZA), un médicament découvert en 1952 utilisé depuis plusieurs décennies pour traiter les patients atteints de tuberculose, mais dont la cible moléculaire demeurait inconnue, a été récemment décrit comme étant un inhibiteur du processus de *trans*-translation chez *Mycobacterium tuberculosis*, réduisant ainsi la capacité de ce pathogène à persister dans l'hôte infecté (Shi et al., 2011).

4 - Mécanismes cotraductionnels de contrôle qualité des protéines

4.1 Etapes cotraductionnelles de maturation des protéines

Même si la traduction des ARN messagers par les ribosomes est essentielle à la synthèse des protéines, ces dernières nécessitent souvent de multiples étapes de maturation afin d'être fonctionnelles. Ce processus de maturation des protéines est initié de manière cotraductionnelle, dès que le peptide naissant émerge du tunnel de sortie de la grande sous-unité ribosomique, avec l'hydrolyse ou l'acylation de la méthionine en N-terminal, suivies parfois du clivage de plusieurs amino-acides suivant cette méthionine (voir revue Giglione et al., 2014), ainsi que des modifications chimiques (phosphorylations, acétylations, glycosylations...) souvent spécifiques de certains compartiments cellulaires tels que le réticulum endoplasmique (ER) ou l'appareil de Golgi (voir revue Shandala et al., 2001).

Parallèlement à ces modifications chimiques, le recrutement de chaperonnes cotraductionnelles permet d'assister au repliement du polypeptide néo-synthétisé (Hartl, 1996). Ainsi, au fur et à mesure que les modules successifs d'une protéine émergent du ribosome, ses domaines structuraux adoptent progressivement leur conformation finale par la formation d'hélices alpha, de feuillets bêta ou encore de ponts disulfure. Certains complexes multiprotéiques ont même été décrits comme capables de s'assembler de manière cotraductionnelle, ce qui montre qu'une protéine peut interagir avec ses partenaires au sein d'un complexe avant même

d'être entièrement traduite (Duncan and Mata, 2011). De nombreux facteurs ayant des activités chaperonne ou co-chaperonne et capables d'interagir avec des peptides naissants pour participer à leur repliement ont été identifiés des bactéries jusqu'aux mammifères ; chez la levure, on trouve notamment les complexes RAC (Ribosome Associated Complex) composé de la triade de chaperonnes Ssz1-Zuo1-Ssb1/2 (Gautschi et al., 2002), et NAC (Nascent-polypeptide Associated Complex), un dimère composé des protéines Egd1-Egd2 (voir revue Preissler and Deuerling, 2012). Le repliement et l'adressage de certaines protéines nécessite également l'action post-traductionnelle de chaperonnes cytoplasmiques telles que le complexe TriC/CCT, ou le système de chaperonnes Hsp70 Ssa1-4 en association avec les co-chaperonnes Ydj1 et Sis1 (voir revue Kramer et al., 2009 et citations associées).

4.2 L'ubiquitinylation, une étape essentielle pour la dégradation des protéines aberrantes ou défectueuses

Comme mentionné précédemment dans le paragraphe **3.3.4** pour Hel2, certaines E3 ubiquitine ligases ont la capacité de se lier aux ribosomes en cours de traduction et d'ubiquitinyler des cibles telles que les protéines ribosomiques ainsi que les peptides naissants. Le processus d'ubiquitinylation consiste à étiqueter une protéine cible avec une protéine appelée ubiquitine (Hershko et al., 1983), qui va permettre d'adresser cette cible à la dégradation protéolytique par la principale machinerie de protéolyse eucaryote, le protéasome (Ciehanover et al., 1978). Le protéasome est un complexe composé d'une trentaine de sous-unités protéiques qui s'organisent en trois modules (voir **Figure 10**) : le couvercle (protéines Rpn1-13), capable de recruter les substrats polyubiquitinylés puis de les déubiquitinyler, la base (ou particule régulatrice, protéines Rpt1-6), contenant une activité ATPase permettant la translocation des substrats à dégrader dans la chambre protéolytique, et enfin le cœur (sous-unités α - β), qui contient les activités protéolytiques (trypsine, chymotrypsine et caspase) permettant la dégradation des protéines sous forme de petits peptides (voir revues Voges et al., 1999; Finley, 2009).

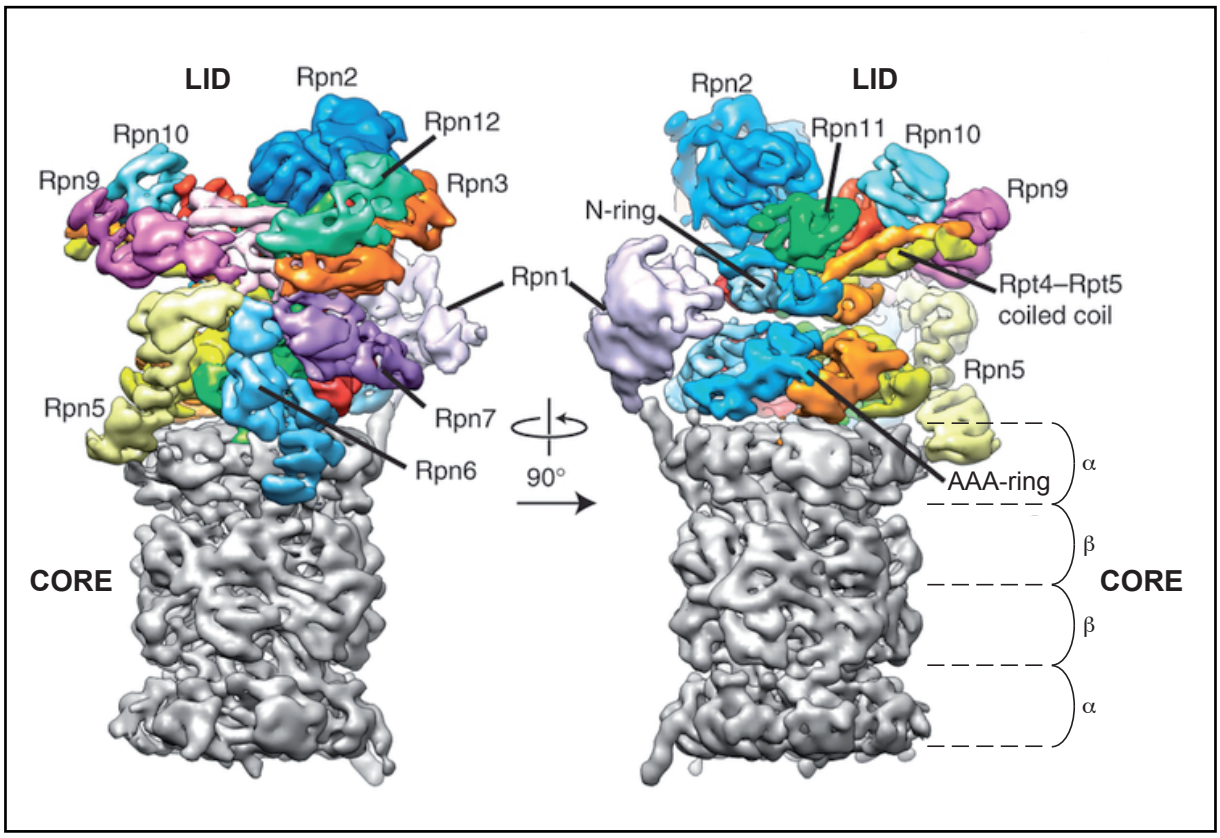


Figure 10. Structure du protéasome 26S par cryo-microscopie électronique
Le cœur est représenté en gris, les protéines du couvercle (Rpn) en couleurs, "AAA-ring" et "N-ring" désignent les différentes parties de la base (Rpt1-6). Figure issue de (Matyskiela et al., 2013) © 2013 Macmillan Publishers Limited.

La mise en place de la voie ubiquitine - protéasome nécessite la reconnaissance d'une protéine cible par une E3 ubiquitine ligase, qui recrute alors une E2 ubiquitine ligase portant une molécule d'ubiquitine délivrée au préalable par une E1 ubiquitine ligase (voir **Figure 11**). On distingue trois types d'E3 ubiquitine ligases : celles contenant un domaine RING (Really Interesting New Gene) qui s'associent à un substrat et à une E2 ubiquitine ligase mais n'entrent jamais en contact direct avec l'ubiquitine, celles contenant un domaine U-box (domaine RING modifié ne possédant pas la totalité des motifs de liaison au Zn^{2+}), et celles contenant un domaine HECT (Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus) qui portent covalemment l'ubiquitine en provenance d'une E2 ubiquitine ligase et transfèrent cette molécule d'ubiquitine directement sur leur substrat. Par conséquent, les E3 ligases à domaine HECT ont un rôle direct dans la catalyse lors de l'ubiquitinylation, tandis que les E3 ligases à domaine RING ou U-box ne font que faciliter le processus l'ubiquitinylation. Alors qu'il n'existe qu'une seule E1 ubiquitine

ligase chez *Saccharomyces cerevisiae*, Uba1, on dénombre plusieurs dizaines d'E2 et d'E3 ubiquitine ligases qui interagissent spécifiquement entre elles et constituent un réseau complexe garantissant spécificité et efficacité de dégradation des substrats ciblés (voir revue Streich and Lima, 2014).

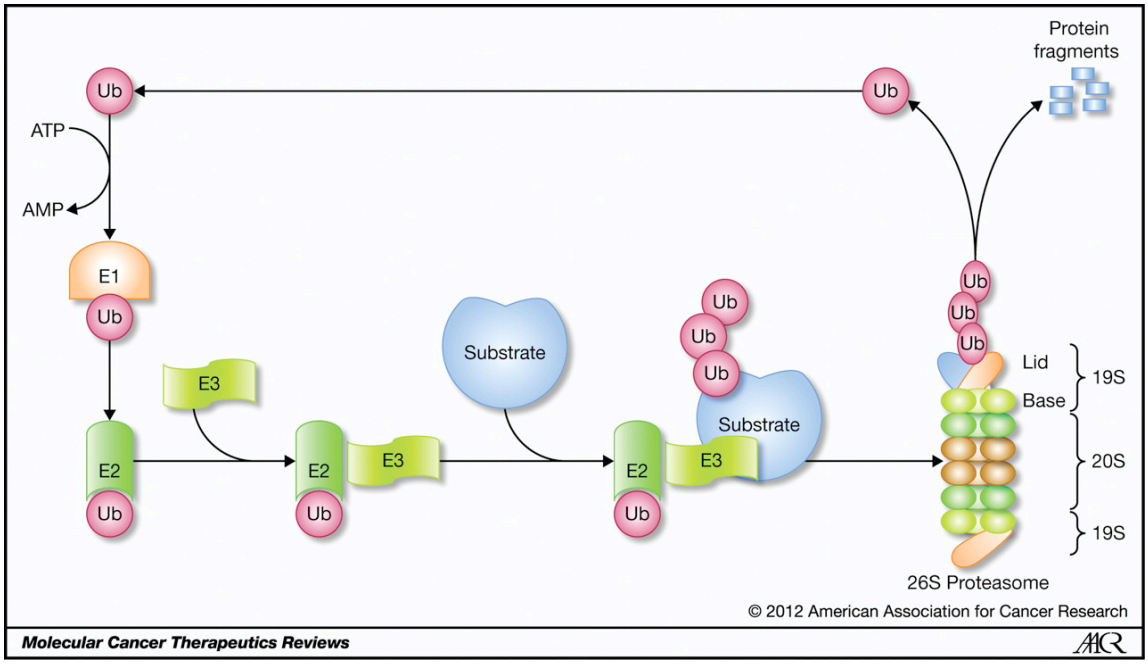


Figure 11. Mécanisme de fonctionnement de la voie ubiquitine - protéasome
Issu de Nader Rahimi, Molecular Cancer Therapeutics, 2012

Cependant, il est important de préciser que la finalité du processus d'ubiquitinylation des protéines n'est pas limité à la dégradation protéolytique : en effet, cette modification post-traductionnelle a un rôle primordial dans de nombreux processus cellulaires dont la transcription, le cycle cellulaire, les réponses au stress, la réparation de l'ADN, les réponses immunitaires ou encore l'autophagie (Jentsch et al., 1987; Goebl et al., 1988). L'ajout d'une molécule d'ubiquitine sur une protéine ciblée entraîne généralement un processus appelé polyubiquitinylation, qui consiste à attacher covalemment sur un même substrat plusieurs molécules d'ubiquitine l'une après l'autre de manière à synthétiser une chaîne de polyubiquitine (Hershko and Heller, 1985). Chaque ubiquitine est attachée par son extrémité C-terminale à une des lysines portées par l'ubiquitine précédente, et étant donné que l'ubiquitine possède 7 lysines dans sa séquence peptidique (K6, K11, K27, K29, K33, K48 et K63), différents types de chaînes de polyubiquitine peuvent être ainsi synthétisées

selon les E3 ubiquitine ligases impliquées. C'est cette spécificité de la chaîne de polyubiquitine qui va déterminer si la protéine ciblée sera adressée au protéasome (principalement par le type K48) ou acquérir une fonction de signalisation cellulaire (notamment le type K63) (Xu et al., 2009). Enfin, l'ubiquitinylation est un processus réversible : de nombreuses enzymes appelées déubiquitinases (DUBs) sont capables d'hydrolyser la liaison entre l'ubiquitine et sa cible, de manière à déubiquitinyler les protéines pour éviter leur dégradation par le protéasome et activer ou désactiver leur rôle dans la signalisation (Pickart and Rose, 1985). L'abondance de nombreuses protéines est ainsi régulée par l'action antagoniste d'E3 ubiquitine ligases et de déubiquitinases (voir revue Komander et al., 2009).

4.3 L'ubiquitinylation cotraductionnelle : commencer à dégrader avant de finir de synthétiser

Les protéines en cours de traduction peuvent aussi être polyubiquitinylées et ainsi marquées pour la dégradation protéolytique avant même d'être entièrement synthétisées, par un processus appelé "polyubiquitinylation cotraductionnelle" (voir revue Comyn et al., 2014). La découverte de ce phénomène a suggéré l'existence d'une compétition entre le recrutement de chaperonnes et d'E3 ubiquitine ligases sur les ribosomes en cours de traduction, déterminant le destin de chaque peptide naissant qui sera soit correctement replié et fonctionnel, soit immédiatement adressé à la dégradation (Turner and Varshavsky, 2000). On distingue souvent deux types d'ubiquitinylation cotraductionnelle, une partie ciblant les ribosomes bloqués sur des ARNm aberrants de type non-stop ou no-go (complexes de traduction bloqués), et l'autre partie concernant les ribosomes en cours d'élongation de la traduction (complexes de traductions actifs). Il a été montré que l'ubiquitinylation cotraductionnelle a lieu sur environ 6% des peptides en cours de synthèse chez *Saccharomyces cerevisiae*, une proportion pouvant atteindre 12 à 15% des peptides naissants chez les cellules humaines, et que la majorité de ces évènements concerne les complexes de traduction actifs (Wang et al., 2013). Les premières E3 ubiquitine ligases identifiées comme capables de se lier aux ribosomes en cours de traduction ont été Ubr1 et Doa10, toutes deux impliquées dans la "N-end rule", un système d'ubiquitinylation des peptides naissants ayant un rôle déterminant dans la demi-vie des protéines en fonction de la séquence peptidique portée en N-terminal par ces protéines (Bachmair et al., 1986; Bartel et al., 1990; Hwang et al., 2010).

Plus récemment, une étude du taux de polyubiquitinylation des peptides naissants a permis d'identifier d'autres E3 ligases dont l'absence affecte de manière significative le profil cellulaire de polyubiquitinylation cotraductionnelle, notamment Hrd1, connue pour son implication dans le contrôle qualité des protéines au niveau du réticulum endoplasmique (ERAD), et Hul5, qui interagit directement avec le protéasome et qui participe également à la voie de dégradation ERAD (Duttler et al., 2013). La raison principale qui détermine le recrutement de ces E3 ubiquitine ligases sur les ribosomes et ainsi favorise la dégradation des peptides naissants au détriment de leur repliement par des chaperonnes est liée au ralentissement du ribosome au cours de l'élongation de la traduction, un phénomène ayant souvent pour origine un stress affectant l'homéostasie des protéines ou l'activité de ces chaperonnes cotraductionnelles (Liu et al., 2013; Shalgi et al., 2013). La découverte du "translasome", un complexe formé à la fois de polysomes et de protéasomes, suggère par ailleurs que la protéolyse du substrat alors polyubiquitinylé aurait lieu de manière simultanée à sa traduction : le peptide naissant pourrait donc dans certains cas être dégradé avant même d'avoir été entièrement synthétisé (Sha et al., 2009).

4.4 Le contrôle qualité de la traduction par le complexe RQC

L'arrêt traductionnel causé par la traduction de transcrits aberrant non-stop et no-go déclenche également le recrutement d'E3 ubiquitine ligases spécifiques qui permettent la polyubiquitinylation des peptides naissants aberrants. En effet, ces produits aberrants de la traduction sont souvent tronqués ou allongés (dans le cas de la traduction de la 3'UTR), il est donc essentiel pour la cellule d'éliminer ces protéines défectueuses pour prévenir toute toxicité qui pourrait résulter de leur dysfonctionnement ou de leur agrégation. Ainsi, deux E3 ubiquitine ligases contenant un domaine RING, Not4 et Ltn1, sont capables de détecter les ribosomes bloqués en cours de traduction et de polyubiquitinyler les peptides naissants aberrants maintenus dans le tunnel de sortie de la grande sous-unité 60S, ce qui va permettre la dégradation de ces protéines aberrantes par le protéasome.

Not4, sous-unité du complexe de déadénylation CCR4-NOT, est une E3 ubiquitine ligase dont l'activité est essentielle pour l'élimination des peptides naissants résultant de la traduction d'ARNm no-go portant des séquences basiques de type K_{12} et R_{12} (polylysine et polyarginine) (Dimitrova et al., 2009). Il a par la suite

été montré que Ltn1 pouvait également participer à la dégradation des peptides aberrants issus de transcrits no-go, et que la délétion simultanée de ces deux enzymes avait un effet synergique sur l'accumulation des protéines aberrantes (Bengtson and Joazeiro, 2010). Par conséquent, Not4 et Ltn1 ne semblent pas avoir de spécificité de détection des substrats issus d'ARNm no-go, et une étude récente a montré des résultats similaires concernant les protéines aberrantes issues de transcrits non-stop polyadénylés, ce qui était attendu étant donné que ces ARNm induisent la traduction d'une chaîne de polylysines en 3' de manière similaire au rapporteur K_{12} qui contient une polylysine interne (Matsuda et al., 2014). Cependant, il a également été montré que seule Ltn1 était capable de reconnaître et de polyubiquitinyler les peptides naissants issus de transcrits non-stop non polyadénylés, ce qui constitue une différence majeure dans le mécanisme d'action de ces deux ubiquitine ligases, ainsi que dans les mécanismes de contrôle qualité des ARNm non-stop portant ou non une queue poly(A) (Bengtson and Joazeiro, 2010). Il semble donc que la présence d'une queue poly(A) soit un élément déterminant pour permettre le recrutement de Not4, et cette protéine faisant partie du complexe CCR4-NOT responsable de la déadénylation des ARN messagers cytoplasmiques, on peut supposer qu'il existe un couplage entre déadénylation de certains transcrits aberrants polyadénylés et polyubiquitinylation des peptides naissants associés. Un résultat supportant cette théorie est l'observation que les fragments 3' d'ARNm issus du clivage endonucléolytique sont effectivement déadénylés (Tsuboi et al., 2012).

Ltn1 doit son nom à son orthologue mammifère, l'E3 ubiquitine ligase Listerin, qui a été identifiée lors d'un crible de mutagénèse effectué sur le génome de la souris cherchant des mutants ayant des phénotypes liés à des maladies neurodégénératives (Chu et al., 2009). Les souris homozygotes mutantes pour le gène *LISTER* (*lister/lister*) présentent des symptômes similaires à ceux provoqués par la maladie de Parkinson : faiblesse des membres s'aggravant progressivement avec l'âge, bradykinésie (mouvement corporel lent), et enfin perte totale de la mobilité. Précédemment, l'orthologue de Listerin chez la levure, Ltn1, avait été trouvée dans un crible visant à identifier des mutants dans lesquels les transcrits aberrants non-stop ou les protéines correspondantes étaient stabilisés (Wilson et al., 2007). C'est alors que l'équipe qui avait initialement découvert la protéine Listerin a

caractérisé le mécanisme d'action de l'orthologue Ltn1 : lorsque le ribosome bloqué sur un ARN messager non-stop est dissocié par l'action coordonnée de Dom34, Hbs1 et Rli1, l'E3 ubiquitine ligase Ltn1 se lie à la 60S bloquée contenant toujours un peptidyl-tRNA aberrant et procède à la polyubiquitinylation du peptide naissant, ce qui va permettre par la suite la dégradation de cette protéine aberrante par la protéasome (Bengtson and Joazeiro, 2010). L'absence de Ltn1 confère une sensibilité au stress traductionnel dû à l'accumulation de protéines aberrantes "non-stop" (dans le cas d'une protéine aberrante, l'emploi des termes "non-stop" et "no-go" est un abus de langage signifiant en réalité "issue de la synthèse d'ARN messager non-stop ou no-go"), et les auteurs ont ainsi proposé que le phénotype de neurodégénération du mutant *lister/lister* chez la souris pouvait provenir d'un dysfonctionnement du mécanisme de contrôle qualité des protéines médié par Ltn1. De plus, il a été récemment montré que Ltn1 est un inhibiteur de la ribophagie (autophagie ciblant les ribosomes), de manière antagoniste aux activités déubiquitinase de Ubp3-Bre5 et ATPase de Cdc48-Ufd3 (Ossareh-Nazari et al., 2014). En effet, l'ubiquitinylation de Rpl25 par Ltn1 limite la dégradation des sous-unités 60S, alors que l'activité de Ubp3-Bre5 favorise cette dégradation. L'abondance cellulaire de Ltn1 décroit après une période de carence en azote, ce qui pourrait permettre d'activer la ribophagie spéficiquement en conditions de stress.

Par la suite, deux études réalisées respectivement par le laboratoire d'Alain Jacquier, dans lequel j'ai effectué ma thèse, et celui de Jonathan Weissman, ont montré que l'E3 ubiquitine ligase Ltn1 ne se lie pas seule aux particules 60S bloquées, mais forme un complexe avec deux autres facteurs, Rqc1 et Rqc2 (précédemment nommé Tae2), qui a été appelé complexe RQC pour Ribosome-bound Quality Control (complexe de contrôle qualité lié au ribosome) (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). La découverte du complexe RQC a ainsi constitué la première partie de mon travail de thèse, de 2010 à 2012. Il est intéressant de constater que ces deux études ayant identifié les facteurs Rqc1 et Rqc2 sont toutes deux parties de cribles génétiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, cependant les approches étaient sensiblement différentes : alors que nous avons utilisé une méthode de criblage génétique à grande échelle permettant de mettre en évidence des interactions fonctionnelles, notamment de type synthétique létal, entre un mutant de délétion d'intérêt (dans ce cas des mutants des

facteurs du complexe SKI) et une collection systématique de mutants de délétion (Decourty et al., 2008), l'autre étude a recherché des mutants de délétion capables d'activer la réponse au stress traductionnel par Hsf1 grâce à un rapporteur fluorescent sous contrôle d'un promoteur contenant des séquences activables par Hsf1 (HSE pour Heat Shock Elements). C'est alors par des purifications biochimiques qu'a été mise en évidence l'interaction physique entre les particules 60S bloquées et les facteurs Ltn1, Rqc1 et Rqc2 (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). Par ailleurs, d'autres facteurs ont été trouvés associés avec ce complexe : Cdc48 (ou p97 chez les mammifères), qui forme un hexamère d'ATPases, ainsi que ses partenaires Npl4 et Ufd1. La **Figure 12A** récapitule les six facteurs composant le complexe RQC, les différents domaines fonctionnels connus pour ces protéines, ainsi que les interactions protéine-protéine identifiées. Une structure obtenue par cryo-microscopie électronique de l'hexamère de Cdc48/p97 associé à Ufd1-Npl4 est également présentée (**Figure 12B**), montrant l'importance du domaine N-ter de Cdc48 pour interagir avec ces deux partenaires (Bebeacua et al., 2012). Cependant, alors que cette structure suggère que l'interaction entre Ufd1 et l'hexamère de Cdc48 dépend de Npl4, il a par ailleurs été montré que Ufd1 et Cdc48 peuvent interagir directement entre eux (Ye et al., 2003).

Le rôle du complexe Cdc48-Ufd1-Npl4 avait été précédemment caractérisé dans le cadre de la dégradation des protéines associées à la membrane du réticulum endoplasmique (ERAD) : l'hexamère de Cdc48 reconnaît les substrats ubiquitinylés de type K48, cette reconnaissance étant favorisée par le facteur Ufd1 grâce à son domaine N-terminal capable d'interagir physiquement avec l'ubiquitine (Ye et al., 2003). Alors que l'importance du domaine NZF (Npl4 Zinc Finger) en C-terminal de Npl4 pour la reconnaissance des substrats ubiquitinylés a été décrite chez les mammifères, ce domaine NZF de Npl4 n'est pas conservé chez la levure : la fonction de Npl4 dans le complexe Cdc48-Ufd1-Npl4 reste donc indéterminée chez *Saccharomyces cerevisiae* (Meyer et al., 2002). Après la reconnaissance du substrat *via* sa chaîne de polyubiquitine, l'hexamère de Cdc48 hydrolyse de l'ATP de manière à produire l'énergie mécanique suffisante pour extraire la protéine défectueuse bloquée dans le pore membranaire du réticulum endoplasmique (Rape et al., 2001), et escorte ensuite cette protéine jusqu'au protéasome pour qu'elle soit dégradée (Richly et al., 2005).

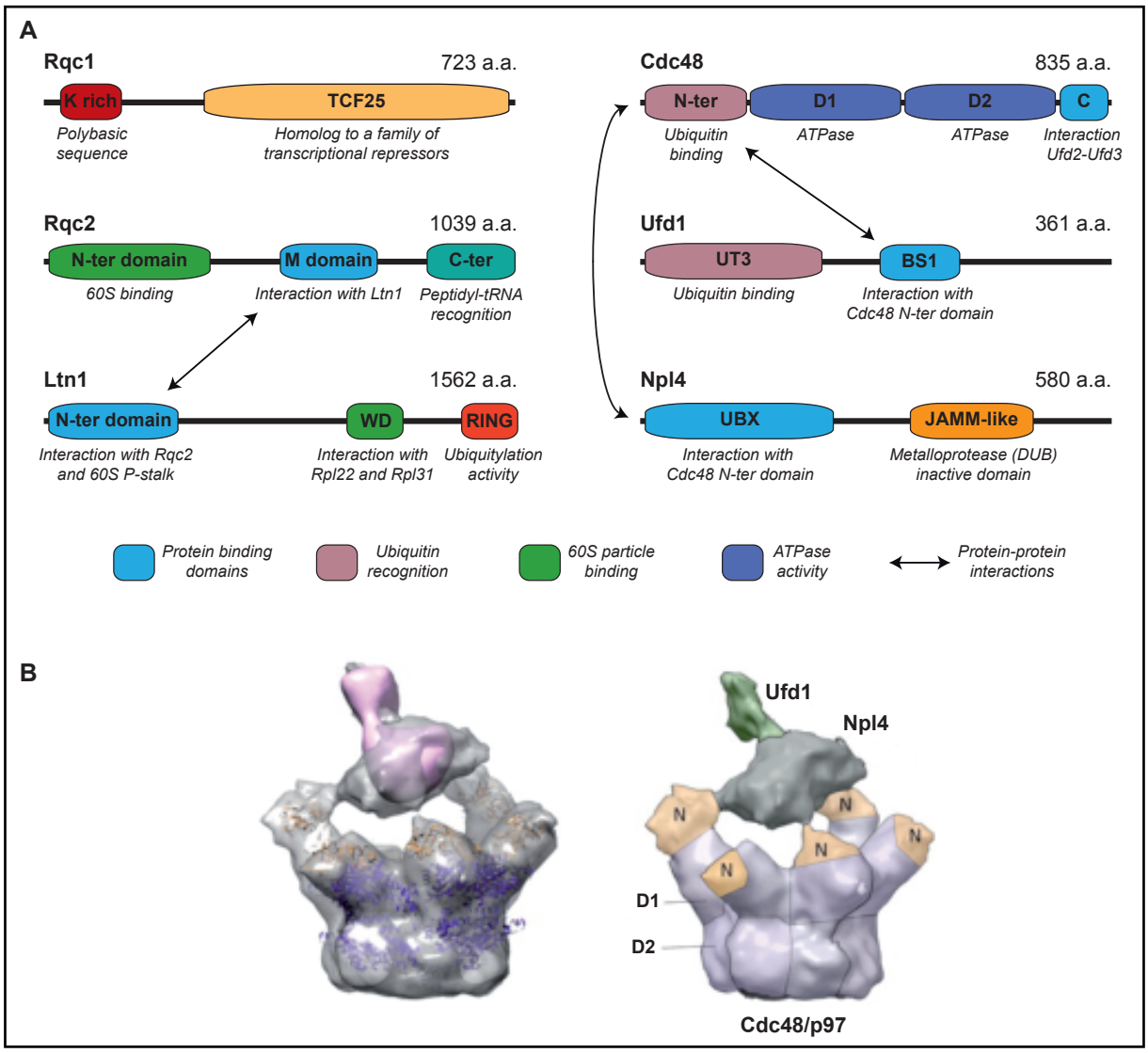


Figure 12. Protéines du complexe RQC et structure de Cdc48-Ufd1-Npl4
Données d'interactions protéine-protéine et structures cryo-EM issues des articles (Bebeacua et al., 2012; Shao et al., 2015)

Par analogie au fonctionnement de Cdc48-Ufd1-Npl4 dans le contrôle qualité ERAD, il a été supposé que l'hexamère de Cdc48, en association avec les particules 60S bloquées reconnues par Ltn1-Rqc1-Rqc2, pouvait avoir une fonction similaire en hydrolysant de l'ATP pour extraire le peptide naissant aberrant du tunnel de sortie de la 60S et l'escorter jusqu'au protéasome pour qu'il soit dégradé. L'accumulation de protéines aberrantes "non-stop" polyubiquitinylées au niveau de la 60S dans un gradient de polysomes en absence de Cdc48 a confirmé l'importance de ce facteur dans le processus de contrôle qualité traductionnel initié par le complexe RQC (Defenouillère et al., 2013; Verma et al., 2013). Le recrutement de Cdc48 sur la 60S bloquée dépend de la présence de Ltn1 et de Rqc1 : en effet, en absence d'un de

ces deux facteurs, le complexe Cdc48- Ufd1-Npl4 n'est plus capable de s'associer aux particules 60S (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). Cela était attendu pour ce qui est de l'absence de Ltn1, car les peptides aberrants rapporteurs "non-stop" bloqués dans le tunnel de sortie de la 60S ne sont plus polyubiquitinylés sans Ltn1, or le recrutement de Cdc48 nécessite la reconnaissance d'une chaîne de polyubiquitine. Cependant, l'absence de Rqc1 n'affectant pas la polyubiquitinylation des protéines aberrantes, ce résultat suggère que Rqc1 pourrait avoir un rôle direct dans le recrutement ou le positionnement de l'hexamère de Cdc48 sur les particules 60S bloquées, favorisant ainsi l'extraction des protéines aberrantes pour qu'elles soient efficacement adressées au protéasome (voir **Figure 13**).

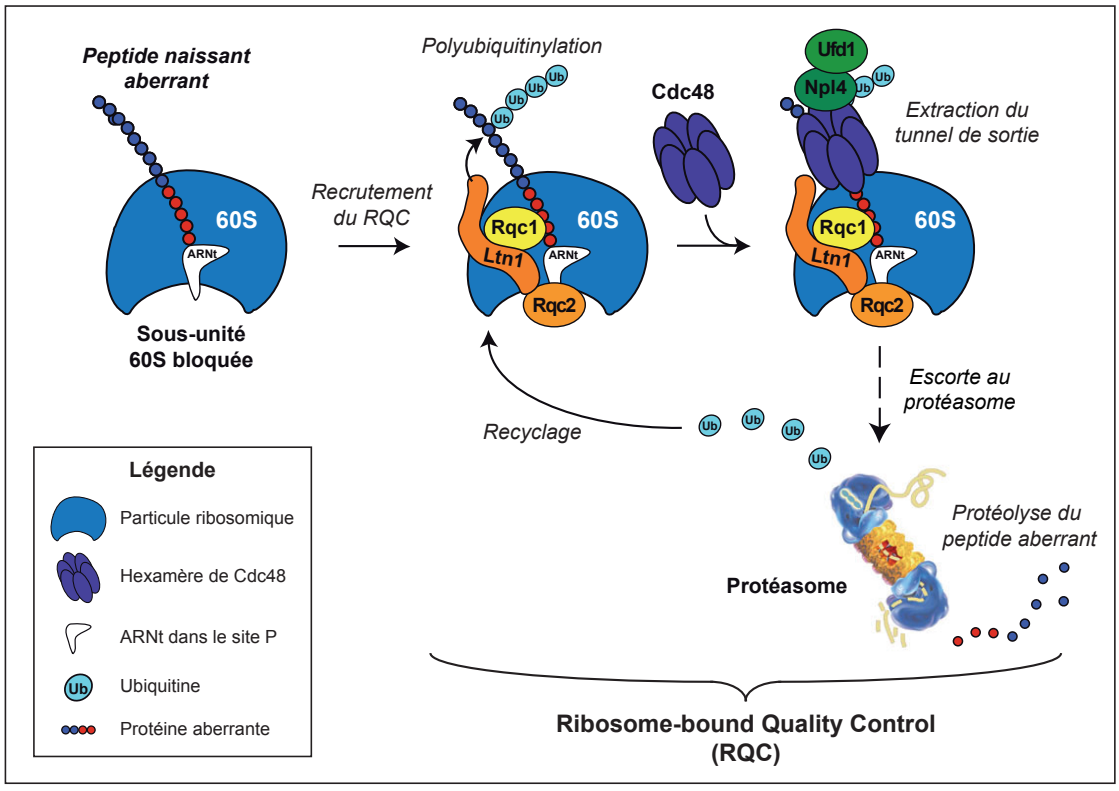


Figure 13. Mécanisme de contrôle qualité des protéines par le complexe RQC
A partir des données de Brandman et *al.*, 2012 et Defenouillère *et al.*, 2013

En utilisant des lysats de réticulocytes mammifères, le laboratoire de Ramanujan Hegde a progressivement reconstitué ce mécanisme de contrôle qualité *in vitro* : traduction d'un ARN messager aberrant, dissociation des sous-unités ribosomiques bloquées grâce à des versions recombinantes de Pelota (orthologue mammifère de Dom34), de Hbs1 et de Rli1/ABCE1 (Shao et al., 2013), recrutement

du facteur Ltn1/Listerin sur les 60S bloquées et polyubiquitinylation du peptidyl-ARNt (Shao and Hegde, 2014), et enfin recrutement de NEMF (Nuclear Export Mediator Factor, orthologue mammifère de Rqc2) parallèlement à l'E3 ubiquitine ligase Listerin sur ces 60S bloquées (Shao et al., 2015). L'ensemble de ce travail a permis de caractériser de nombreuses étapes de ce mécanisme : le facteur Listerin possède une forte affinité d'association avec les 60S bloquées et non avec les particules 80S, ce qui montre que la dissociation des ribosomes bloqués par Pelota-Hbs1-ABCE1 précède le recrutement du complexe RQC qui a lieu au niveau de la 60S et qui permet la polyubiquinylation du peptidyl-ARNt aberrant. De plus, le recrutement et l'action de la Listerin sur la 60S bloquée peut avoir lieu en absence de Pelota-Hbs1-ABCE1, en dissociant les 80S bloquées de manière artificielle par une faible concentration de magnésium et une forte concentration d'eIF6, un facteur connu pour inhiber la réassociation entre particules 60S et 40S (Valenzuela et al., 1982). Ce résultat, ainsi que les études structurales de Ltn1 et de Rqc2 liés au 60S par cryo-microscopie électronique, ont révélé qu'il existe une compétition entre le complexe RQC et les sous-unités 40S libres pour l'association aux 60S contenant un peptidyl-ARNt (voir **Figure 14**). En effet, après dissociation du ribosome bloqué, la 60S est soit reconnue par le complexe RQC qui va permettre son recyclage, soit réassociée sous forme de 80S, car Ltn1 et Rqc2 se lient à la particule 60S au niveau de son interface d'interaction avec la sous-unité 40S, ce qui exclut la possibilité d'une association du complexe RQC avec la 80S réassociée (Lyumkis et al., 2014; Shao and Hegde, 2014; Shen et al., 2015). Cette compétition explique pourquoi les protéines aberrantes ont tendance à s'accumuler au niveau de la 80S (et non de la 60S) dans un gradient de polysomes dans les mutants du RQC (Defenouillère et al., 2013) : même s'il y a dissociation des ribosomes bloqués par Dom34-Hbs1-Rli1, les 60S non reconnues par Ltn1 et Rqc2 se réassocient rapidement avec des 40S libres pour former des particules 80S reconstituées (Lyumkis et al., 2014; Shao and Hegde, 2014).

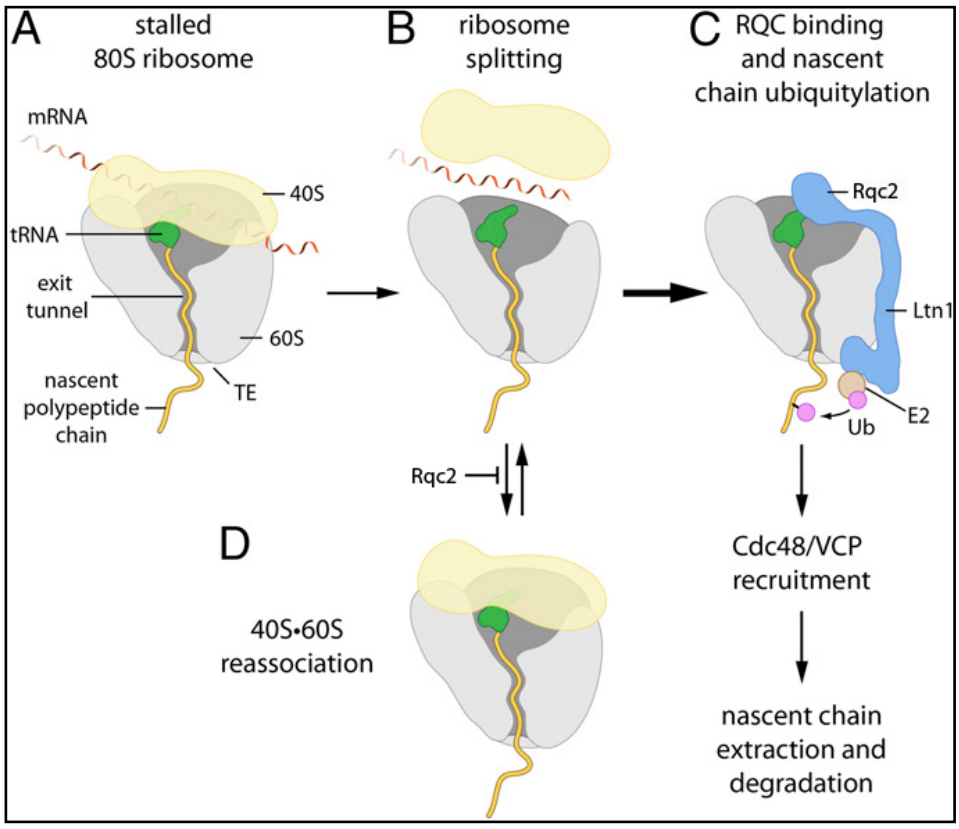


Figure 14. Schéma du recrutement de Ltn1 et Rqc2 sur la particule 60S bloquée
Figure adaptée de (Lyumkis et al., 2014) © 2015 National Academy of Sciences.

Plusieurs collaborations, incluant respectivement les laboratoires de Jonathan Weissman, de Claudio Joazeiro et de Ramanujan Hegde, ont résolu la structure du complexe 60S-Ltn1-Rqc2 grâce à des purifications de 60S bloquées liées aux facteurs du RQC et à des reconstitutions tridimensionnelles à partir de micrographes obtenus par cryo-microscopie électronique (Lyumkis et al., 2014; Shao et al., 2015; Shen et al., 2015). Même si les organismes utilisés (cellules de levure ou réticulocytes de mammifères) et la résolution obtenue pour Ltn1 et Rqc2 diffèrent, ces études parviennent toutes à des conclusions très similaires pour ce qui est de la position et de la conformation des facteurs observés. Tout d'abord, Ltn1 et Rqc2 interagissent tous deux directement avec la particule 60S bloquée, mais semblent également interagir entre eux, la partie N-terminale de Ltn1 entrant en contact avec le domaine M de Rqc2 (voir **Figures 12 et 15**). Rqc2/NEMF se lie par ses extrémités N-ter et C-ter à la 60S au niveau de son interface avec la 40S, à proximité de la protubérance centrale et du "P-stalk", et détecte ainsi la présence d'un peptidyl-ARNt aberrant occupant le site P de la grande sous-unité 60S (voir **Figure 15**, domaines

annotés N, M et C). Enfin, l'E3 ubiquitine ligase Ltn1/Listerin s'étend à partir de sa région de contact avec Rqc2/NEMF (située à proximité du "P-stalk" de la 60S) jusqu'au tunnel de sortie du peptide naissant (localisé de l'autre côté de la 60S), où elle interagit par son domaine C-terminal RWD (composé de répétitions WD et du domaine RING) avec Rpl22 et Rpl31, ce qui permet le positionnement de son domaine RING à proximité du peptide naissant pour favoriser la mise en place du processus de polyubiquitinylation (voir **Figures 12 et 15**).

Bien que le rôle et le mécanisme d'action de Ltn1/Listerin en association avec les particules 60S bloquées aient été caractérisés avant l'obtention de la structure du complexe 60S-Ltn1-Rqc2, ces études ont permis de découvrir plusieurs fonctions fondamentales du facteur Rqc2. Tout d'abord, nous avions montré que la présence de Rqc2 favorise l'association de Ltn1 à la 60S bloquée (Defenouillère et al., 2013), et ce résultat a été récemment confirmé chez les mammifères : non seulement la liaison de Rqc2/NEMF à la 60S bloquée stabilise l'interaction entre Ltn1/Listerin et cette 60S, mais Rqc2/NEMF semble accélérer le processus de polyubiquitinylation du peptidyl-ARNt aberrant (Shao et al., 2015). Ensuite, une de ces études structurales a découvert que ces 60S bloquées contiennent en réalité deux ARN de transfert (Shen et al., 2015) : l'un dans le site P, lié covalemment au peptide naissant, et l'autre dans le site A, pourtant censé être "vide" au moment de la dissociation du ribosome bloqué par Dom34-Hbs1-Rli1. Leur analyse de la composition en ARNt de ces complexes bloqués a révélé un enrichissement significatif des ARN de transfert Alanine et Thréonine, qui est dépendant de la présence de Rqc2. C'est alors qu'ils ont identifié une nouvelle fonction de Rqc2, par une analyse biochimique du peptide naissant aberrant : après reconnaissance du peptidyl-ARNt situé dans le site P de la 60S (Lyumkis et al., 2014; Shen et al., 2015), Rqc2 permet le recrutement d'ARNt Alanine et Thréonine dans le site A, et le centre peptidyl-transférase de la 60S catalyse l'ajout d'alanines et de thréonines à l'extrémité C-terminale du peptide naissant aberrant. Les 60S bloquées sont donc capables, en présence de Rqc2, de réaliser plusieurs cycles d'élongation de la traduction à partir d'ARN de transfert, et ce en absence de sous-unité 40S ou d'ARN messager portant une séquence codante (Shen et al., 2015).

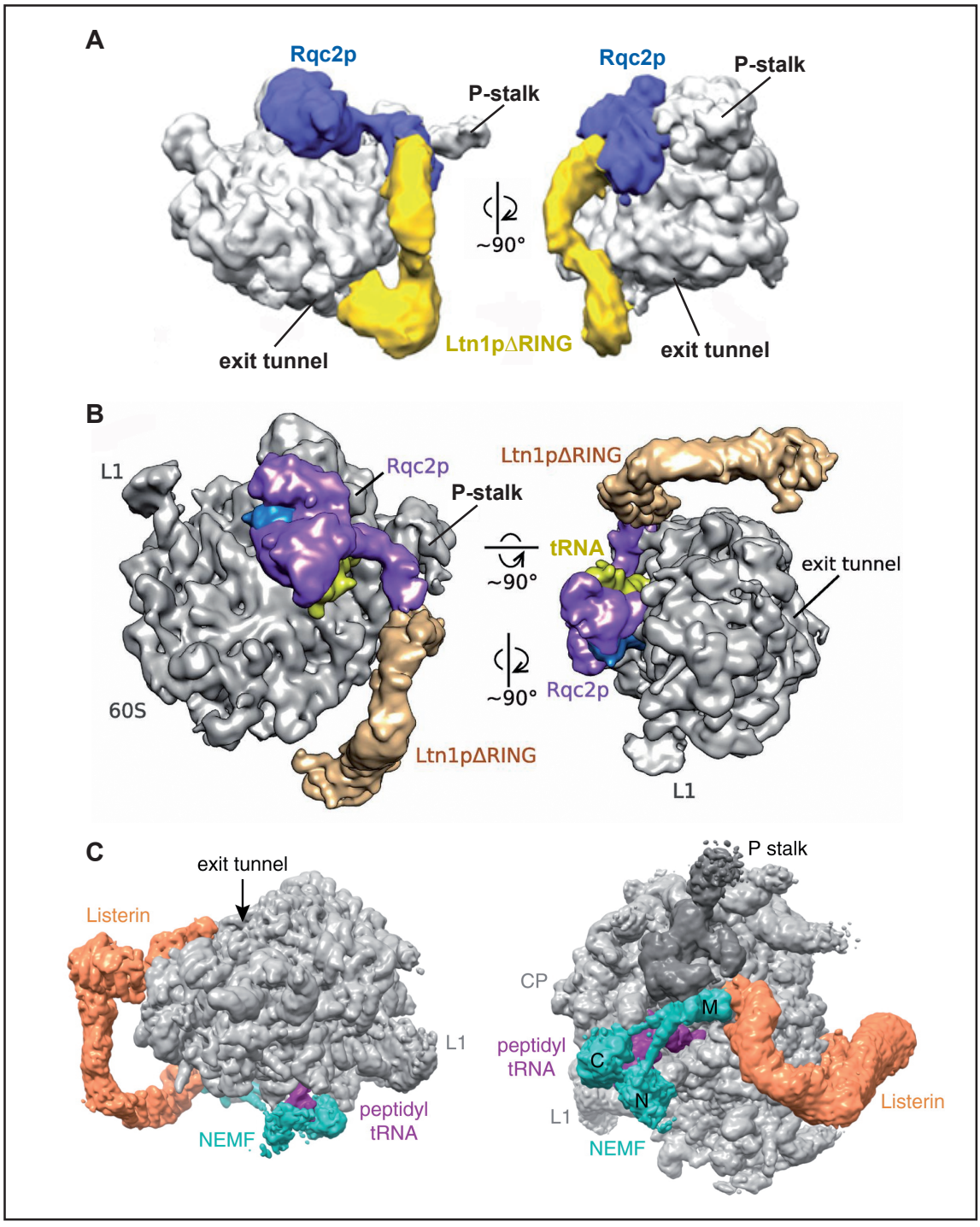


Figure 15. Synthèse des différentes structures du complexe 60S-Ltn1-Rqc2
Structures par cryo-EM de la sous-unité 60S bloquée de *S. cerevisiae* en interaction avec Ltn1ΔRING, ainsi que Rqc2 déduit par superposition avec la structure des particules 60S en *rqc2*Δ (A) ou visualisé à plus haute résolution (B) (Lyumkis et al., 2014; Shen et al., 2015) Copyright © 2015 N.A.S.
(C) Structure de la sous-unité 60S associée à Listerin et Rqc2/NEMF (complexe mammifère reconstitué *in vitro*) (Shao et al., 2015)

Ce processus d'ajout de queues Alanine et Thréonine C-terminales, appelées "CAT-tails", est essentiel à Rqc2 pour déclencher la réponse Hsf1 au stress traductionnel (Brandman et al., 2012), Cependant, la construction d'un mutant de Rqc2 (*rqc2*$_{aaa}$), déficient pour l'addition de CAT-tails mais n'affectant pas la dégradation des protéines aberrantes, a permis au laboratoire de Jonathan Weissman de montrer que l'ajout de CAT tails par Rqc2 n'est pas essentiel pour le processus de contrôle qualité de la traduction par le complexe RQC (Shen et al., 2015). D'autres fonctions possibles pour ce système d'ajout de CAT-tails peuvent être envisagées : le transfert du peptide naissant d'un ARNt au suivant pourrait faciliter l'extraction de ce polypeptide aberrant par l'hexamère de Cdc48, contrairement à une situation où le peptidyl-ARNt serait statique dans la particule 60S et protégé de toute hydrolyse. De plus, le fait de réaliser plusieurs étapes d'élongation de la traduction par la 60S seule pourrait servir de contrôle qualité des sous-unités 60S : en effet, si la 60S bloquée est capable de catalyser l'ajout de CAT-tails au peptide naissant, cela signifie qu'elle est *a priori* fonctionnelle et peut être réengagée dans des cycles de traduction, alors que sans ajout de CAT-tails, il est possible que les 60S bloquées soient considérées comme défectueuses et dégradées de manière à limiter les évènements aberrants de traduction (hypothèse proposée dans Shen et al., 2015).

Parmi tous les facteurs composant le complexe RQC, le seul dont la fonction demeure totalement inconnue est Rqc1. En effet, alors que les structures de Ltn1, Rqc2, Cdc48, Ufd1 et Npl4 sont à présent bien définies (Bebeacua et al., 2012; Lyumkis et al., 2014; Shao et al., 2015; Shen et al., 2015) et que les fonctions de ces facteurs ont été en partie caractérisées (Richly et al., 2005; Bengtson and Joazeiro, 2010; Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013; Shao et al., 2015; Shen et al., 2015), très peu de données sont disponibles concernant Rqc1. Aucune densité structurale correspondant à Rqc1 n'est apparue parmi les différentes études du complexe 60S-RQC par cryo-microscopie électronique, ce qui laisse à penser que la structure de ce facteur est très flexible, ou qu'il adopte une multitude de conformations possibles lorsqu'il s'associe aux 60S bloquées (Lyumkis et al., 2014; Shen et al., 2015). Il a toutefois été montré que Rqc1 est essentiel pour le recrutement de Cdc48-Ufd1-Npl4 sur les 60S bloquées (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013), et que cette protéine contient un motif Tcf25 (famille

regroupant des facteurs de répression de la transcription) ainsi qu'une séquence polybasique à son extrémité N-terminale (voir **Figure 12**). Cette séquence riche en lysines et en arginines est importante car elle induit l'arrêt des ribosomes durant la traduction de Rqc1 (de manière similaire à un rapporteur K_{12} ciblé par le NGD), ce qui déclenche une boucle d'autorégulation de Rqc1 par le complexe RQC lui-même qui maintient Rqc1 à un faible niveau d'abondance cellulaire (Brandman et al., 2012). L'absence de fonction moléculaire connue pour Rqc1 est une des raisons pour lesquelles l'étude du mécanisme d'action de Rqc1 et de ses partenaires physiques a constitué notre principal objectif de recherche durant la deuxième partie de ma thèse (voir la partie **Résultats**).

4.5 Contrôle qualité des particules ribosomiques bloquées

Alors que des mécanismes de détection et de dégradation des ARNm et des peptides naissants aberrants ont été identifiés et caractérisés, une autre question importante concerne le devenir des sous-unités ribosomiques bloquées lors d'un arrêt traductionnel : les particules 40S et 60S dissociées sont-elles directement réengagées dans des cycles de traduction ou sont-elles dégradées? Au-delà des évènements de blocage des ribosomes dus à la traduction d'ARNm défectueux ou de stress affectant la traduction, l'arrêt traductionnel peut également être causé par des erreurs de maturation lors de la biogenèse des ribosomes ou bien par des dommages chimiques ciblant les sous-unités ribosomiques (voir revue Graille and Séraphin, 2012). Les études réalisées sur le devenir des ARN ribosomiques 18S et 25S après un arrêt traductionnel induit par des mutants au niveau du centre de décodage du 18S ou du centre peptidyl-transférase du 25S ont révélé l'existence de mécanismes de contrôle qualité éliminant les ARNr 18S et 25S des particules ribosomiques défectueuses, appelés respectivement 18S NRD et 25S NRD pour "dégradation des ARNr 18S et 25S non fonctionnels" (LaRiviere et al., 2006). Le déclenchement du 18S NRD nécessite que les sous-unités 40S déficientes soient engagées dans des cycles de traduction, car leur dégradation est altérée en présence de cycloheximide ou d'hygromycine B, deux inhibiteurs de l'élongation de la traduction (Cole et al., 2009). La dégradation de l'ARNr 18S est effectuée par l'exosome cytoplasmique (notamment l'exonucléase Rrp44/Dis3) mais fait également intervenir l'exonucléase Xrn1 ainsi que les facteurs Dom34, Hbs1 et Ski7, ce qui montre que le 18S NRD est relié mécanistiquement au No-go mRNA Decay. Suite à

un arrêt traductionnel, l'ARNr 18S constituant la particule 40S déficiente est donc dégradé *via* le déclenchement du NGD par les facteurs de dissociation des ribosomes bloqués et de dégradation des ARN messagers aberrants. Cependant, ces études ayant systématiquement utilisé des rapporteurs de l'ARNr 18S portant des mutations dans le centre de décodage, ces résultats ne permettent donc pas de conclure que les particules 40S fonctionnelles bloquées sont également dégradées après déclenchement du NGD. Cependant, étant donné que le blocage des ribosomes requiert la polyubiquitinylation de Rps3 et Rps20 par Hel2-Ubc4 (Inada T. *et al.*, résultats présentés à la conférence CSHL Translational Control, Septembre 2014), il est possible que certaines protéines constituant les particules 40S soient éliminées par le protéasome, que ces 40S soient fonctionnelles ou non.

Pour ce qui est des particules 60S bloquées, de manière similaire au système procaryote du tmRNA, l'ajout de CAT-tails au peptide naissant pourrait être un moyen de vérifier la fonctionnalité du centre peptidyl-transférase de la 60S, qui permettrait de trier les particules 60S fonctionnelles ou déficientes et de déclencher un mécanisme de contrôle qualité pour éviter que des sous-unités 60S défectueuses ne soient réengagées dans des cycles de traduction (Shen et al., 2015). Comme mentionné précédemment, les ARNr 25S déficients pour l'activité peptidyl-transférase sont détectés et dégradés par le 25S NRD, un processus qui ne nécessite pas de cycle de traduction et ne fait pas intervenir les facteurs du NGD, mais qui requiert l'activité exonucléase de l'exosome cytoplasmique porté par Rrp44/Dis3 (Cole et al., 2009). De plus, l'ubiquitinylation de certaines protéines ribosomiques sur les particules 60S déficientes par l'hétérodimère Rtt101-Mms1 est essentiel pour le déclenchement de ce contrôle qualité (Fujii et al., 2009), il est donc possible que certaines Rpl soient également dégradées par le protéasome suite à un arrêt traductionnel. Le contrôle qualité des particules 60S initié par Rtt101-Mms1 fait également intervenir le complexe Cdc48-Ufd1-Npl4 ainsi que le protéasome (Fujii et al., 2012), ce qui suggère que par analogie au rapprochement entre NGD et 18S NRD, il pourrait exister une convergence mécanistique entre dégradation des peptides naissants aberrants par le complexe RQC et élimination des sous-unités 60S bloquées par le 25S NRD. L'étude du devenir des 60S libérées après extraction du peptidyl-ARNt aberrant par un hexamère de Cdc48 permettrait de déterminer si

ces 60S théoriquement fonctionnelles sont également adressées au protéasome et à l'exosome cytoplasmique.

5 - Autres mécanismes cellulaires de contrôle qualité des protéines

D'autres processus de dégradation des protéines déficientes ont été découverts chez les eucaryotes, qui ciblent respectivement les protéines s'accumulant dans le réticulum endoplasmique, dans le noyau, ou encore dans la mitochondrie : en effet, il existe chez les eucaryotes une forte compartimentation des mécanismes de contrôle qualité des protéines (voir revue Nielsen et al., 2014). Même si la majorité des protéines aberrantes présentes dans l'ensemble de ces compartiments cellulaires sont au final dégradées par le protéasome, chaque organelle contient des facteurs de contrôle qualité intrinsèques (chaperonnes, E3 et E2 ubiquitine ligases...) qui définissent ces différents processus de contrôle qualité cellulaires. Alors que certains systèmes ciblent les protéines aberrantes toujours liées aux ribosomes (peptides en cours d'insertion ou de translocation au sein d'une membrane), d'autres ciblent uniquement les protéines entièrement traduites et sont donc strictement post-traductionnels.

5.1 Dégradation des protéines associées au réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique ou ER constitue l'organelle primaire par lequel les protéines sont insérées dans une membrane, et vont par la suite y être incorporées dans le cas de protéines membranaires ou les traverser de manière à être sécrétées. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, plus d'un quart des protéines nouvellement synthétisées sont adressées au ER : le mécanisme de translocation à travers le pore formé par le complexe Sec61 est donc un élément central de la synthèse et de la maturation des protéines eucaryotes (Ghaemmaghami et al., 2003). La dégradation des protéines associées à la membrane du réticulum endoplasmique, processus couramment appelé ERAD, a été le premier mécanisme eucaryote de contrôle qualité des protéines à avoir été identifié et caractérisé (Finger et al., 1993; McCracken and Brodsky, 1996). Le système ERAD cible et dégrade les protéines qui ne parviennent pas à adopter leur conformation ou leur localisation finales, que ce soit au niveau de l'insertion membranaire ou de la translocation jusqu'au lumen du

ER (voir revue Zattas and Hochstrasser, 2014). Deux E3 ubiquitine ligases transmembranaires, Hrd1 et Doa10, dont les domaines RING sont exposés du côté cytosolique de la membrane du ER, peuvent initier le processus de polyubiquitinylation des substrats du ERAD, ce qui permet la dégradation de ces derniers par le protéasome (Bays et al., 2001; Swanson et al., 2001). Les substrats de ces deux enzymes sont clairement distincts (Carvalho et al., 2006) : alors que Hrd1 cible les protéines dont le signal de dégradation (ou dégron) est soit intramembranaire, soit situé dans le lumen du ER, Doa10 cible les protéines possédant un dégron situé du côté cytosolique de la membrane du ER. Cependant, étant donné que la double délétion *hrd1*Δ*doa10*Δ exhibe des effets synergiques sur l'accumulation des substrats du ERAD, il existe un certain recouvrement au niveau de la spécificité d'action de ces deux E3 ligases (Swanson et al., 2001).

Hrd1 contient six hélices transmembranaires et son activité de polyubiquitinylation requiert de nombreux cofacteurs, principalement l'E2 ubiquitine ligase Ubc7 et la protéine transmembranaire Cue1, essentielle pour l'interaction entre Hrd1 et Ubc7 (Biederer et al., 1997). D'autres facteurs associés au complexe Hrd1 ont également été identifiés : Hrd3 et Der1, tous deux nécessaires au processus de rétrotranslocation des protéines défectueuses par le pore Sec61 (voir **Figure 16**), ainsi que Yos9 et la chaperonne Kar2, impliqués dans la rétention des protéines aberrantes localisées dans le lumen du ER pour permettre leur polyubiquitinylation par Hrd1 puis leur dégradation (Knop et al., 1996; Gardner et al., 2000; Izawa et al., 2012). Par la suite, la protéine transmembranaire Usa1 a été identifiée comme importante pour l'interaction entre Hrd1 et Der1, et enfin le facteur Ubx2, contenant un domaine UBA qui se lie aux chaînes de polyubiquitine, ainsi qu'un domaine UBX capable de recruter un hexamère de Cdc48 avec ses cofacteurs Ufd1 et Npl4, qui va extraire la protéine aberrante de la membrane du ER et l'adresser au protéasome pour qu'elle soit dégradée (Rape et al., 2001; Richly et al., 2005; Schuberth and Buchberger, 2005). Le mécanisme d'action de Hrd1 dans le processus de contrôle qualité ERAD peut ainsi être décomposé en trois principales étapes : polyubiquitinylation par Hrd1-Ubc7, rétrotranslocation à travers la membrane du ER par Hrd3, Der1 et l'activité ATPase de Cdc48, et enfin escorte au protéasome par le complexe Cdc48-Ufd1-Npl4.

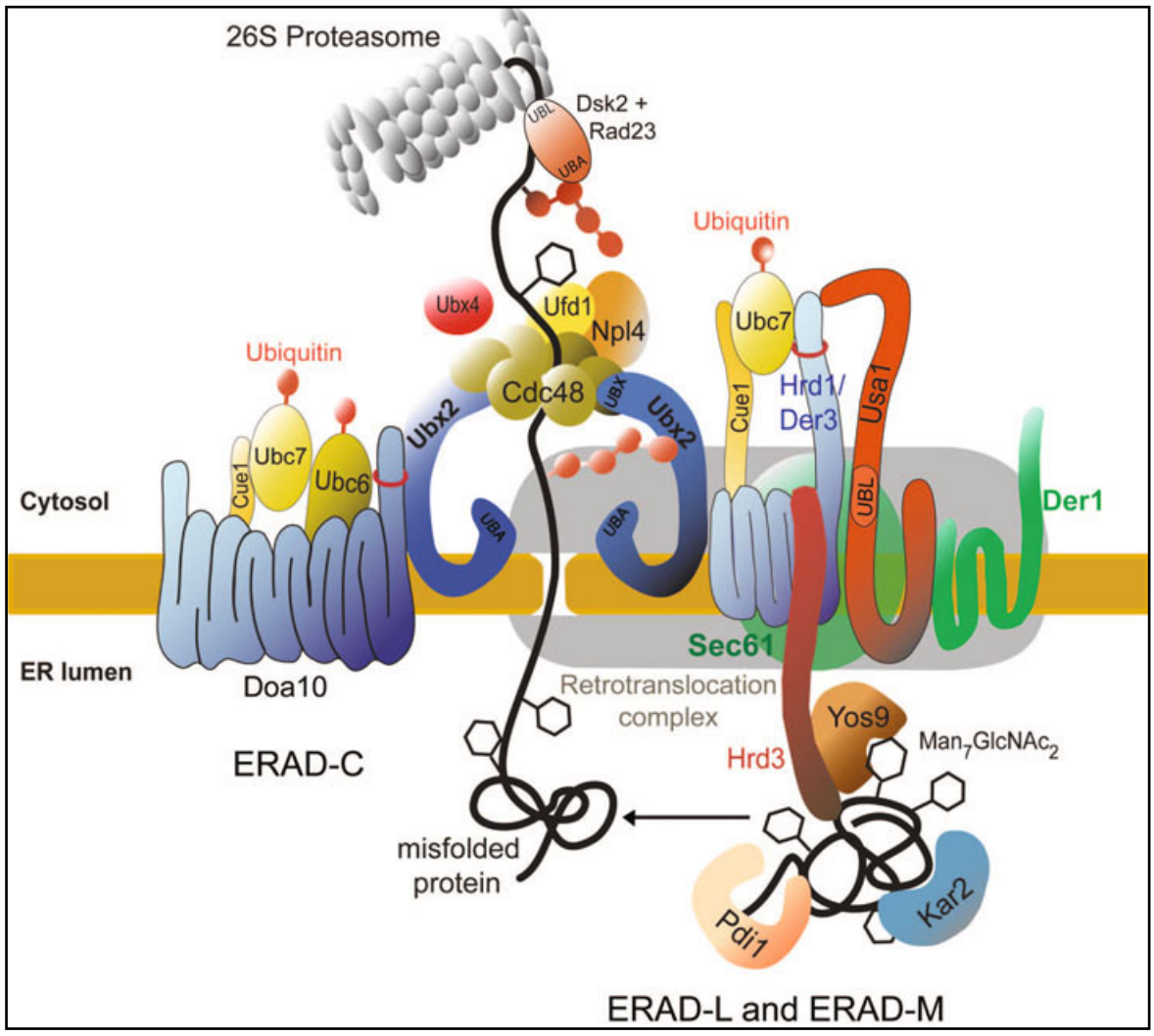


Figure 16. Mécanismes de dégradation des protéines associées au ER
Schéma issu de (Eisele et al., 2010) © 2010 Landes Bioscience & Springer

L'E3 ubiquitine ligase Doa10 contient 14 domaines transmembranaires, et son activité de polyubiquitinylation fait intervenir moins de facteurs que Hrd1 (voir **Figure 16**). Doa10 fonctionne avec deux E2 ubiquitine ligases, Ubc7 (qui nécessite ici aussi Cue1 pour interagir avec le RING) et la protéine transmembranaire Ubc6 (Chen et al., 1993; Sommer and Jentsch, 1993). Une fois la protéine déficiente polyubiquitinylée, la suite du mécanisme ERAD est la même que pour Hrd1 : Ubx2 prend en charge le substrat et le transmet au complexe Cdc48-Ufd1-Npl4 pour qu'il soit escorté et dégradé par le protéasome (Ye et al., 2003; Schuberth and Buchberger, 2005). Ce contrôle qualité des protéines du réticulum endoplasmique est déclenché par la présence d'un dégron au niveau de la protéine cible, qui consiste généralement en un positionnement incorrect d'un domaine de cette

protéine : soit une région hydrophobe mal insérée dans la membrane du ER, soit au contraire une séquence hydrophile anormalement présente dans cette membrane. La reconnaissance de ces dégrons se fait souvent grâce à des chaperonnes moléculaires et des co-chaperonnes, localisées soit du côté cytosolique soit dans le lumen du ER, et nécessite parfois des modifications post-traductionnelles de la protéine à dégrader : N-glycosylation, N-acétylation, phosphorylation, sumoylation ou encore hydroxylation (voir revue Nakatsukasa and Brodsky, 2008). En conclusion, la dégradation des protéines défectueuses au niveau du réticulum endoplasmique par le mécanisme de contrôle qualité ERAD permet d'éviter l'accumulation de protéines incorrectement insérées dans la membrane du ER, ainsi que la sécrétion de protéines aberrantes vers d'autres compartiments cellulaires. Le système ERAD participe ainsi au maintien de la qualité du protéome au niveau du ER, et de l'intégrité du processus de maturation des protéines réalisé dans cette organelle.

5.2 Processus nucléaires de contrôle qualité des protéines

Chez les levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe*, la grande majorité des protéasomes (jusqu'à 80%) se situe dans le noyau ou dans la région périnucléaire du cytoplasme, alors que cette distribution est plus uniforme chez les mammifères (Wilkinson et al., 1998; Brooks et al., 2000). Après avoir été synthétisés et assemblés dans le cytoplasme, une grande partie des protéasomes de levure est recrutée par le facteur Sts1 qui interagit avec la karyophérine alpha Srp1 (ou Kap60) et le pore nucléaire, ce qui permet l'import de protéasomes vers le noyau. La proportion de protéasomes nucléaires étant faible dans un mutant de Sts1, et au contraire anormalement élevée lorsque Sts1 est surexprimé, l'abondance cellulaire de Sts1 participe directement à la régulation de la proportion de protéasomes nucléaires (Chen et al., 2011). La dégradation des protéines chez la levure dépend donc davantage de l'activité du protéasome nucléaire que chez les mammifères, et nécessite des mécanismes d'import des protéines à dégrader du cytosol vers le noyau. Ainsi, chez les levures, de nombreuses protéines cytosoliques déficientes ne sont pas éliminées dans le cytosol, mais sont en réalité importées vers le noyau grâce à des navettes telles que les co-chaperonnes Sis1, Sse1 et Ydj1 et leurs partenaires Ssa1/2 (voir **Figure 17**), puis polyubiquitinylées par des E3 ligases nucléaires et enfin dégradées par le protéasome nucléaire (Park et al., 2013).

Des études récentes chez *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que le noyau était un compartiment particulièrement actif en terme de contrôle qualité des protéines (voir revue Nielsen et al., 2014). Ces processus de contrôle qualité nucléaires ne ciblent pas uniquement les protéines défectueuses nucléaires, mais également certaines protéines importées du cytosol qui seront reconnues et dégradées dans le noyau. Plusieurs E3 ubiquitine ligases sont impliquées dans ce mécanisme de contrôle qualité chez la levure, cependant le système mammifère fait intervenir davantage de partenaires tels que CHIP et E6-AP. Le facteur principal du mécanisme nucléaire de contrôle qualité des protéines est l'E3 ubiquitine ligase San1, qui reconnait et polyubiquitinyle spécifiquement les protéines mal repliées présentes dans le noyau, qu'elles soient nucléaires ou qu'elles proviennent du cytoplasme, pour permettre leur dégradation par le protéasome (Gardner et al., 2005). La reconnaissance des substrats par San1 est rendue possible grâce à la structure atypique de cette protéine : en effet, si San1 possède un domaine RING au centre de sa séquence peptidique, ses parties N- et C-terminales sont intrinsèquement désordonnées, ce qui lui confère une multitude de conformations possibles. Cette grande flexibilité structurale permet à San1 de s'adapter à n'importe quel substrat mal replié pour procéder à sa polybiquitinylation, et cette plasticité fonctionnelle est un élément essentiel du processus nucléaire de contrôle qualité des protéines (Rosenbaum et al., 2011). San1 fonctionne avec deux E2 ubiquitine ligases, Ubc1 et Cdc34, et cible aussi bien les protéines solubles que les agrégats de protéines déficientes (voir **Figure 17**). Dans le cas de la polyubiquitinylation d'agrégats protéiques nucléaires, le mécanisme de dégradation initié par San1 nécessite le recrutement d'un hexamère de Cdc48 pour extraire la protéine polyubiquitinylée de l'agrégat où elle se trouve et l'adresser au protéasome (Gallagher et al., 2014).

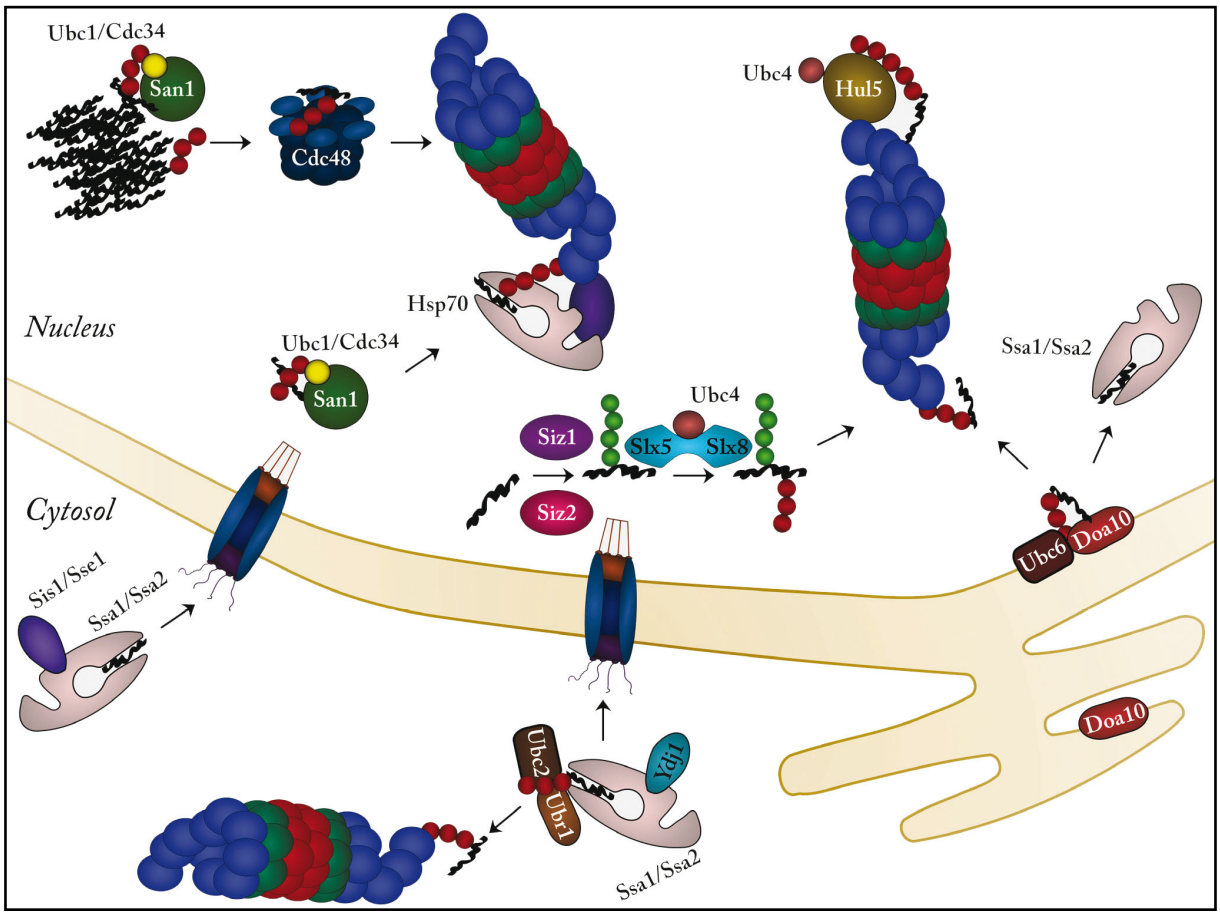


Figure 17. Mécanismes nucléaires de contrôle qualité des protéines
Schéma adapté de Nielsen S.V. *et al.*, Biomolecules, 2014

Au-delà de son activité essentielle pour la voie ERAD lorsqu'elle est incorporée dans la membrane du réticulum endoplasmique, l'E3 ubiquitine ligase Doa10 peut également s'insérer dans la membrane nucléaire (avec son domaine RING exposé du côté du nucléoplasme) et participer à la dégradation de certaines protéines défectueuses, notamment d'une version mutée de la protéine du kinétochore Npc10-2 (Furth et al., 2011). La reconnaissance de ces substrats nécessite la co-chaperonne Sis1 et fait intervenir les chaperonnes Ssa1/Ssa2, ce qui permet la polyubiquitinylation des protéines ciblées par Doa10 et son E2 ubiquitine ligase associée Ubc6 (Shiber et al., 2013). Ubr1, une autre E3 ligase connue pour son rôle dans la N-end rule, fonctionne aussi avec les chaperonnes Ssa1/Ssa2 et les co-chaperonnes Sis1, Ydj1 et Sse1 pour procéder à la polyubiquitinylation de certaines cibles ; de plus, il a été montré que Ubr1 et San1 possèdent de nombreux substrats en commun, ce qui suggère que Ubr1 pourrait également avoir un rôle dans certains systèmes nucléaires de contrôle qualité des protéines (Heck et al., 2010).

Certaines protéines nucléaires défectueuses, telles que le mutant mot1-301 du facteur de liaison à l'ADN Mot1, nécessitent au préalable une étape de sumoylation par les SUMO ligases Siz1 et Siz2 afin d'être polyubiquitinylées et adressées au protéasome (Wang and Prelich, 2009). En effet, la polyubiquinylation de Mot1-301 par le complexe Slx5-Slx8, E3 ubiquitine ligase fonctionnant avec l'E2 ligase Ubc4, ne peut avoir lieu en absence du processus de sumoylation par Siz1-Siz2 (voir **Figure 17**), ce qui souligne l'importance de cette modification post-traductionnelle pour le déclenchement de certaines voies de contrôle qualité des protéines nucléaires.

Enfin, Hul5 est une E3 ubiquitine ligase à domaine HECT qui interagit directement avec le protéasome et qui favorise la dégradation de substrats préalablement ubiquitinylés. Son activité est particulièrement augmentée après un choc thermique, et tandis qu'elle fait constamment la navette entre le noyau et le cytosol, son import nucléaire est inhibé en cas de stress traductionnel (Fang et al., 2011). Par ailleurs, il a été montré chez *Schizosaccharomyces pombe* que Hul5 contribue à la dégradation d'un composant du kinétochore mal replié dans le noyau, ce qui suggère que Hul5 pourrait dans certains cas participer aux processus nucléaires de contrôle qualité des protéines (Kriegenburg et al., 2014). De nombreux facteurs de contrôle qualité permettent donc l'import des protéines cytoplasmiques défectueuses dans le noyau, ou bien participent aux processus de dégradation nucléaire de ces substrats, ce qui permet de préserver la qualité du protéome nucléaire. Cependant, même si la majorité de ces protéines sont conservées chez tous les eucaryotes, une forte proportion du protéasome de levure étant localisé dans le noyau, ces systèmes de contrôle qualité nucléaire occupent une place prépondérante dans le maintien de l'homéostasie des protéines chez les levures à bourgeonnement ou à fission (Wilkinson et al., 1998).

5.3 Contrôle qualité des protéines mitochondriales

La mitochondrie est une organelle essentielle pour le fonctionnement des cellules eucaryotes, et la présence d'un stress pouvant affecter l'intégrité mitochondriale peut engendrer des conséquences cellulaires dramatiques telles que la sénescence ou la neurodégénération (Luce et al., 2010). L'homéostasie des protéines dans cette organelle est un véritable challenge pour la cellule, car la

mitochondrie est la source majeure de ROS (espèces réactives de l'oxygène), produits de la phosphorylation oxydative qui peuvent modifier chimiquement les protéines mitochondriales et ainsi affecter leur fonction. De plus, la biogenèse de ces protéines et de la machinerie nécessaire pour la chaine respiratoire est un processus particulièrement complexe, qui requiert à la fois l'import de protéines produites dans le cytosol (codées par le génome nucléaire) et la maturation de protéines synthétisées dans la mitochondrie (à partir du génome mitochondrial). C'est pourquoi il existe un réseau de mécanismes de contrôle qualité des protéines compartimentés au sein des différents composants de la mitochondrie : matrice mitochondriale, membrane interne et espace intermembranaire (voir revue Tatsuta, 2009). Ce réseau constitué de chaperonnes et de protéases permet de maintenir la qualité et l'intégrité du protéome mictochondrial même en cas de stress traductionnel ou oxydatif.

La grande majorité des protéines contenues dans la matrice mitochondriale proviennent de la traduction cytosolique, et sont importées (parfois de manière cotraductionnelle) via les translocases TOM et TIM23 qui leur permettent de traverser les membranes externe et interne de la mitochondrie, respectivement. En général, ces protéines ne sont pas encore repliées lorsqu'elles atteignent la matrice, et nécessitent par conséquent l'assistance de chaperonnes pour adopter leur conformation finale. Parmi les différentes chaperonnes actives dans la matrice mitochondriale, on trouve notamment mtHsp70 (Ssc1 chez la levure), qui interagit avec le complexe TIM23 pour permettre le repliement partiel des protéines grâce à l'action coordonnée des co-chaperonnes (mtHsp40) Tim44 et Mge1 (Voos and Röttgers, 2002). Après dissociation de Ssc1, certaines protéines partiellement repliées sont prises en charge par des mtHsp60, chaperonnes formant des structures en cage avec des mtHsp10, qui permettent le repliement final des substrats (Manning-Krieg et al., 1991). En parallèle de ce réseau de chaperonnes, le complexe Lon (Pim1 chez la levure) possède une activité sérine protéase qui élimine les protéines mitochondriales endommagées à cause d'une dénaturation ou d'une oxydation (Bota and Davies, 2002). Il existe un autre complexe possédant une activité protéolytique dans la matrice mitochondriale chez les métazoaires, ClpXP, mais l'activité de ce complexe n'est pas conservée chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le mécanisme de reconnaissance des protéines déficientes par Lon suggère la possibilité d'une coopération avec le réseau de chaperonnes mitochondriales, qui

pourraient prévenir l'agrégation de ces substrats pour les maintenir dans un état soluble où elles sont accessibles à la protéolyse (Tatsuta, 2009).

La membrane interne mitochondriale possède l'une des compositions en protéines les plus complexes de la cellule eucaryote, incluant notamment les différents modules de la chaine respiratoire ainsi que des transporteurs de métabolites, dont l'assemblage nécessite des protéines codées à la fois par le génome mitochondrial et le génome nucléaire. Le contrôle qualité de l'assemblage de ces complexes protéiques est composé principalement de trois métalloprotéases ayant des activités "chaperone-like" : m-AAA, i-AAA et la protéase transmembranaire Oma1 (Kaser et al., 2003). Alors que m-AAA et Oma1 ont des sites catalytiques exposés du côté matriciel de la mitochondrie, l'activité protéolytique de i-AAA est orientée vers l'espace intermembranaire. Les protéines composant les complexes m-AAA (Yta10 et Yta12 chez la levure) et i-AAA (oligomères de la protéine Yme1) possèdent trois domaines distincts : un domaine transmembranaire, un domaine AAA-ATPase, et enfin un domaine métalloprotéase permettant la protéolyse des protéines déficientes (Arlt et al., 1996; Leonhard et al., 1999). Les principaux substrats identifiés de ces protéases sont les protéines mal repliées dans la membrane interne et certains complexes protéiques présentant un assemblage défectueux, notamment les complexes de la chaine respiratoire. La reconnaissance et la dégradation de ces substrats dans l'espace intermembranaire par i-AAA nécessitent la présence de deux adaptateurs, Mgr1 et Mgr3 (Dunn et al., 2008). Le complexe m-AAA ne possède pas de cofacteurs connus, mais son activité protéolytique est régulée par les Prohibitines (complexe formé des protéines Phb1 et Phb2) : en effet, la délétion des Prohibitines chez la levure cause une dégradation accélérée des protéines mitochondriales non assemblées sous forme de complexes (Steglich et al., 1999).

Il est intéressant de remarquer que contrairement au contrôle qualité des protéines dans les autres compartiments cellulaires, les systèmes de contrôle qualité mitochondriaux sont principalement basés sur la dégradation par des métalloprotéases transmembranaires et non sur la voie ubiquitine - protéasome. Le contrôle qualité mitochondrial ressemble ainsi davantage aux mécanismes des protéobactéries qu'aux processus de contrôle qualité eucaryotes, un phénomène en accord avec les théories concernant l'origine endosymbiotique des mitochondries

(discuté dans Tatsuta, 2009). Chez les mammifères cependant, plusieurs E3 ubiquitine ligases pouvant fonctionner au niveau de la membrane mitochondriale externe ont été proposées, mais ces enzymes ne sont généralement pas conservées chez la levure, et leur activité de polyubiquitinylation est orientée vers le cytosol et non vers l'espace intermembranaire mitochondrial (Neutzner et al., 2008).

6 - Réponses cellulaires au stress traductionnel : le système UPR et la formation d'agrégats protéiques

En parallèle des mécanismes de contrôle qualité des protéines, les cellules eucaryotes possèdent également des systèmes de réponse au stress traductionnel permettant de limiter l'accumulation et l'agrégation de protéines défectueuses, qui peuvent rapidement devenir toxiques. Ces systèmes deviennent essentiels lorsque les voies de reconnaissance et de dégradation des protéines défectueuses sont saturées par une quantité trop importante de substrats, ce phénomène étant souvent causé par un stress trop rapide pour que les cellules aient le temps de mettre en place des réponses adéquates telles que la production de chaperonnes, notamment dans le cas d'un choc thermique (voir revue Tyedmers et al., 2010). La principale réponse cellulaire face à l'accumulation de protéines mal repliées au niveau du réticulum endoplasmique est la voie UPR pour "Unfolded Protein Response". De plus, les protéines défectueuses ayant une forte propension à s'agréger, l'accumulation de substrats aberrants engendre souvent l'apparition d'agrégats protéiques toxiques qui doivent être rapidement pris en charge et éliminés. C'est pourquoi il existe plusieurs chaperonnes et co-chaperonnes capables de détecter et d'éliminer ces agrégats protéiques, ainsi que des compartiments cellulaires vers lesquels ces agrégats peuvent être transportés et stockés, ce qui va permettre par la suite d'optimiser leur dégradation et de limiter leur expansion. Le destin des protéines défectueuses se résume donc à trois possibilités : repliement, dégradation, ou bien séquestration sous formes d'agrégats. Ainsi, la coopération entre processus de contrôle qualité des protéines et systèmes de réponses cellulaires au stress assure le maintien de l'homéostasie des protéines par l'élimination des protéines défectueuses, qu'elles soient solubles ou agrégées.

6.1 Le système UPR : Unfolded Protein Response

La réponse cellulaire aux protéines dénaturées est une réponse adaptative au stress traductionnel permettant de pallier à un déséquilibre entre la quantité de protéines mal repliées nouvellement synthétisées et la capacité de repliement des protéines du réticulum endoplasmique (ER). La détection d'une accumulation anormale de protéines mal repliées a lieu au niveau du réticulum endoplasmique grâce aux récepteurs de stress Ire1, Atf6 et PERK (voir revue Ron and Walter, 2007). Cependant, alors que Atf6 et PERK existent chez tous les métazoaires, seul Ire1 est conservé chez *Saccharomyces cerevisiae*, ce qui fait de cette protéine transmembranaire le principal capteur de stress permettant la mise en place de la voie UPR chez la levure (Kohno, 2010). Ces récepteurs permettent la transduction du signal de stress jusqu'au noyau, de manière à activer la transcription puis la traduction de gènes de réponse au stress tels que des chaperonnes, ce qui renforce la capacité du ER à replier les protéines, ainsi que des facteurs impliqués dans le métabolisme des lipides afin d'augmenter la taille du réticulum endoplasmique. La transduction de ce signal nécessite l'autophosphorylation de Ire1, ce qui va permettre l'épissage non conventionnel de l'ARN messager *HAC1* et ainsi la production de la protéine Hac1, qui active notamment l'expression de gènes codant pour des chaperonnes du ER (Cox and Walter, 1996).

Parallèlement, la voie UPR stimule la dégradation des protéines mal repliées par deux mécanismes distincts : la dégradation des protéines associées au ER (ERAD) d'une part (Travers et al., 2000), et l'autophagie d'autre part, processus consistant à fragmenter sous forme de vésicules des parties du ER contenant des protéines défectueuses pour les adresser aux lysosomes afin d'assurer leur élimination (Bernales et al., 2006). Chez les métazoaires, la réponse UPR peut aussi entrainer l'apoptose (mort cellulaire programmée) des cellules accumulant une trop grande quantité de protéines dénaturées.

6.2 Systèmes d'adressage et d'élimination des agrégats protéiques

L'agrégation des protéines dans une cellule survient lorsque la quantité de protéines défectueuses qui s'y accumulent dépasse la capacité cellulaire de repliement et de dégradation des protéines (voir revue Tyedmers et al., 2010). Les agrégats protéiques cellulaires ont tout d'abord été divisés en deux catégories : les

agrégats amorphes et les fibrilles amyloïdiennes. Cependant, les études ultérieures ont montré que les agrégats amorphes, tels que les corps d'inclusion bactériens, pouvaient aussi contenir des structures amyloïdiennes, par conséquent la différence entre ces deux mécanismes d'agrégation ne permet pas de distinguer les différents types d'agrégats cellulaires. En réalité, cette distinction réside davantage dans la nature des protéines agrégées, dans les différents facteurs par lesquels ces agrégats sont reconnus, ainsi que dans les compartiments vers lesquels ils sont adressés.

Chez levure *Saccharomyces cerevisiae*, les agrégats protéiques résultant d'un choc thermique se présentent sous la forme de foci de tailles très variables apparaissant à la fois dans le cytoplasme et le noyau, mais qui ne semblent pas présenter de compartimentation spécifique. Ces agrégats insolubles sont reconnus par la chaperonne Hsp104, qui en partenariat avec Ssa1 et Ydj1, déclenche la resolubilisation par le repliement correct des protéines agrégées (Parsell et al., 1994). Il a également été montré que la chaperonne Hsp42 est essentielle pour l'adressage de ces protéines mal repliées vers les agrégats pour qu'elles soient reconnues par Hsp104 (Specht et al., 2011). Ce processus de désagrégation des protéines initié par Hsp104 est une réponse rapide et immédiate face à un choc thermique, qui ne nécessite pas d'étape de séquestration des agrégats et qui souligne la réversibilité de ce type de stress traductionnel : en effet, les protéines ainsi repliées sont à nouveau fonctionnelles et n'ont donc pas besoin d'être dégradées.

Par opposition, certaines protéines qui s'agrègent ne peuvent pas être immédiatement repliées *via* Hsp104 : ceci concerne notamment les protéines endommagées suite à un stress oxydatif (Nyström, 2005), les protéines polyubiquitinylées mal adressées au protéasome (Kaganovich et al., 2008), les protéines amyloïdogéniques telles que les prions, et enfin les protéines portant des longues chaines de polyglutamines tel que l'exon 1 de la protéine Huntingtine, à l'origine de la maladie de Huntington (Krobitsch and Lindquist, 2000). Ces agrégats sont alors adressés vers des compartiments cellulaires spécifiques dans lesquels ils sont séquestrés, ce qui permet de limiter leur toxicité et d'optimiser leur élimination (voir **Figure 18**). Deux compartiments cellulaires cytoplasmiques servant de dépôts pour ces agrégats protéiques ont été identifiés : le compartiment juxtanucléaire de contrôle qualité (JUNQ) et le dépôt des protéines insolubles (IPOD) (Kaganovich et

al., 2008). Le JUNQ, compartiment de contrôle qualité adjacent à la membrane nucléaire, accueille majoritairement des protéines polyubiquitinylées partiellement agrégées, et ce de manière transitoire avant qu'elles ne soient définitivement éliminées par le protéasome. L'IPOD est situé à la périphérie de la vacuole, et stocke principalement des protéines entièrement agrégées et non ubiquitinylées. Malgré sa proximité avec la vacuole, la potentielle élimination de l'IPOD par l'autophagie reste à déterminer. La durée de stockage au sein de l'IPOD est généralement plus longue que dans le cas du JUNQ ; parmi les principaux substrats se trouvent les protéines sensibles à la carbonylation et les protéines amyloïdogéniques tels que les prions [RNQ] and [URE3] et l'exon 1 de la Huntingtine (Htt103Q) (voir revue Tyedmers et al., 2010).

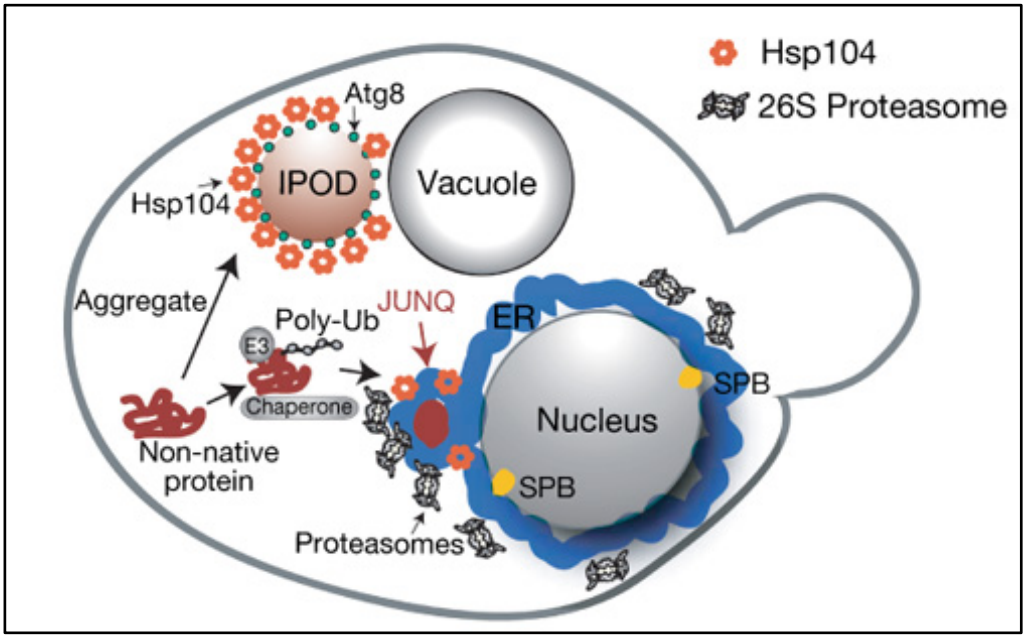


Figure 18. Compartimentation des agrégats protéiques eucaryotes
Schéma issu d'une figure de Kaganovich D. *et al.*, Nature, 2008

Malgré cette distinction entre substrats ubiquitinylés ou non, il n'y a pas de frontière stricte entre adressage vers le JUNQ ou l'IPOD. En effet, une même protéine peut être adressée vers l'un ou l'autre selon son niveau d'agrégation, et surtout selon l'état physiologique de la cellule : notamment, une inhibition du processus d'ubiquinylation par la délétion de certaines E2 ubiquitine ligases conduit à l'adressage de la majorité des agrégats vers l'IPOD, ce qui dénote une certaine coopération entre ces deux compartiments de contrôle qualité pour la séquestration

des agrégats irréversibles (Kaganovich et al., 2008). Le modèle actuel suggère que cette séquestration active permettrait de stocker provisoirement les protéines agrégées lorsque le protéasome est saturé, ce qui limiterait leur toxicité cellulaire jusqu'à ce que le protéasome soit à nouveau disponible pour procéder à leur protéolyse.

6.3 Formation et organisation de l'agrésome

Il existe également un troisième compartiment permettant la séquestration des agrégats protéiques, appelé agrésome, qui n'est pas visible en conditions physiologiques normales, mais qui se forme lors d'une inhibition du protéasome ou bien au cours de la surexpression de certaines protéines telles que CFTR, gène impliqué dans la mucoviscidose (Johnston et al., 1998). L'agrésome, localisé à la périphérie de la membrane nucléaire, contient principalement des agrégats de protéines ubiquitinylées, qui sont séquestrées grâce à la formation d'une cage de vimentine. La description de ce compartiment semble très similaire à celle du JUNQ, pourtant il s'agit bien de deux entités distinctes : en effet, seul l'agrésome est localisé à proximité du centrosome (ou spindle pole body chez la levure). L'agrésome a longtemps été considéré comme un corps d'inclusion spécifique des mammifères, jusqu'à sa découverte chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. En effet, la surexpression de l'exon 1 de la Huntingtine (Htt103Q) chez la levure peut déclencher la formation de l'agrésome (Wang et al., 2009). Les agrégats cytosoliques de protéines anormales sont reconnus par Bmh1 et transportés *via* le réseau de microtubules vers le spindle pole body, puis déposés au sein de l'agrésome où l'action coordonnée de chaperonnes et de facteurs de recrutement du protéasome permettent le repliement ou la protéolyse des protéines défectueuses agrégées (voir **Figure 19**). Parmi les facteurs présents dans l'agrésome et essentiels pour son élimination, on trouve notamment les co-chaperonnes Sis1 et Sgt2, associées à de nombreuses chaperonnes telles que Ssa1/2, Hsp82, Hsp60 et Hsp42. On trouve également le facteur de recrutement du protéasome Dsk2, qui possède un domaine UbL en N-terminal, lui permettant de s'associer physiquement avec le protéasome, ainsi qu'un domaine UBA en C-terminal, capable de reconnaitre les chaines de polyubiquitine : ce facteur fonctionne ainsi comme un adaptateur entre le protéasome et des substrats à dégrader pour faciliter leur protéolyse (Funakoshi et al., 2002). Lorsque Dsk2 est associé à l'agrésome, il permet le recrutement du protéasome à la

périphérie de l'agrésome de manière à éliminer les protéines polyubiquitinylées qui y sont séquestrées (voir **Figure 19**) (Kawaguchi et al., 2003; Wang et al., 2009).

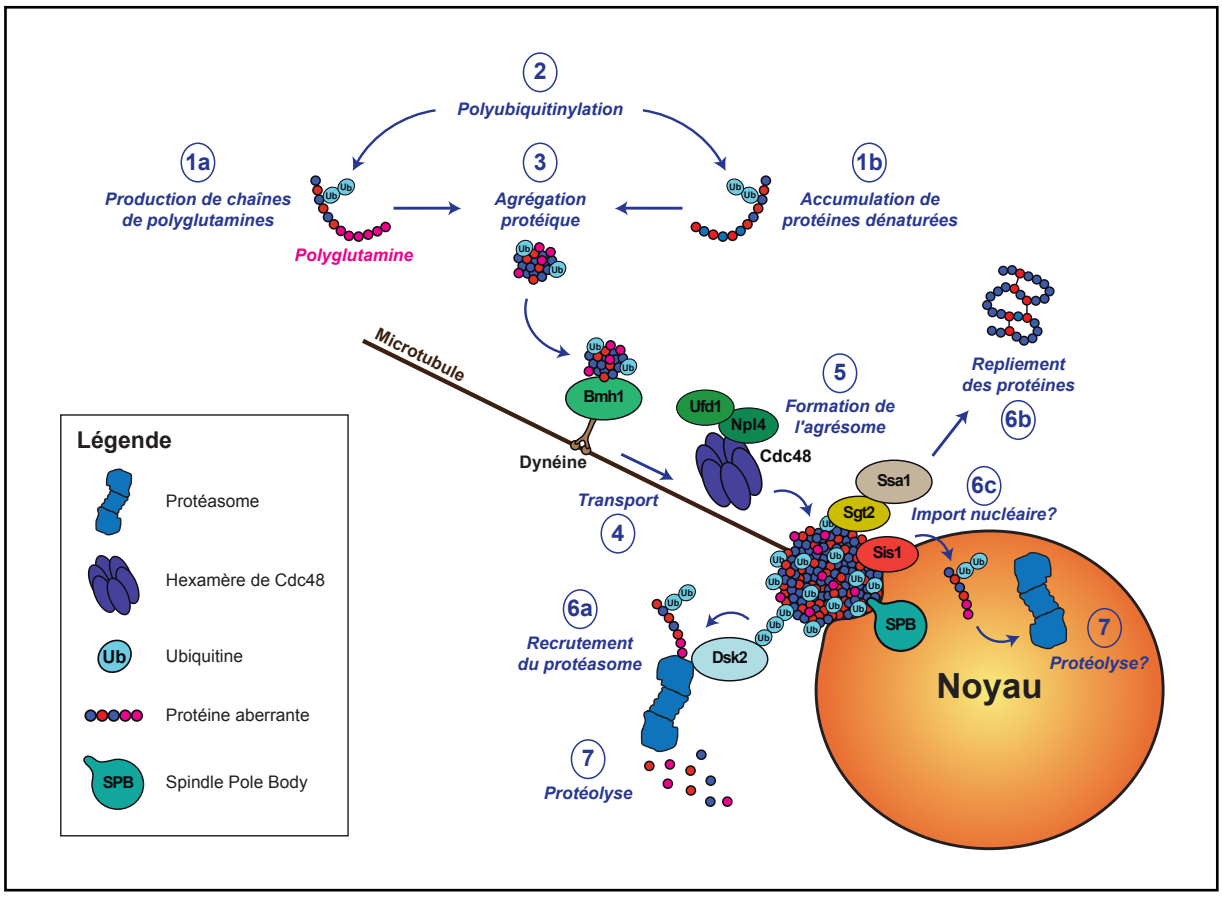


Figure 19. Formation et élimination de l'agrésome chez *S. cerevisiae*
L'accumulation de protéines contenant des chaînes de polyglutamines (1a) ou dénaturées (1b) conduit à leur polyubiquitinylation par des E3 ubiquitin ligases spécifiques (2), puis à leur agrégation sous formes d'agrégats cytosoliques (3). Ces agrégats sont reconnus par Bmh1, qui utilise le réseau de microtubules pour les transporter jusqu'à proximité du Spindle Pole Body (4). C'est alors qu'a lieu la formation de l'agrésome de manière dépendante de Cdc48-Ufd1-Npl4 (5), ce qui permet l'association de Dsk2 qui va recruter le protéasome (6a) pour éliminer les protéines agrégées (7), ainsi que des co-chaperonnes Sis1 et Sgt2, qui par interaction avec des Hsp70, permettent le repliement des protéines (6b). Enfin, compte tenu de la fonction de Sis1 dans l'import nucléaire des protéines aberrantes (voir paragraphe **5.2**), il est possible qu'une fraction soit importée vers le noyau (6c) puis dégradée par le protéasome nucléaire (7).
Réalisé à partir des données de (Wang et al., 2009).

Chez les mammifères, la déacétylase HDAC6 joue un rôle prépondérant dans la régulation de la formation de l'agrésome : en effet, HDAC6 peut interagir à la fois avec les dynéines (moteurs associés aux microtubules) et les protéines dénaturées

et polyubiquitinylées, ce qui lui permet de transporter ces substrats jusqu'à l'agrésome pour qu'ils soient séquestrés et éliminés. Les cellules mammifères déficientes pour HDAC6 ne sont pas capables de former correctement l'agrésome, et accumulent dans le cytoplasme des agrégats protéiques qui ne sont pas efficacement dégradés (Kawaguchi et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré chez la levure que l'ATPase Cdc48 pouvait s'accumuler dans l'agrésome en cas de stress, et que ce facteur, en partenariat avec ses co-facteurs Npl4 et Ufd1, était important pour la formation de l'agrésome à partir d'agrégats cytosoliques (Wang et al., 2009). Enfin, l'expression chez *Saccharomyces cerevisiae* de certaines protéines aberrantes portant des polyglutamines provoque la séquestration de la co-chaperonne Sis1 sous forme d'agrégats de protéines aberrantes, ce qui induit un stress protéotoxique car Sis1 est essentielle pour l'import des protéines polyubiquitinylées vers le noyau afin d'assurer leur dégradation par le protéasome nucléaire (Park et al., 2013). L'accumulation de protéines portant des polyglutamines (polyQ) est donc toxique chez tous les eucaryotes, de par leur propensité à former des agrégats qui sont adressés soit vers l'IPOD, soit vers l'agrésome. Cependant, l'élimination de ces protéines aberrantes n'est pas limitée à l'activité du protéasome : en effet, il a été récemment montré que l'autophagie ubiquitine-dépendante joue un rôle essentiel dans l'élimination des agrégats de polyQ. Ces agrégats sont adressés aux autophagosomes par des adaptateurs spécifiques tels que Atg8 et Cue5, qui en partenariat avec l'E3 ubiquitine ligase Rsp5 assurent leur élimination par le processus d'autophagie (adressage aux lysosomes), ce qui permet de limiter leur toxicité cellulaire (Lu et al., 2014).

Alors que les premières observations d'agrégats protéiques cellulaires par microscopie électronique laissaient à penser que l'agrégation était une conséquence incontrôlée d'un stress protéotoxique, la découverte et la caractérisation des compartiments de séquestration des agrégats ont montré que l'agrégation et la séquestration des protéines sont en réalité des réponses cellulaires très organisées qui permettent d'une part d'éviter l'accumulation de protéines défectueuses dans le cytoplasme, et d'autre part de les éliminer progressivement en coopération avec le protéasome et les autophagosomes/lysosomes.

7 - Pathologies liées aux mécanismes de contrôle qualité et à l'accumulation d'agrégats protéiques

7.1 Pathologies causées par l'accumulation d'agrégats protéiques

De nombreuses maladies humaines sont causées par la formation d'agrégats protéiques cellulaires qui s'accumulent en raison d'une déficience dans les systèmes de contrôle qualité des protéines. Parmi ces pathologies, on trouve de nombreuses maladies neurodégénératives : en effet, ce type de pathologies affectant le fonctionnement du cerveau ou du système nerveux a souvent pour origine une accumulation neuronale d'agrégats protéiques qui ne sont pas efficacement éliminés par les systèmes de contrôle qualité des protéines et provoquent une toxicité cellulaire (voir **Figure 20** et revue Ross and Poirier, 2004). Ce déséquilibre de l'homéostasie des protéines dans les neurones peut avoir de graves conséquences, telles que des pertes de la mémoire, des démences ou une réduction de la motricité. Parmi les maladies neurodégénératives liées à l'agrégation protéique, on peut citer les démences telles que les maladies d'Alzheimer et de Creutzfeldt-Jakob, ainsi que les pathologies affectant le système nerveux central telles que les maladies de Parkinson et de Huntington ou encore la sclérose latérale amyotrophique (ALS).

La plupart de ces maladies neurodégénératives se manifestent par des agrégats protéiques dans les neurones (Ross and Poirier, 2004), cependant l'origine du phénomène d'agrégation et la composition en protéines agrégées diffèrent. La maladie d'Alzheimer apparaît suite à l'accumulation de l'amyloïde β (ou Aβ, peptides issus de la protéolyse de la protéine APP) qui s'agrège sous forme de plaques amyloïdes dans les neurones (voir **Figure 20**), ce qui entraîne l'agrégation d'autres molécules d'amyloïde β ainsi que de la forme hyperphosphorylée de la protéine Tau (voir revue Selkoe, 2001). La maladie de Huntington est causée par un nombre de répétitions CAG (codon Glutamine) anormalement élevé dans le gène codant pour la Huntingtine, or l'accumulation de protéines portant des longues chaines de polyglutamines provoque la formation d'agrégats qui peuvent être toxiques pour les cellules (Trottier et al., 1995). La maladie de Creutzfeldt-Jakob est causée par la propagation de la forme anormale PrP(Sc) de la protéine prion PrP(C), qui présente une conformation alternative lui permettant de s'agréger pour former des fibrilles amyloïdiennes à l'origine d'une dégénérescence du système nerveux central qui se

manifeste par des troubles de l'équilibre, une démence progressive et se termine par le décès de l'individu contaminé (Prusiner et al., 1983). Il existe également de multiples prions de levure qui peuvent former des agrégats amyloïdiens et ainsi causer une toxicité cellulaire, mais les protéines ciblées (Ure2, Rnq1, eRF3...) ne sont pas liées fonctionnellement à la protéine mammifère PrP(C). D'autres maladies humaines, comme les amyloïdoses, sont également provoquées par l'accumulation de protéines mal repliées sous forme de fibres amyloïdes.

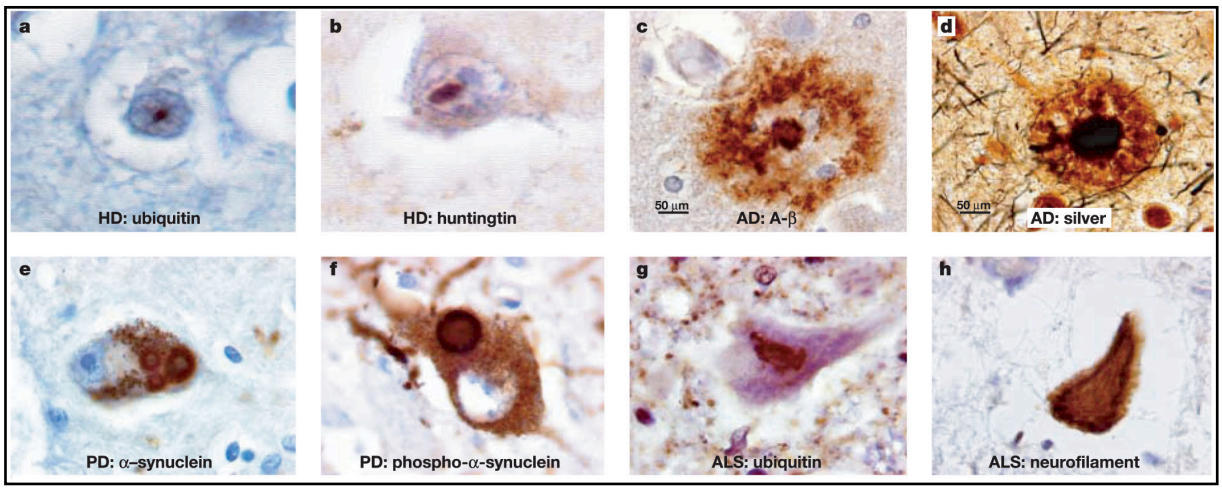


Figure 20. Agrégats protéiques à l'origine de maladies neurodégénératives

Les corps d'inclusion sont tous détectés par des anticorps sauf pour (d).
(a, b) Maladie de Huntington, agrégats révélés avec des αUbiquitine et αHuntingtine
(c, d) Maladie d'Alzheimer, révélés avec des anticorps αAβ ou au nitrate d'argent
(e, f) Maladie de Parkinson, corps de Lewy révélés avec anticorps αSynucléine
(g, h) Sclérose latérale amyotrophique, révélés avec αUbiquitine et αNeurofilaments
Figure issue de (Ross and Poirier, 2004) © 2004 Nature Publishing Group

L'accumulation d'agrégats protéiques a également été observée chez le mutant *lister/lister* (orthologue de l'E3 ubiquitine ligase Ltn1 chez la souris), et la caractérisation de ce mutant a révélé un phénotype de neurodégénération proche de celui observé dans le cas de la maladie de Parkinson : troubles de l'équilibre, perte progressive de la motricité et enfin perte totale de mobilité (Chu et al., 2009). Cette étude a une importance particulière dans le rapprochement entre recherche fondamentale et recherche clinique, car elle a permis d'établir un lien direct entre une déficience d'un système de contrôle qualité des protéines, dans ce cas le complexe RQC, l'apparition d'agrégats protéiques dans des neurones de mammifères, et des symptômes similaires à ceux observés chez les patients atteints de maladies

neurodégénératives telles que Parkinson. Par ailleurs, nous avons pu voir au cours de cette introduction que la protéine Cdc48/p97 intervient dans une multitude de mécanismes de contrôle qualité et de dégradation des protéines : contrôle qualité de la traduction *via* le complexe RQC, contrôle qualité nucléaire des protéines, dégradation des protéines associées au ER, ou encore formation de l'agrésome (voir revue Meyer and Weihl, 2014). Or, il a été montré que plusieurs familles atteintes de maladies telles que la myopathie à corps d'inclusion, la maladie osseuse de Paget, ou encore la démence frontotemporale, portaient des mutations autosomales dominantes dans le gène codant pour la protéine Cdc48/p97, ce qui souligne l'importance de ce facteur dans l'élimination des protéines défectueuses et ainsi le bon fonctionnement des cellules neuronales ou osseuses (Schröder et al., 2005; Kimonis et al., 2008). Au niveau cellulaire, ces mutations humaines provoquent généralement l'accumulation de corps d'inclusion nucléaires, ou bien d'agrégats cytosoliques riches en ubiquitine (Weihl et al., 2009). Ces maladies peuvent également provenir de mutations affectant des adaptateurs essentiels pour l'adressage de substrats aberrants aux autophagosomes tels que SQSTM1 (séquestosome), dont le dysfonctionnement peut également être à l'origine de la sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Rubino et al., 2012). Par conséquent, des déficiences du processus d'autophagie régulé par Cdc48/p97 peuvent aussi être à l'origine de certaines de ces pathologies.

7.2 Maladies liées à des défauts de contrôle qualité des ARN

Certaines maladies peuvent également survenir suite à des déficiences liées à la dégradation des ARN messagers, ou bien aux mécanismes de contrôle qualité des ARN comme le NonSense Mediated mRNA Decay (NMD). En effet, le NMD est connu pour avoir un rôle protecteur lors de l'apparition d'une mutation non-sens dans l'un des deux allèles d'un gène, par la dégradation des ARNm issus de l'allèle muté contenant un codon STOP précoce (PTC), potentiellement délétères car les protéines synthétisées à partir de ces derniers sont tronquées et donc souvent non fonctionnelles. Ce caractère protecteur du NMD a été notamment prouvé dans le cas de la thalassémie β, où les individus hétérozygotes possédant un PTC dans une des copies du gène de la β-globine produisent uniquement des tétramères d'hémoglobine fonctionnels car le NMD dégrade les ARNm issus de l'allèle muté (voir revue Holbrook et al., 2004). Cependant, si le PTC est situé très proche du codon STOP

canonique, les ARNm aberrants ne peuvent pas être efficacement reconnus par le NMD (qui nécessite au moins 50 à 55 nucléotides entre les deux codons STOP), et les β-globines tronquées s'agrègent sous la forme de corps d'inclusion toxiques (Thein et al., 1990). Il a par ailleurs été montré que le NMD pouvait éliminer les allèles de certains gènes suppresseurs de tumeurs portant des PTC et ainsi éviter l'apparition de cancers. Parmi les cibles du NMD les mieux caractérisées, on trouve notamment les allèles portant une mutation non-sens dans le gène *BRCA1*, impliqué dans la suppression du cancer du sein (Perrin-Vidoz et al., 2002).

Des mutations dans certains facteurs de dégradation des ARN messagers cytoplasmiques peuvent également avoir des effets délélères chez l'humain. Par exemple, le séquençage de l'exome d'une fratrie atteinte d'hypoplasie cérébelleuse de type 1 (maladie affectant les motoneurones qui se traduit par une atrophie du cervelet, une microcéphalie progressive, et un retard du développement) a révélé des mutations récessives dans le gène *EXOSC3*, un composant essentiel de la version humaine de l'exosome, nécessaire à la dégradation exonucléolytique du 3' vers le 5' (Wan et al., 2012). Par ailleurs, le syndrome tricho-hépato-entérique, maladie infantile qui se manifeste par des diarrhées permanentes, des déformations faciales, une fragilité capillaire et qui entraine souvent des maladies hépatiques, avait été associé à des mutations dans le gène humain *TTC37*, de fonction inconnue. Récemment, une équipe de médecins a étudié 6 enfants atteints de ce syndrome mais qui ne présentaient aucune mutation dans *TTC37* : ayant remarqué que *TTC37* est en réalité l'orthologue humain du gène *SKI3* chez *Saccharomyces cerevisiae*, composant essentiel du complexe SKI, les médecins ont alors séquencé chez ces enfants l'orthologue humain d'un autre partenaire du complexe SKI, *SKIV2L* (*SKI2*). C'est alors qu'ils ont découvert que tous les enfants étudiés possédaient des mutations de type non-sens ou frameshift dans chacun des deux allèles du gène *SKIV2L* : 7 mutations différentes au total, plus une mutation faux-sens localisée dans le domaine hélicase ATP-binding de la protéine SkiV2L (Fabre et al., 2012). Etant donné que les enfants atteints de ce syndrome ne survivent pas plus de 5 ans et décèdent suite à des cirrhoses ou des infections, on peut appréhender l'importance de la fonctionnalité du complexe SKI, et donc des mécanismes cytoplasmiques de dégradation et de contrôle qualité des ARN messagers, pour le bon fonctionnement des cellules et des organismes eucaryotes.

7.3 Le protéasome et Cdc48/p97, cibles thérapeutiques contre le cancer

Le processus de dégradation des protéines aberrantes par Cdc48/p97 et la voie ubiquitine - protéasome fait aujourd'hui l'objet d'un intérêt médical majeur pour le traitement de certains cancers (voir revue Deshaies, 2014). En effet, les cellules cancéreuses en cours de prolifération étant souvent hypermétaboliques, la synthèse d'une quantité de protéines supérieure à la normale nécessite un système de protéolyse particulièrement efficace pour éviter une accumulation excessive de protéines pouvant causer des agrégats toxiques. De plus, les altérations génétiques fréquemment portées par les cellules cancéreuses pourraient les rendre plus dépendantes des systèmes de contrôle qualité de l'expression des gènes. C'est la raison pour laquelle les inhibiteurs du protéasome ont fait l'objet de nombreuses études cliniques ces dix dernières années, ce qui a amené à la commercialisation récente de plusieurs d'entre eux, dont le Bortézomib, le Carfilzomib et le Marizomib (voir **Figure 21**), utilisés pour traiter certains cancers tels que le myélome multiple et les lymphomes non Hodgkiniens (Hideshima et al., 2005). Une des explications avancées pour l'hypersensibilité des cellules cancéreuses du myélome multiple à ces inhibiteurs du protéasome, est le fait que ces cellules ont un seuil de déclenchement de la réponse UPR inférieur à celui des cellules normales : par conséquent, une inhibition modérée du protéasome dans ces cellules cancéreuses peut déclencher la réponse UPR et donc l'apoptose, alors que les cellules non cancéreuses ne sont que faiblement affectées (Obeng et al., 2006).

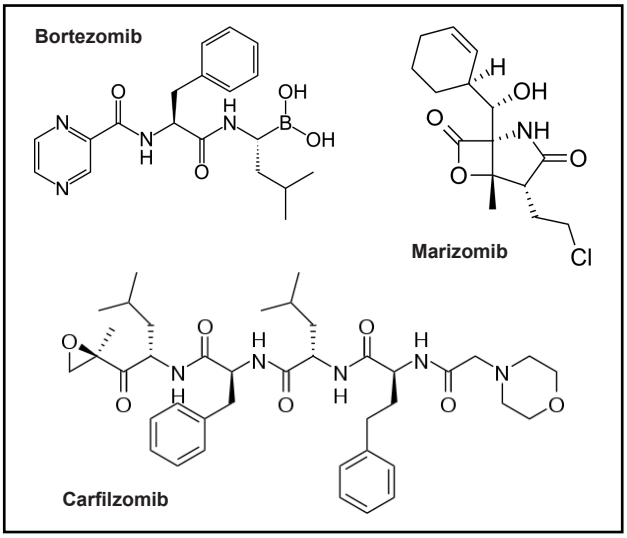


Figure 21. Inhibiteurs sélectifs du protéasome utilisés en cancérothérapie
N° d'identification des composants (CID) : 387447, 11347535 et 11556711

Le développement d'inhibiteurs spécifiques de l'ATPase Cdc48/p97 a permis d'étudier l'effet de la déplétion de p97 dans des cellules cancéreuses par rapport à des cellules humaines saines. Il a ainsi été montré que les cellules cancéreuses HeLa, HCT116 et U2OS activent plus rapidement la réponse caspase et donc l'apoptose après déplétion de p97, ce qui montre leur sensibilité à l'absence de p97 par rapport aux cellules saines (Magnaghi et al., 2013). Ceci suggère que l'inhibition de Cdc48/p97, et donc des processus de contrôle qualité des protéines dans lesquels cette ATPase est impliquée, pourrait également être cytotoxique pour les cellules cancéreuses et ainsi utilisée en cancérothérapie. Plusieurs molécules dérivées du DBeQ, dont le ML240, le ML241 et le CB-5083 (voir **Figure 22**), développées par Cleave Biosciences, sont actuellement en phase I d'essais cliniques humains chez pour le traitement du myélome multiple et de tumeurs solides (voir revue Deshaies, 2014).

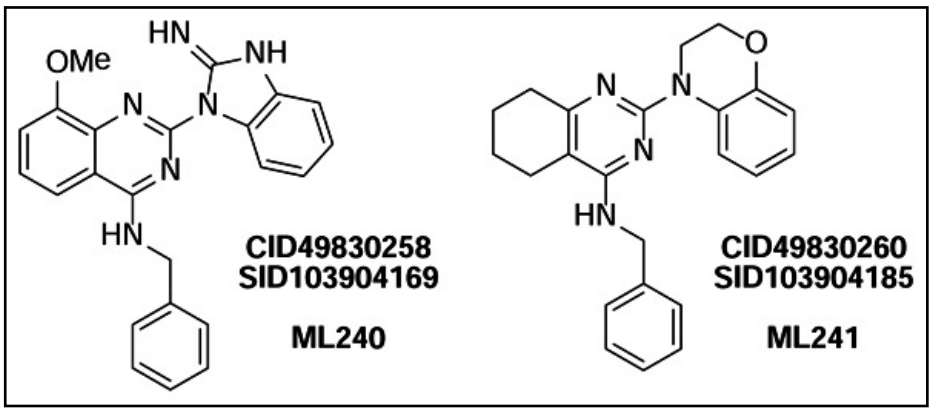


Figure 22. Inhibiteurs sélectifs de l'ATPase p97 en phase I d'essais cliniques
Note : la formule chimique du CB-5083 n'est pas disponible car elle est brevetée.

Au cours de cette introduction, nous avons pu appréhender l'importance des mécanismes de contrôle qualité des produits de l'expression des gènes, particulièrement en cas de stress affectant l'homéostasie des ARN et des protéines. La plupart des gènes codant pour des facteurs impliqués dans ces systèmes sont conservés chez tous les eucaryotes, de la levure *Saccharomyces cerevisiae* jusqu'à l'Homme, ce qui dénote une forte sélection de ces processus de contrôle qualité au cours de l'évolution. Pour les celulles et les organismes eucaryotes, la production d'ARN messagers et de protéines en quantités suffisantes n'est donc pas une fin en soi : il faut également maintenir une qualité optimale des biomolécules synthétisées pour assurer l'homéostasie des protéines et ainsi éviter l'apparition d'agrégats qui s'avèrent être toxiques. D'un point de vue médical, le contrôle qualité des protéines est un domaine d'intérêt majeur, d'une part car des déficiences de ce mécanisme peuvent entraîner de nombreuses maladies neurodégénératives, et d'autre part car il constitue une cible de premier ordre en cancérothérapie.

RÉSULTATS

RESULTATS

Mon travail de thèse a commencé par la caractérisation de deux nouveaux facteurs, Rqc1 et Rqc2, ce qui a mené à la découverte d'un nouveau complexe, appelé complexe RQC, composé de Rqc1, Rqc2, Ltn1 et Cdc48, et impliqué dans la reconnaissance et la dégradation des protéines aberrantes "Non-Stop". Cette première partie a fait l'objet d'une publication dans la revue *PNAS* en 2013 (présentée ci-dessous dans la **Partie 1**).

Par la suite, j'ai poursuivi l'analyse fonctionnelle du complexe RQC, et ainsi découvert que ce complexe participe à l'escorte des peptides aberrants au protéasome après leur extraction de la 60S bloquée (**Partie 2**), et que Rqc1 a un rôle important dans la prévention de l'agrégation de ces produits aberrants de la traduction. De plus, j'ai identifié deux autres facteurs, Tom1 et Dsk2, qui deviennent importants pour l'élimination des protéines aberrantes lorsque certains composants du RQC (notamment Rqc1 et Cdc48) sont déplétés ou déficients. Cette deuxième étude fait à présent l'objet d'un manuscrit soumis à la revue *Molecular Cell* pour publication (présenté en **Partie 3**).

En parallèle de cette étude fonctionnelle du complexe RQC, nous avons établi une collaboration avec le laboratoire de Roland Beckmann, spécialisé en cryo-microscopie électronique, dont le but était de résoudre la structure du complexe RQC en interaction avec la particule 60S bloquée. Bien que ce projet ait été abandonné suite aux multiples publications concernant cette structure RQC-60S (Lyumkis et al., 2014; Shao et al., 2015; Shen et al., 2015), les résultats de cryo-EM et de crosslinks que nous avons obtenus sont présentés dans la **Partie 4**.

Enfin, j'ai participé à un autre projet initié par les laboratoires de Roland Beckmann et d'Elena Conti, qui porte sur la caractérisation structurale par cryo-EM du complexe SKI associé aux ribosomes bloqués après traduction d'un ARNm aberrant Non-Stop *in vitro*. Ma contribution a été de valider que cette interaction entre le complexe SKI et les ribosomes bloqués sur un ARNm "Non-Stop" pouvait avoir lieu *in vivo*, j'ai pour cela réalisé plusieurs purifications sur gradient de sucrose dont les résultats sont présentés en **Partie 5**. Les résultats de ce projet font l'objet d'un manuscrit en cours de soumission à la revue *Nature* (Schmidt C. *et al.*, 2015).

1 - Découverte et caractérisation du complexe RQC

Lorsque nous avons commencé à travailler sur les mécanismes de contrôle qualité de la traduction en 2010, les voies de dégradation des ARN messagers aberrants Non-Stop et No-Go par le complexe SKI, Ski7 et l'exosome cytoplasmique avaient déjà été caractérisées (Hoof et al., 2002; Doma and Parker, 2006), et le rôle de l'E3 ubiquitine ligase Ltn1 et du protéasome dans la dégradation des peptides naissants aberrants synthétisés à partir de ces transcrits venait juste d'être publié (Bengtson and Joazeiro, 2010). Cependant, l'existence des partenaires de Ltn1 (Rqc1, Rqc2 et Cdc48-Ufd1-Npl4), formant ensemble le complexe RQC, demeurait totalement inconnue. Notre étude a commencé par la réalisation de cribles génétiques GIM (Genetic Interaction Mapping) permettant de mettre en évidence des interactions synthétiques létales ou "malades" entre un mutant de délétion d'un gène cible et une collection systématique de mutants de délétion couvrant le génome de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Decourty et al., 2008). En utilisant des délétions des gènes *SKI2* et *SKI3*, sous-unités du complexe SKI, comme appâts pour effectuer des cribles génétiques, nous avons découvert une forte interaction fonctionnelle entre ces mutants du complexe SKI et les mutants de 4 gènes : *LTN1*, *RQC1*, *RQC2* (nommé *TAE2* dans cet article) et *VMS1*. Les cribles génétiques effectués en utilisant ces 4 mutants comme appâts ont confirmé cette interaction fonctionnelle (**Figure 1** de l'article Defenouillère *et al.*, PNAS, 2013, disponible ci-dessous), et des purifications biochimiques nous ont permis de mettre en évidence l'existence d'un complexe composé de Ltn1, Rqc1, Rqc2/Tae2, ainsi que Cdc48-Ufd1-Npl4, associé à la particule 60S bloquée (**Figure 2**). Une étude parallèle réalisé par le laboratoire de Jonathan Weissman a également identifié ce complexe, qu'ils ont appelé "complexe RQC" pour Ribosome-bound Quality Control (Brandman et al., 2012).

Une analyse fonctionnelle des facteurs composant le complexe RQC, par l'analyse de l'accumulation de gènes rapporteurs "Non-Stop", nous a permis de montrer que ce complexe était essentiel pour le processus de dégradation des peptides naissants aberrants, alors qu'il n'avait aucun effet sur la stabilité des ARN messagers associés (**Figures 5** et **S3**). Enfin, des purifications biochimiques en absence de facteurs du complexe RQC, ainsi que l'étude du profil de sédimentation d'un rapporteur aberrant dans un gradient de polysomes, nous ont permis de caractériser une partie du mécanisme d'action du complexe RQC : après dissociation

du ribosome bloqué par Dom34-Hbs1 et Rli1, les 60S bloquées contenant un peptidyl-ARNt sont reconnues par Ltn1, Rqc1 et Rqc2/Tae2, ce qui entraîne la polyubiquitinylation du peptide naissant par Ltn1. Ltn1 et Rqc1 sont essentiels pour le recrutement de Cdc48 et de ses co-facteurs Ufd1 et Npl4, qui permet alors l'extraction du peptide naissant aberrant du tunnel de sortie de la 60S et l'adresse au protéasome pour qu'il soit dégradé (**Figures 3** et **6**).

Cdc48-associated complex bound to 60S particles is required for the clearance of aberrant translation products

Quentin Defenouillère[1], Yanhua Yao[1,2], John Mouaikel, Abdelkader Namane, Aurélie Galopier, Laurence Decourty, Antonia Doyen, Christophe Malabat, Cosmin Saveanu, Alain Jacquier[3], and Micheline Fromont-Racine[3]

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

Edited by Michael Rosbash, Howard Hughes Medical Institute, Brandeis University, Waltham, MA, and approved February 15, 2013 (received for review December 14, 2012)

Ribosome stalling on eukaryotic mRNAs triggers cotranslational RNA and protein degradation through conserved mechanisms. For example, mRNAs lacking a stop codon are degraded by the exosome in association with its cofactor, the SKI complex, whereas the corresponding aberrant nascent polypeptides are ubiquitinated by the E3 ligases Ltn1 and Not4 and become proteasome substrates. How translation arrest is linked with polypeptide degradation is still unclear. Genetic screens with *SKI* and *LTN1* mutants allowed us to identify translation-associated element 2 (Tae2) and ribosome quality control 1 (Rqc1), two factors that we found associated, together with Ltn1 and the AAA-ATPase Cdc48, to 60S ribosomal subunits. Translation-associated element 2 (Tae2), Rqc1, and Cdc48 were all required for degradation of polypeptides synthesized from *Non-Stop* mRNAs (Non-Stop protein decay; NSPD). Both Ltn1 and Rqc1 were essential for the recruitment of Cdc48 to 60S particles. Polysome gradient analyses of mutant strains revealed unique intermediates of this pathway, showing that the polyubiquitination of Non-Stop peptides is a progressive process. We propose that ubiquitination of the nascent peptide starts on the 80S and continues on the 60S, on which Cdc48 is recruited to escort the substrate for proteasomal degradation.

quality control | *Saccharomyces cerevisiae*

Cytoplasmic quality control mechanisms prevent the accumulation of potentially toxic translation products by recognition and elimination of nonconforming mRNAs and their associated nascent peptides stalled on ribosomes. Three quality control pathways are known, each targeting a specific type of aberrant mRNA: NonSense-Mediated mRNA Decay (NMD) (1), Non-Stop mRNA Decay (NSD) (2, 3), and NoGo mRNA Decay (NGD) (4), eliminating transcripts with a premature termination codon, lacking a STOP codon, or carrying an element causing translational arrest, respectively.

NSD constitutes an important quality control process especially in the case of the $[PSI]^+$ prion state, a physiological context that promotes stop codon readthrough, thus generating extended proteins (5). Furthermore, NSD substrates can also result from transcription termination at cryptic polyadenylation [poly(A)] sites located in the coding region of the mRNA. A global map of poly(A) sites recently generated by direct RNA sequencing revealed that many cryptic poly(A) sites exist in yeast as well as in the human genome (6).

It has been shown that ribosome stalling and NGD can be induced by the synthesis of highly positively charged amino acid sequences, such as a polyarginine or polylysine stretches. The positive charges of these basic tracts would electrostatically interact with the negative charges within the exit tunnel (7), resulting in ribosome stalling and translation arrest. Such a polybasic tract can arise from the translation of a poly(A) tail into polylysine, which occurs during translation of a *Non-Stop* mRNA (8). Hence, the boundary between these two quality control pathways remains unclear (9). NSD and NGD would both be activated by a stalled ribosome with an empty A site recognized by Dom34/Hbs1, homologs proteins of the eRF1/eRF3 translation termination heterodimer, which triggers ribosome dissociation and peptidyl-tRNA release (10). In *Saccharomyces cerevisiae*, Ski7 protein, another homolog of the release factor eRF3, can also trigger NSD (2, 3). In the case of NGD, a yet unknown endonuclease cleaves the aberrant mRNA. The 5′ cleavage product is degraded upon binding of the SKI complex and the exosome whereas the 3′ fragment is degraded by Xrn1 (4). It was recently proposed that, in the case of NSD, an endonucleolytic cleavage also occurs, upstream of the ribosome stalled at the poly(A) tail (11). In addition, in both NGD and NSD, the nascent peptide is targeted to the proteasome and rapidly degraded. In the case of ribosome stalling induced by the synthesis of consecutive basic amino acid residues, the E3 ubiquitin ligase Not4 was shown to be required for the rapid degradation of the nascent peptide (12), whereas the E3 ligase Ltn1 was found to be required for the ubiquitination and proteasomal degradation of the aberrant peptide synthesized from a *Non-Stop* mRNA (13).

Therefore, during NGD and NSD, the degradation processes of the aberrant mRNA and of the associated nascent peptide are coupled. The absence of the SKI complex combined with the deletion of *LTN1* results in synthetic slow growth (13), showing that a combination of mutations in both Non-Stop mRNA decay and aberrant nascent peptide degradation is detrimental to the cell.

In many cases, such as in endoplasmic-reticulum–associated protein degradation (ERAD), the AAA-ATPase Cdc48 recognizes polyubiquitinated proteins and is required for their efficient targeting to the proteasome (14, 15). The binding of Cdc48 to specific targets is determined by its physical interaction with a large number of cofactors. Here we identified two factors, translation-associated element 2 (Tae2) and ribosome quality control 1 (Rqc1), which, together with Ltn1 and Cdc48, form a complex associated to the 60S and required for the degradation of nascent peptides synthesized from aberrant *Non-Stop* mRNAs. We also show that ubiquitination of the nascent peptides starts on the stalled 80S ribosome and continues on the 60S after ribosomal dissociation.

Author contributions: Q.D., J.M., C.S., A.J., and M.F.-R. designed research; Q.D., Y.Y., J.M., A.N., A.G., L.D., A.D., C.S., and M.F.-R. performed research; C.M. contributed new reagents/analytic tools; Q.D., Y.Y., J.M., A.N., A.G., C.S., A.J., and M.F.-R. analyzed data; and Q.D., J.M., A.J., and M.F.-R. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

[1]Q.D. and Y.Y. contributed equally to this work.

[2]Present address: Department of Biochemistry, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461.

[3]To whom correspondence may be addressed. E-mail: jacquier@pasteur.fr or mfromont@pasteur.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1221724110/-/DCSupplemental.

Results

New Set of Proteins Functionally Linked to the SKI Complex. To identify additional factors involved in the recognition and degradation of aberrant mRNAs or associated nascent peptides, we performed genetic screens, using the genetic interaction mapping (GIM) strategy (16) with mutants of the SKI complex (*ski2*Δ, *ski3*Δ, and *ski8*Δ) and with *ltn1*Δ. GIM genome-wide genetic screens enable the identification of functional interactions, whether synthetic lethal, synthetic slow growth, or epistatic, by combining a query mutation with a collection of mutant strains: either complete gene deletions (17) or DamP mutants for essential genes (18). Among the 20 mutants having the strongest growth defect when combined with gene deletions of the SKI complex, we identified four gene deletions that were common in all of the screens: *ltn1*Δ, *vms1*Δ, *ypl009c*Δ (*tae2*Δ), and *ydr333c*Δ (*rqc1*Δ) (Dataset S1). These candidates were also selected in GIM screens performed with *ski7*Δ (Fig. S1). Fig. 1*A* illustrates the overlap of genetic interactions between *ski2*Δ and *ski3*Δ. The genetic interactions between the SKI complex and the E3-Ubiquitin ligase Ltn1 confirmed the synthetic slow-growth phenotype reported earlier (13). Vms1 binds Cdc48 and is involved in diverse cellular functions, such as mitochondrial protein turnover (19), ERAD (20), or Cdc13 degradation (21). The deletion of the dubious ORF *YDR048C* was marked *vms1*Δ* because its deletion overlaps with *VMS1* and thus constitutes an independent mutation for this gene. *YPL009C* was named *TAE2*, following the identification of this gene deletion in a screen as conferring sensitivity to cycloheximide, a translation inhibitor (22). *YDR333C* has been recently named *RQC1* (23). Remarkably, the GIM screen performed with *ltn1*Δ selected the four mutants of the SKI complex (*ski2*Δ, *ski3*Δ, *ski8*Δ, and *ski7*Δ) (Fig. 1*B*).

In the course of this study, we further investigated the cellular role of the two factors Tae2 and Rqc1, which could explain the functional links with the SKI complex. First, we confirmed the functional interactions between *TAE2* and *RQC1* and the SKI complex by GIM screens with *tae2*Δ and *rqc1*Δ. Similarly to the *ltn1*Δ screen, the *ski2*Δ, *ski3*Δ, *ski7*Δ, and *ski8*Δ mutants exhibited the strongest growth defects in association with *tae2*Δ or *rqc1*Δ, demonstrating the reciprocity and the specificity of the functional interactions between *TAE2*, *RQC1*, *LTN1*, and the SKI complex (Fig. 1 *C* and *D* and Fig. S1).

We next validated the functional links between the *SKI* genes and *TAE2* or *RQC1* by testing the growth of deletion mutant strains on rich medium plates, including *ltn1*Δ mutant strains as a control. Surprisingly, the growth of single- or double-mutant strains was not significantly affected in these conditions (Fig. 1*E*). Bengtson and Joazeiro also observed that the deletion of *LTN1* had no obvious phenotype on rich medium plates, but demonstrated the hypersensitivity of the *ltn1*Δ strain to hygromycin B, an antibiotic that decreases translation fidelity and causes stop codon readthrough (13). This observation prompted us to test the viability of the single- and double-mutant strains in the presence of hygromycin B. The growth of each single-mutant strain *ltn1*Δ, *ski2*Δ, or *tae2*Δ was weakly affected but a stronger growth phenotype was observed for *rqc1*Δ. Interestingly, the double-deletion strains were clearly more sensitive to hygromycin B compared with the corresponding simple mutant strains. The *ski2*Δ mutant exhibited a synthetic slow growth defect in combination with *tae2*Δ and *ltn1*Δ and a synthetic lethal effect in combination with *rqc1*Δ (Fig. 1*E*). These growth defects correlated with those observed under competitive growth in the GIM screens, which are performed in the presence of G418 and nourseothricin (Fig. 1 *A*–*D* and Fig. S1).

Tae2, Rqc1, Ltn1, and Cdc48 Are Bound to the Same 60S Ribosomal Subunits. The overlap of genetic interaction patterns between *TAE2*, *RQC1*, and *LTN1* suggested that these factors could be involved in similar biological processes. Because the deletion of any of these genes caused sensitivity to translation-affecting antibiotics such as hygromycin B and cycloheximide (24), and because it has been shown that Ltn1 binds 60S ribosomal particles and is involved in translational quality control (13), we suspected that Tae2 and Rqc1 could be involved in a translation-associated pathway. We therefore analyzed the localization of Tae2 and Rqc1 in a polysome gradient to see whether they also cosedimented with the 60S ribosomal particles. We used strains expressing TAP-tagged versions of Tae2, Rqc1, and Ltn1 to monitor the sedimentation of each of these factors in a polysome gradient (Fig. 2*A*). We observed that Tae2, Rqc1, and Ltn1 were localized in the same fractions as Nog1, a pre60S-binding-specific factor here used as a marker for 60S-containing fractions, suggesting that all these factors are associated with 60S ribosomal subunits (25).

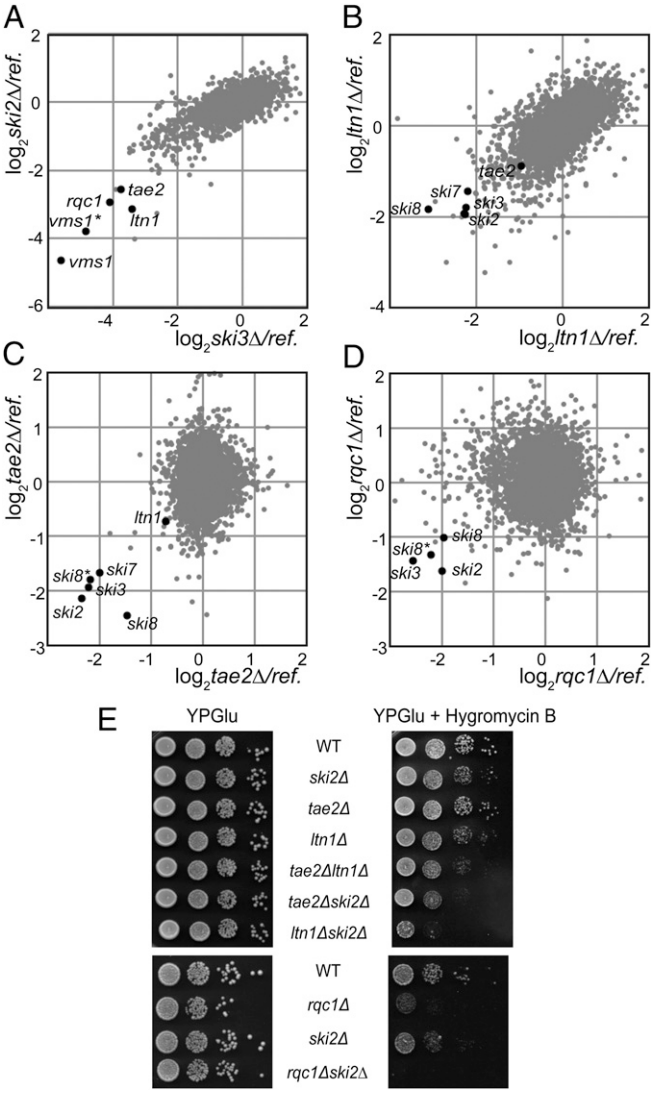


Fig. 1. Tae2, Rqc1, and Ltn1 are functionally linked to the SKI complex. (*A*) GIM screens with *ski2*Δ and *ski3*Δ query strains. Each dot indicates a deletion mutant strain. In each screen, we compared the relative changes in given mutant levels in combination with the query or a reference mutation after 22 generations of a mixture of double-mutant populations. Microarray estimation of changes was normalized and the log2 of the ratio of query to reference was plotted. (*B*) GIM screens with the *ltn1*Δ query strain. Details are as in *A*. (*C*) GIM screens with the *tae2*Δ query strain. Details are as in *A*. (*D*) GIM screens with the *rqc1*Δ query strain. Details are as in *A*. (*E*) Serial dilutions of wild-type (BY4741) or deletion mutant strains were spotted on rich medium plates with or without hygromycin B (40 μg/mL) and incubated for 2 d at 30 °C.

CELL BIOLOGY

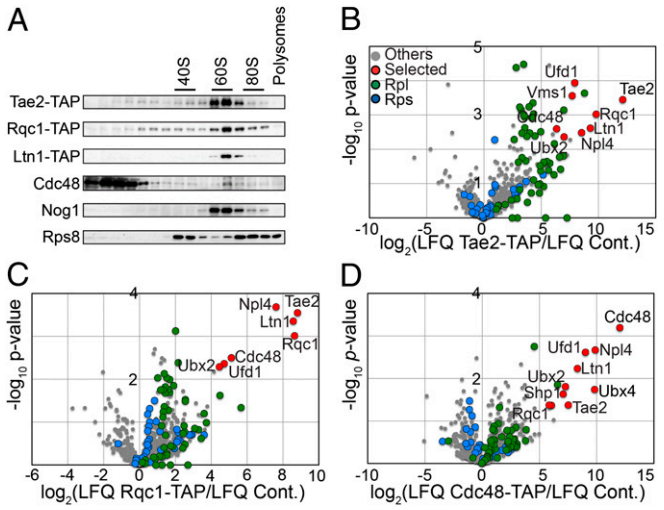


Fig. 2. Tae2, Rqc1, Ltn1, and Cdc48 are associated to 60S ribosomal particles. (*A*) Total cellular extracts were prepared from each strain expressing Tae2-TAP or Rqc1-TAP or Ltn1-TAP and separated on a sucrose gradient (10–30%). Fractions of the gradient were analyzed by Western blot, using antibodies against TAP, Cdc48, Nog1, and Rps8, a ribosomal protein of the small subunit. (*B*) Affinity purification of the Tae2-TAP–associated complex was subjected to LC-MS/MS identification and quantification. Tae2-associated complex was compared with the BY4741 strain. Volcano plot shows the fold change (log2 LFQ cpx/LFQ ref.) (LFQ, label-free quantification) on the *x* axis and the *P*-value distribution (−log10 *P* value) on the *y* axis for the proteins identified in the TAP purification. Each circle indicates an identified protein (in red, for the most significant enriched candidates in the TAP purification; in green, for RPLs; in blue, for the RPSs). (*C*) TAP purification with Rqc1-TAP compared with the BY4741 strain. Details are as in *B*. (*D*) TAP purification with Cdc48-TAP compared with the BY4741 strain. Details are as in *B*.

To see whether Tae2, Rqc1, and Ltn1 were bound together to the same 60S particles, we performed tandem affinity purification coupled with label-free mass spectrometry (LC-MS/MS), using strains expressing, respectively, the Tae2-TAP (Tandem affinity Purification) and Rqc1-TAP fusions as baits and a wild-type strain (BY4741) as a negative control. Statistical analysis of label-free quantitative MS data (26) revealed significant enrichment of proteins of the large ribosomal subunit (RPL) in both Tae2-TAP and Rqc1-TAP purifications, confirming the binding of these two factors to 60S particles (Fig. 2 *B* and *C*). In addition, we observed that Tae2, Rqc1, and Ltn1 were enriched specifically in both purifications, indicating that they are present together on the same 60S subunits. Moreover, these purifications revealed a strong enrichment of an additional component, Cdc48, and several of its known partners, Ufd1, Npl4, Vms1, Ubx2, Ubx4, and Shp1.

Affinity purifications using Cdc48-TAP as bait with the same wild-type strain as a negative control showed a strong enrichment of known Cdc48 partners (Ufd1, Npl4, Ubx2, and Ubx4) and of Ltn1, Tae2, and Rqc1, which confirmed the presence of Cdc48 in complexes that also contain Tae2, Rqc1, and Ltn1 (Fig. 2*D* and Dataset S2). In parallel, we examined the localization of Cdc48 in a polysome gradient. We observed that, even if most of the Cdc48 hexamers were localized in lighter fractions of the gradient, a subset of Cdc48 sedimented in the 60S fractions (Fig. 2*A*). This subset is likely to correspond to Cdc48 physically interacting with 60S particles associated with Tae2, Rqc1, and Ltn1.

Ltn1 and Rqc1 Are Essential for the Recruitment of Cdc48 to Ribosomal Subunits. Cdc48 (called p97 in mammals) is a highly conserved member of the AAA-ATPase family involved in a large number of cellular functions and forming homohexamers able to interact with diverse partners that confer specificity toward various processes (14). One of the main functions of Cdc48 is to recognize polyubiquitinated molecules, extract them from a complex, and make these substrates accessible to the proteasome for degradation (27). Therefore, the ubiquitination activity of Ltn1 could be an important step for the recruitment of the Cdc48-Ufd1-Npl4 complex to 60S particles associated with Tae2 and Rqc1.

We thus tested whether the absence of Ltn1 affected the binding of Cdc48 to the Tae2- and Rqc1-associated complexes. We observed that the deletion of *LTN1* resulted in a decrease in the amount of Cdc48 and its partners Ufd1 and Npl4 from Tae2-TAP (Fig. 3 *A* and *B* and Dataset S3)- and Rqc1-TAP (Fig. 4*A* and Dataset S4)-associated complexes. In addition, we examined the effect of the absence of Rqc1 in Tae2-TAP purifications and noticed a similar Cdc48 decrease (Fig. 3*C* and Dataset S3).

These data were strengthened by an independent experiment showing that the absence of Ltn1 or, to a somewhat lesser extent, Rqc1 efficiently reduced the amount of Cdc48 found in the 60S fractions of a polysome gradient (Fig. S2).

The amount of Cdc48 was also decreased to some extent from the Rqc1-TAP complex in the absence of Tae2 (Fig. 4*B* and Dataset S4), an observation also corroborated by the diminution of the amount of Cdc48 sedimenting with the 60S in a polysome gradient when Tae2 is absent (Fig. S2). This decrease was paralleled by a similar diminution of Ltn1 (Fig. 4*B*), suggesting that the decrease of Cdc48 might be indirect, resulting from the lower stability or recruitment of Ltn1 on the complex. In addition, we observed that the Ltn1-3HA fusion, which localizes with the 60S in a polysome gradient in a wild type, is shifted for a large part toward the lighter fractions in the absence of Tae2 (Fig. 4*C*).

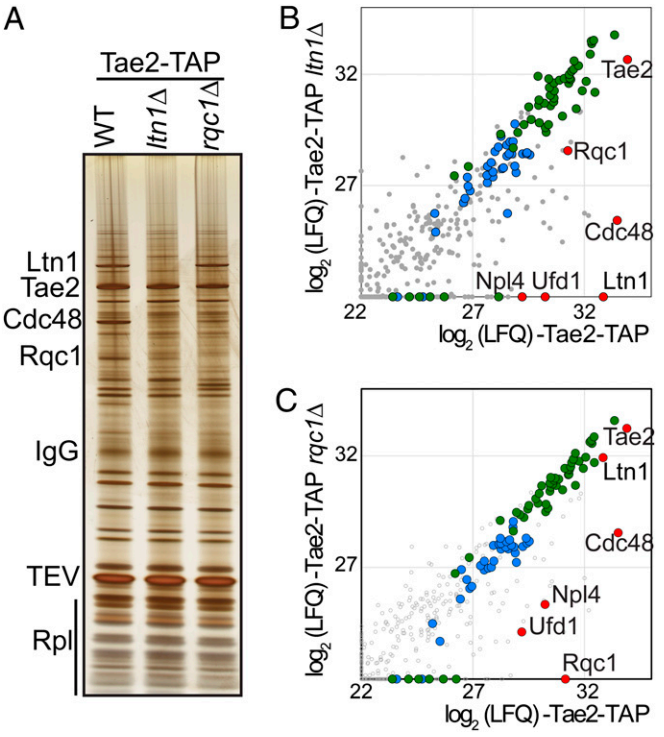


Fig. 3. Cdc48 association with Tae2 depends on Ltn1 and Rqc1. (*A*) Affinity purification of the Tae2-TAP–associated complex in WT or in the absence of Ltn1 or in the absence of Rqc1. The associated proteins were separated on a polyacrylamide gel and revealed by silver staining. (*B*) Affinity purification of Tae2-TAP–associated complex in presence or absence of Ltn1. Graph shows the comparison between the intensities (LFQ) for each protein identified by LC-MS/MS (log2 scale). (Color legend is as in Fig. 2). (*C*) Affinity purification of the Tae2-TAP–associated complex in the presence or absence of Rqc1 as in *B*.

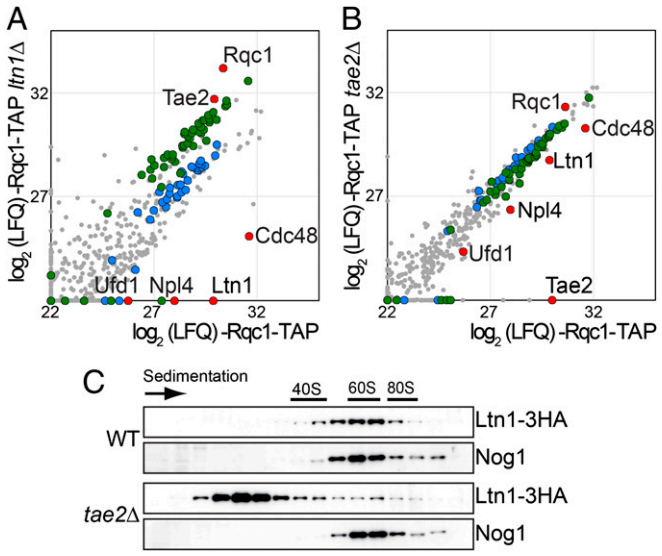


Fig. 4. Ltn1 association to 60S ribosomal particles is affected by Tae2. (*A*) Affinity purification of the Rqc1-TAP–associated complex in the presence or absence of Ltn1. Graph shows the comparison of the intensities of each protein identified by LC-MS/MS (log2 scale) as in Fig. 3*B*. (Legend for the dots is as in Fig. 2*A*.) (*B*) Affinity purification of the Rqc1-TAP–associated complex in the presence or absence of Tae2 as in Fig. 3*B*. (*C*) Cellular extracts from the tagged strains Ltn1-3HA and Ltn1-3HA *tae2*Δ were separated on a sucrose gradient (10–30%) as in Fig. 2. The tagged proteins were revealed by Western blot as in Fig. 2, using HA antibody.

This confirms the importance of Tae2 for the stable association of Ltn1 with the complex.

In summary, the Cdc48-Ufd1-Npl4 complex requires both Ltn1 and Rqc1 to efficiently bind 60S particles, which suggests that ubiquitination by Ltn1 is essential for Cdc48 recruitment. Whether Rqc1 has a role in the ubiquitination process as well or whether it has a more structural role for Cdc48 binding remains to be determined.

Tae2, Rqc1, and Cdc48 Are Involved, Together with Ltn1, in Non-Stop Protein Decay. The new 60S-associated complex described above contains Cdc48, Rqc1, Tae2, and the E3 ubiquitin ligase Ltn1, which has been previously shown to ubiquitinate aberrant nascent peptides synthesized from *Non-Stop* mRNAs to ensure their proteasomal degradation (13). In parallel, components of the SKI complex are essential for the recruitment of the cytoplasmic exosome and thus aberrant mRNA clearance (2). Because Tae2 and Rqc1 are functionally linked with the SKI complex and physically associated with Cdc48 and Ltn1 on the 60S, we tested whether Tae2, Rqc1, and Cdc48 were also involved in the degradation of aberrant *Non-Stop* mRNAs and the associated nascent peptides.

The *HIS3* Non-Stop reporter gene (pAV188 plasmid) (2, 3) was used to test whether the Non-Stop degradation pathway was still active in the absence of Rqc1 or Tae2. In a wild-type strain, *his3-Non-Stop* mRNAs are efficiently degraded; therefore cells from a parental *his3Δ100* strain do not grow on media without histidine (Fig. 5*A*). In contrast, mutations of the SKI complex hinder *Non-Stop* mRNA decay activity that stabilizes aberrant *Non-Stop* mRNAs, thus enabling the growth of cells transformed with pAV188 even in the absence of histidine. Wilson et al. showed that a deletion of *LTN1* also allowed pAV188-transformed cells to grow in the absence of histidine, revealing that the stabilization of proteins synthesized from *Non-Stop* mRNAs can be sufficient to restore a functional level of His3 activity (28). We performed drop tests, using deletion strains for either *TAE2* (Fig. 5*A*, *Upper*) or *RQC1* (Fig. 5*A*, *Lower*) and observed that both deletions allowed growth in the absence of histidine with pAV188. In addition, combinations of *TAE2* or *RQC1* deletions with *ski2*Δ (and *ltn1*Δ in the case of Tae2) revealed a synergistic effect on growth rate on this medium. These results showed that the absence of Tae2 or Rqc1 caused an accumulation of functional His3-Non-Stop proteins and that this accumulation was even stronger in combination with the absence of Ski2 or Ltn1.

To address whether Tae2 and Rqc1 are involved in *Non-Stop* mRNA clearance or specifically in the degradation of aberrant nascent peptides, we used the pAV184 reporter that carries a gene coding for Protein A from an mRNA that lacks a termination codon. The same gene but with a normal termination codon was used as a control (pAV183) (2). We performed Western blots and

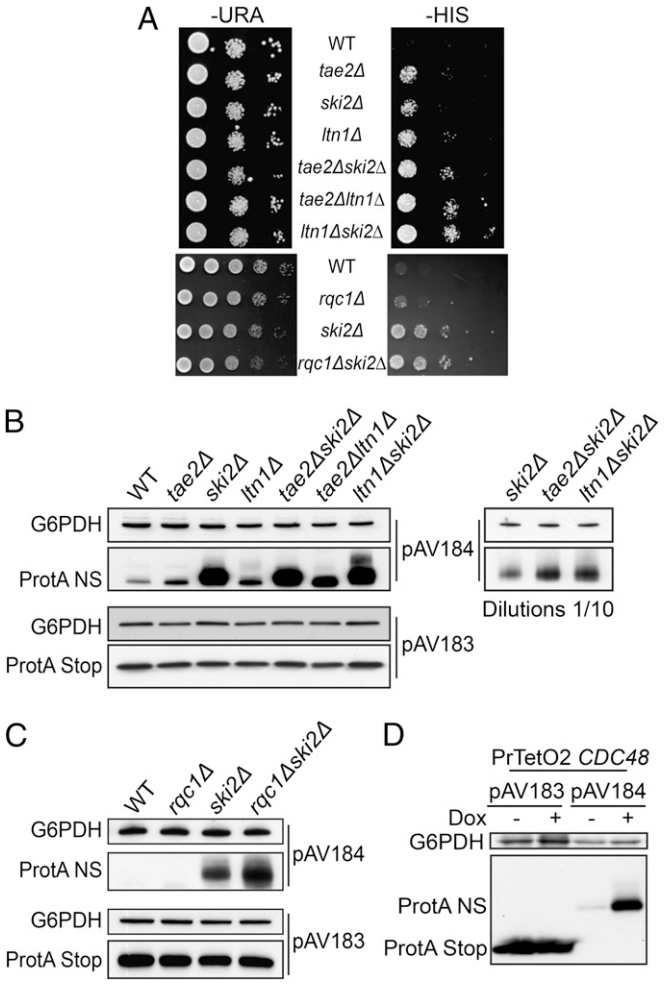


Fig. 5. Absence of Tae2, Rqc1, and Ltn1 as well as Cdc48 leads to the accumulation of Non-Stop proteins. (*A*) Absence of Tae2 (*Upper*) or Rqc1 (*Lower*) enables the production of Non-Stop His3. Wild-type (BY4741) or deletion mutant strains were transformed with the Non-Stop *HIS3*-containing plasmid (pAV188). Serial dilutions of the strains were spotted on SC –Ura and on SC –His and the plates were incubated for 3 d at 30 °C. (*B*) The same strains as in *A* were transformed with the pAV184 plasmid containing the Non-Stop protA gene under the control of the *GAL10* promoter and with the pAV183-containing protA gene with a Stop codon as a control. Nondiluted and 10-fold–diluted total cellular extracts were separated on a 10% SDS/PAGE polyacrylamide gel and 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. (*C*) As in *B* with the strains related to *rqc1*Δ, *ski2*Δ, and *rqc1*Δ *ski2*Δ. (*D*) As in *B* with the strain PrTetO2:*CDC48*. The depletion of Cdc48 was obtained by incubation of the strain for 12 h in the presence of Doxycyclin (10 μg/mL).

Northern blots with total extracts from mutant cells transformed with pAV184 (Non-Stop Protein A) or pAV183 (Stop Protein A). As previously shown, deletion of SKI complex components caused an accumulation of *Non-Stop* mRNAs and therefore restored expression of aberrant proteins (Fig. S3 *A* and *B*). The *ltn1*Δ mutant exhibited an accumulation of aberrant proteins without affecting the levels of aberrant *Non-Stop* mRNAs (Fig. S3*A*) (13). We noticed that in the absence of Tae2, the aberrant Non-Stop Protein A was stabilized compared with the wild type (Fig. 5*B*, *Upper*) whereas Stop Protein A showed a similar abundance in all tested mutants (Fig. 5*B*, *Lower*). We showed that the absence of Tae2 did not affect the level of aberrant *Non-Stop* mRNA or its stability (Fig. S3 *A* and *D*). We did not see any clear effect of the *RQC1* deletion on Non-Stop Protein A, however, as for the *HIS3* Non-Stop reporter, combined deletions of *TAE2* or *RQC1* with the deletion of *SKI2* revealed a synergistic effect on aberrant protein accumulation (Fig. 5 *B* and *C*). We tested in parallel the effect of *CDC48* depletion and also observed a strong accumulation of Non-Stop Protein A (Fig. 5*D*).

The absence of Tae2, Rqc1, or Cdc48 did not affect the steady-state levels of the *Non-Stop Protein A* mRNA (Fig. S3 *A*–*C*), suggesting that like Ltn1, these three factors are specifically involved in the degradation of nascent peptides synthesized from *Non-Stop* mRNAs but have no role in Non-Stop mRNA decay.

Aberrant Nascent Peptides Remain Bound to the Ribosome in the Absence of Tae2, Rqc1, or Cdc48. To understand how Tae2, Rqc1, and Cdc48 act on the recognition or the degradation of aberrant nascent peptides, we analyzed the sedimentation profile of the Non-Stop peptide in a polysome gradient in the absence of Tae2, Rqc1, or Cdc48 (in this experiment, we used a TAP-Non-Stop reporter derived from the Non-Stop Protein A reporter pAV184) (*SI Materials and Methods*). It has been previously shown that in mutants of the SKI complex or in the absence of Ltn1, aberrant nascent peptides accumulated in the 80S fractions of a polysome gradient, suggesting that although Ltn1 sediments with the 60S fractions, the recognition process of aberrant proteins could start on the stalled ribosome and trigger the dissociation of the two ribosomal subunits (13). Whereas the control TAP-Stop protein was localized at the top of the gradient in the free fractions, the TAP-Non-Stop protein accumulated in the 80S fractions in the absence of Tae2, Rqc1, or Cdc48 as in the absence of Ski2 or Ltn1 (Fig. 6*A*). Interestingly, in the absence of Ltn1 and to a lesser extent in the absence of Rqc1 or Cdc48, we could observe a subset of aberrant proteins sedimenting with the 60S fractions in addition to the 80S fractions. This is consistent with the hypothesis that aberrant nascent peptides could remain blocked in the 60S exit tunnel even after dissociation of the stalled 80S. This subset of TAP-Non-Stop proteins localized in the 60S fractions could thus represent intermediates of degradation between ribosome dissociation and ubiquitination of the aberrant nascent peptide shown by Bengtson and Joazeiro (13). However, whether the ubiquitination of aberrant nascent peptides starts before or after ribosome dissociation remains unclear.

Cdc48 Is Involved in the Proteasomal Targeting of Polyubiquitinated Substrates Stalled on 60S Subunits. No high-molecular-weight species of the TAP-Non-Stop protein, which could correspond to ubiquitinated forms, were readily apparent in these single-mutant conditions. Given its documented function described in other pathways (14, 15), the Cdc48-Ufd1-Npl4 complex could be expected to play a role in the recognition and proteasomal targeting of polyubiquitinated nascent peptides. We therefore examined the polysome sedimentation profile of TAP-Non-Stop proteins in the absence of Ski2 and Cdc48, to stabilize *TAP-Non-Stop* mRNAs and the polyubiquitinated forms of the TAP-Non-Stop proteins, respectively. In addition to its strong accumulation in both the 80S and the 60S fractions (Fig. 6*B*), we observed that

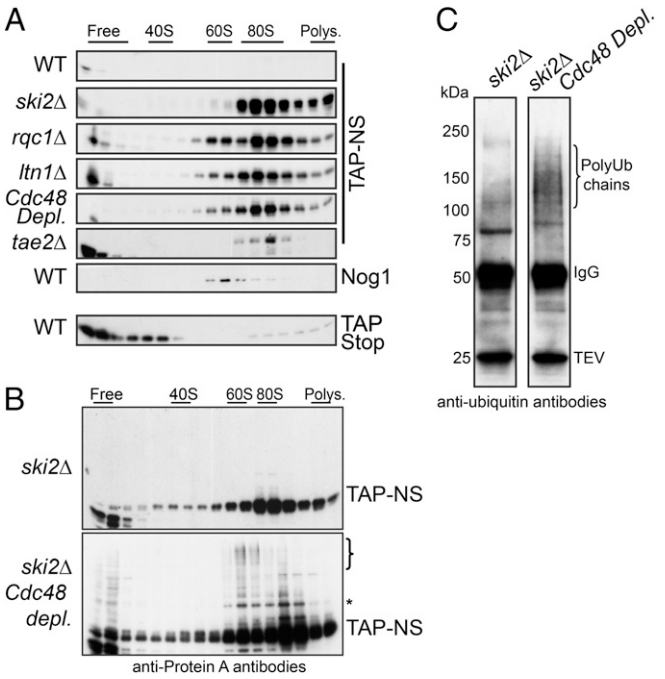


Fig. 6. Stabilized Non-Stop proteins accumulate on 80S and 60S particles. (*A*) Cellular extracts from wild-type or deletion mutant strains bearing the TAP Non-Stop reporter were separated on sucrose gradients. The sedimentation profile of the TAP-stop protein expressed in the wild-type strain is shown as a control. The fractions were analyzed by Western blot, using antibodies against TAP. In addition, an antibody against Nog1 was used for the WT to mark the 60S position. (*B*) Polysome gradient of cellular extracts from *ski2*Δ single-mutant and *ski2*Δ *Cdc48*-depleted strains that express TAP-Non-Stop construct, detected as in *A*. (*C*) Immunoprecipitation of TAP-Non-Stop reporter in *ski2*Δ single-mutant and *ski2*Δ *Cdc48*-depleted strains. The cellular extracts from the strains in *B* were purified on IgG beads and eluted with TEV protease and the associated proteins were analyzed by Western blot, using monoclonal anti-Ubiquitin antibodies (clone P4D1).

upon depletion of Cdc48, a subset of TAP-Non-Stop proteins migrated as high-molecular-weight proteins, forming a ladder of increasing size from the 80S fractions to the 60S fractions. Affinity purifications of the TAP-Non-Stop reporter and its analysis by Western blot using antiubiquitin antibodies revealed the presence of a smear of polyubiquitinated species upon Cdc48 depletion (Fig. 6*C*), suggesting that the high-molecular-weight ladder formed by the TAP-Non-Stop protein in the 60S fractions indeed corresponds to polyubiquitinated forms of this peptide.

Taken together, these results show that (*i*) ubiquitination of the aberrant nascent peptide might start at the 80S level, because some TAP-Non-Stop protein-shifted species of intermediate size are already visible in the 80S fractions; (*ii*) high-molecular-weight polyubiquitinated forms of the aberrant peptide accumulate on 60S ribosomal particles in the absence of Cdc48; and (*iii*) Cdc48 is essential for proteasomal targeting of these polyubiquitinated aberrant substrates, because a depletion of Cdc48 strongly stabilized polyubiquitinated forms of the TAP-Non-Stop protein.

Discussion

Performing GIM genetic screens, we identified two factors, Tae2 and Rqc1, which, similarly to Ltn1, become essential during translation stress when the SKI complex is absent (Fig. 1). Remarkably, biochemical purifications revealed that these three factors, together with Cdc48, are part of a common complex in association with the 60S ribosomal subunit (Fig. 2). We found that these factors are all required for the efficient degradation of

aberrant nascent peptides synthesized from mRNA lacking a stop codon (NSPD) (Fig. 5).

During the completion of this paper, another study was published (23), showing the existence of the same Rqc1-Tae2-Ltn1-Cdc48 complex in association with 60S particles, coined the ribosome quality control (RQC) complex. This work characterized the RQC complex as a trigger for degradation of stalled polypeptides and as a signal for translational stress, which is fully consistent with our findings.

The presence of a stalled ribosome that does not have a stop codon in its A site was proposed to be the signal that triggers the degradation of *Non-Stop* or *NoGo* mRNAs. Dom34/Hbs1 would then be recruited instead of the canonical termination factor eRF1/eRF3, peptidyl-tRNA hydrolysis would not be activated, and the nascent peptide, in the form of a peptidyl-tRNA, would remain within the exit tunnel and the P site when Rli1 drives the dissociation of the stalled ribosome. However, the absence of Ltn1 was reported to result in the stabilization of the aberrant peptide on the 80S (13), suggesting that the ubiquitination process starts before ribosome dissociation. It has been also shown that Ltn1 is localized on the 60S, an observation strengthened by our observation that Ltn1, Tae2, Rqc1, and Cdc48 are present on the same 60S particles, supporting the existence of a hypothetical transient 60S-peptidyl-tRNA intermediate. Indeed, we could detect a Non-Stop peptide bound to the 60S particle (Fig. 6*A*) and show that polyubiquitinated forms of this peptide accumulate on the 60S in the absence of Cdc48 (Fig. 6 *B* and *C*). This observation, together with the fact that Cdc48 does not associate with the RQC particle in the absence of Ltn1 (Figs. 3*B* and 4*A*), strongly suggests that the Cdc48-Ufd1-Npl4 complex recognizes polyubiquitinated forms of the aberrant peptide at a late stage of the process. Considering the general role of Cdc48, it might extract the polyubiquitinated peptides from the dissociated 60S and escort them to the proteasome for degradation.

In addition, we observed that Cdc48 binding to the complex is also impeded by the absence of Rqc1 (Fig. 3*C*), whereas Ltn1 binding is not affected. Whether this reflects the requirement of Rqc1 for peptide ubiquitination or a more structural role of this factor for Cdc48 binding remains to be determined. In addition, the absence of Tae2 weakly affected Cdc48 binding to the complex; this could be an indirect effect due to the decreased binding efficiency of Ltn1 in this context (Fig. 4 *B* and *C*).

Finally, Cdc48 was implicated in the degradation of nonfunctional 60S subunits (25S NRD for nonfunctional rRNA decay) by promoting the dissociation of stalled 80S, thus allowing the recruitment of the proteasome to stalled 60S to perform ribosomal proteins proteolysis (29). These results are consistent with the hypothesis that after dissociation of stalled ribosomes, the 60S particles are not recycled to perform new rounds or translation but targeted for proteasomal degradation, together with the aberrant nascent peptide.

Materials and Methods

Yeast Strains, Plasmids, and GIM Screens. The yeast strains used in this study are listed in Tables S1 and S2. They were constructed by high-fidelity PCR transformation. Serial dilutions were spotted on rich medium plates with or without hygromycin B (40 μg/mL) and incubated for 2 d at 30 °C. Details of plasmid constructions and GIM screens (16) can be found in *SI Materials and Methods*.

Polysome Gradients and Western Blotting. Polysome gradients analyses were conducted as described in *SI Materials and Methods*. Collected fractions were precipitated and separated on a 10% (wt/vol) acrylamide gel. The proteins were detected by hybridization with the appropriate antibodies (Table S3).

Tandem Affinity Purifications Mass Spectrometry and Data Analysis. Biochemical purifications were performed using strains expressing TAP fusion proteins. A first-step purification was done with magnetic beads coupled with IgG (*SI Materials and Methods*). An aliquot of the Tobacco Etch Virus protease (TEV) eluate was separated on acrylamide gels and silver stained. The rest of the eluates were analyzed by mass spectrometry. Briefly, after digestion, peptides were identified on an LTQ-Orbitrap and raw MS data were analyzed using the MaxQuant software as described in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank A. Van Hoof, A. Buchberger, and G. Dieci for providing plasmids and antibodies against Cdc48 and Rps8, respectively. We thank the proteomics platform of the Pasteur Institute for the availability of the Orbitrap. Q.D. and Y.Y. were supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR), ANR-2011-BSV6-011-02 and ANR-08-JCJC-0019-01.

1. Kervestin S, Jacobson A (2012) NMD: A multifaceted response to premature translational termination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(11):700–712.
2. Frischmeyer PA, et al. (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science* 295:2258–2261.
3. van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295(5563):2262–2264.
4. Doma MK, Parker R (2006) Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* 440(7083):561–564.
5. Wilson MA, Meaux S, Parker R, van Hoof A (2005) Genetic interactions between [PSI+] and nonstop mRNA decay affect phenotypic variation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(29):10244–10249.
6. Ozsolak F, et al. (2010) Comprehensive polyadenylation site maps in yeast and human reveal pervasive alternative polyadenylation. *Cell* 143(6):1018–1029.
7. Lu J, Deutsch C (2008) Electrostatics in the ribosomal tunnel modulate chain elongation rates. *J Mol Biol* 384(1):73–86.
8. Ito-Harashima S, Kuroha K, Tatematsu T, 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(5):519–524.
9. Shoemaker CJ, Green R (2012) Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol* 19(6):594–601.
10. Shoemaker CJ, Eyler DE, Green R (2010) Dom34:Hbs1 promotes subunit dissociation and peptidyl-tRNA drop-off to initiate no-go decay. *Science* 330(6002):369–372.
11. Tsuboi T, et al. (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(4):518–529.
12. Dimitrova LN, Kuroha K, Tatematsu T, Inada T (2009) Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 284(16):10343–10352.
13. Bengtson MH, Joazeiro CA (2010) Role of a ribosome-associated E3 ubiquitin ligase in protein quality control. *Nature* 467(7314):470–473.
14. Stolz A, Hilt W, Buchberger A, Wolf DH (2011) Cdc48: A power machine in protein degradation. *Trends Biochem Sci* 36(10):515–523.
15. Meyer H, Bug M, Bremer S (2012) Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol* 14(2):117–123.
16. Decourty L, et al. (2008) Linking functionally related genes by sensitive and quantitative characterization of genetic interaction profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(15):5821–5826.
17. Giaever G, et al. (2002) Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome. *Nature* 418(6896):387–391.
18. Schuldiner M, et al. (2005) Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123(3):507–519.
19. Heo J-M, et al. (2010) A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Mol Cell* 40(3):465–480.
20. Tran JR, Tomsic LR, Brodsky JL (2011) A Cdc48p-associated factor modulates endoplasmic reticulum-associated degradation, cell stress, and ubiquitinated protein homeostasis. *J Biol Chem* 286(7):5744–5755.
21. Baek GH, Cheng H, Kim I, Rao H (2012) The Cdc48 protein and its cofactor Vms1 are involved in Cdc13 protein degradation. *J Biol Chem* 287(32):26788–26795.
22. Alamgir M, Erukova V, Jessulat M, Azizi A, Golshani A (2010) Chemical-genetic profile analysis of five inhibitory compounds in yeast. *BMC Chem Biol* 10:6.
23. Brandman O, et al. (2012) A ribosome-bound quality control complex triggers degradation of nascent peptides and signals translation stress. *Cell* 151(5):1042–1054.
24. Hillenmeyer ME, et al. (2008) The chemical genomic portrait of yeast: Uncovering a phenotype for all genes. *Science* 320(5874):362–365.
25. Saveanu C, et al. (2003) Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol Cell Biol* 23(13):4449–4460.
26. Cox J, et al. (2011) Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10(4):1794–1805.
27. Meyer HH, Wang Y, Warren G (2002) Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. *EMBO J* 21(21):5645–5652.
28. Wilson MA, Meaux S, van Hoof A (2007) A genomic screen in yeast reveals novel aspects of nonstop mRNA metabolism. *Genetics* 177(2):773–784.
29. Fujii K, Kitabatake M, Sakata T, Ohno M (2012) 40S subunit dissociation and proteasome-dependent RNA degradation in nonfunctional 25S rRNA decay. *EMBO J* 31(11):2579–2589.

Supporting Information

Defenouillère et al. 10.1073/pnas.1221724110

SI Materials and Methods

Plasmid Constructions. Plasmid-borne TAP-Stop and TAP-Non-Stop reporter constructs (TAP; tandem affinity purification) were obtained by PCR-based yeast recombination, respectively, from Stop ProtA (pAV183) and Non-Stop ProtA (pAV184) plasmids (Tables S1 and S2). For this purpose, pAV183 or pAV184 was linearized with XbaI and BamHI and transformed in yeast together with the PCR-amplified TAP-tag. The latter, an N-terminal fusion, was PCR amplified from pBS1761 plasmid (1) with JM028 (5′-GGAGAAAAAACCCCGGATCATAATCGGCCG-CTCTAGAATGGCAGGCCTTGCGCAACACG-3′) and JM029 (5′-GATAAGAAAGCAACACCTGGCAATTCCTTACCGGA-TCCTAGGGCGAATTGGGTACCG-GG-3′) oligos.

Genetic Interaction Mapping Screens. Genetic interaction mapping (GIM) was done as previously described (2) with two exceptions: The barcoded 979 DAmP strains were added to the pool of mutants and a new system for the cultures of the final pools of haploid double mutants was used. Constant turbidity cultures were done at 30 °C by using a custom-made turbidostat system. This system uses sterile air injection in 10-mL reaction flasks to ensure mixing of the cells and allows yeast growth at rates that are similar to the ones measured in batch cultures. The reference population either came from a parallel screen done with the deletion of *YEL068C* open reading frame or consisted of a mix of at least 10 double-mutant populations obtained with different query gene deletions. Data analysis of the microarray results was done using R to perform Lowess normalization with marray (3) independently for the UP and DOWN measured sets of ratios (corresponding to the two barcodes situated in the 5′ and 3′ regions of KANMX, Kanamycin resistance cassette). We corrected the results for systematic bias and batch effects by applying a weight on each ratio value. The weights were determined using the whole-screens collection containing at this moment 838 experiments. We supposed that the collection was big enough and the screens sufficiently independent for globally showing no effect on any gene (or spot). Assuming that, we calculated the mean ratio for each spot, expecting a zero value for it. A nonzero value indicates a systematic bias on the spot. We used each nonzero mean spot value to calculate a correction factor, or weight, that would decrease the effect of unwanted biases. We defined empirically the weight applied to a given spot value through the following formula:

$$x_j = \frac{1}{n}\sum_{i=0}^{n} \text{ratio}_{ij}$$

$$\mu = \frac{1}{n * m}\sum_{j=0}^{m}\sum_{i=0}^{n} \text{ratio}_{ij}$$

$$\sigma = \frac{1}{n * m}\sum_{j=0}^{m}\sum_{i=0}^{n} \left(\text{ratio}_{ij} - \mu\right)^2.$$

Weight determination is for the jth spot, log-ratio$_{ij}$ is the log-ratio value of the jth spot of the ith experiment, n is the total number of experiments, and m is the total number of spots on a microarray.

We obtained weights for the spots, which are near 1 for a mean spot log-ratio value near 0 and a weight near 0 for a mean spot log-ratio value showing an important bias. Advantages of this method are a progressive way for calculating weights and no need for the use of a threshold for choosing which spot needs to be corrected. We used the same method to determine a weight for batch correction but using x_j as the mean of the j spot ratios of the series and μ and σ as the mean and SD of the ratios for the same j spot in all of the experiments of the screen collection:

$$x_j = \frac{1}{p}\sum_{k=0}^{p} \text{log-ratio}_{kj}$$

$$\mu_j = \frac{1}{m}\sum_{i=0}^{m} \text{log-ratio}_{ij}$$

$$\sigma_j = \frac{1}{m}\sum_{i=0}^{p} \left(\text{log-ratio}_{ij} - \mu_j\right)^2.$$

Weight determination is for the jth spot, log-ratio$_{kj}$ is the log-ratio value of the jth spot of the kth experiment, p is the total number of experiments in the batch, and m is the total number of spots on a microarray.

For each mutant strain, the median of the batch and globally corrected up and down values were calculated (Dataset S1).

Tandem Affinity Purifications. Cells expressing C-terminal TAP fusions (4) of each bait protein were cultivated in 2 L of rich medium (YPD) until OD_{600} = 1, and cultures were centrifuged at 4 °C, rinsed in cold water, and frozen at −80 °C. Cell pellets were thawed on ice, resuspended in 20 mL of lysis buffer (20 mM HepesK, pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM $MgCl_2$; Sigma-Aldrich protease inhibitors), and broken with a French press (twice at 1,200 psi), and lysates were clarified by centrifugation at 15,000 × g for 20 min at 4 °C. Supernatants were collected with addition of 0.5% Triton X100, 1/2,500 antifoam, and 50 μL of magnetic beads coupled with IgG, and binding was performed on a wheel for 40 min at 4 °C (5). Beads were collected on a magnet to discard lysis buffer and were washed three times in washing buffer containing 0.5% Triton X100 and three times in washing buffer without Triton X100 (20 mM HepesK, pH 7.4, 100 mM KOAc, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT). Elution was performed in 400 μL of washing buffer (without Triton X100) with 10 μL of AcTEV Protease (Life Technologies) for 1 h 45 min at 17 °C. Eluted beads were discarded on a magnet and eluate proteins were precipitated by the methanol/chloroform technique (6). One-fifth of the precipitated proteins were resuspended in 10 μL sample buffer [100 mM Tris·HCl, pH 6.8, 20% (vol/vol) glycerol, 0.02% bromophenol blue, 8% (wt/vol) SDS, 100 mM DTT], migrated on acrylamide NuPAGE Novex 4–12% Bis-Tris gels (Life Technologies), and analyzed by silver staining using ethanol (7). The rest of the eluates were analyzed by mass spectrometry.

Mass Spectrometry Experiment and Data Analysis. Briefly, protein samples were treated with Endoprotease Lys-C and Trypsin (Trypsin Gold Mass Spec Grade; Promega). Peptide samples were desalted by OMIX C18 pipette tips (Agilent Technologies) and then analyzed on an LTQ-Orbitrap velos instrument (Thermo Fisher Scientific) connected online to an Ultimate 3000 nanoHPLC system (Dionex; Thermo Fisher Scientific). Raw mass spectrometry (MS) data from the LTQ-Orbitrap were analyzed using MaxQuant software (8, 9) version 1.3.0.5, which uses the

Andromeda search engine (10). Only protein identifications based on a minimum of two peptides were selected for further quantitative studies. Bioinformatic analysis of the MaxQuant/Andromeda work flow output and the analysis of the abundances of the identified proteins were performed with the Perseus module (version 1.30.4, available as part of the MaxQuant suite). After data processing, label-free quantification (LFQ) values from the "proteinGroups.txt" output file of MaxQuant were further analyzed. To distinguish specifically interacting proteins from the background, protein abundances were compared between sample and control groups, using the Student's *t* test statistic, and the results were represented as volcano plots (11).

Northern Blots. Total RNAs were extracted using the hot phenol procedure from six OD_{600} exponential cultures. Two micrograms of total RNA was separated on a 1% agarose gel, transferred on a Hybond N^+ membrane, and probed with ^{32}P-radiolabeled oligonucleotides that are specific to ProtA mRNA (YY233 5′-TCTACTTTCGGCGCCTGAGCATCATTT-3′) or Scr1 RNA (YY234 5′-GTCTAGCCGCGAGGAAGG-3′).

mRNA Degradation Assays. Yeast strains transformed with the ProtA-Non-Stop reporter gene (pAV184) were grown in the presence of 2% galactose at 30 °C. To switch off the expression of the reporter gene that is under the control of a *GAL1* promoter, cells were switched to glucose media at $T = 0$ min. Aliquots were withdrawn from the cell culture, for each indicated time point. Total RNAs were extracted and analyzed by Northern blot as described above.

1. Puig O, et al. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods* 24(3):218–229.
2. Decourty L, et al. (2008) Linking functionally related genes by sensitive and quantitative characterization of genetic interaction profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(15): 5821–5826.
3. Yang YH, Paquet A, Dudoit S (2009) *Exploratory analysis for two-color spotted microarray data*. R package version 1.34.0. Available at http://www.maths.usyd.edu.au/u/jeany/.
4. Rigaut G, et al. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* 17(10):1030–1032.
5. Oeffinger M, et al. (2007) Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Methods* 4(11):951–956.
6. Wessel D, Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138(1):141–143.
7. Yan JX, et al. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 21(17):3666–3672.
8. Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26(12):1367–1372.
9. Cox J, et al. (2009) A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics. *Nat Protoc* 4(5):698–705.
10. Cox J, et al. (2011) Andromeda: A peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *J Proteome Res* 10(4):1794–1805.
11. Hubner NC, Mann M (2011) Extracting gene function from protein-protein interactions using Quantitative BAC InteraCtomics (QUBIC). *Methods* 53(4):453–459.

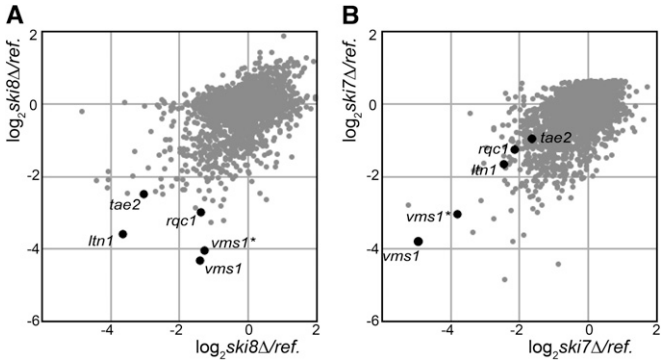


Fig. S1. *SKI7* and *SKI8* are functionally linked to translation-associated element 2 (*TAE2*), ribosomal quality control 1 (*RQC1*), and *LTN1*. (*A*) Comparison of two independent GIM screens, using *ski8*Δ as a query gene. The experiment and analysis were done as described in Fig. 1 in the main text. (*B*) Comparison of two independent GIM screens, using *ski7*Δ as query gene. The experiment and analysis were done as described in Fig. 1 in the main text.

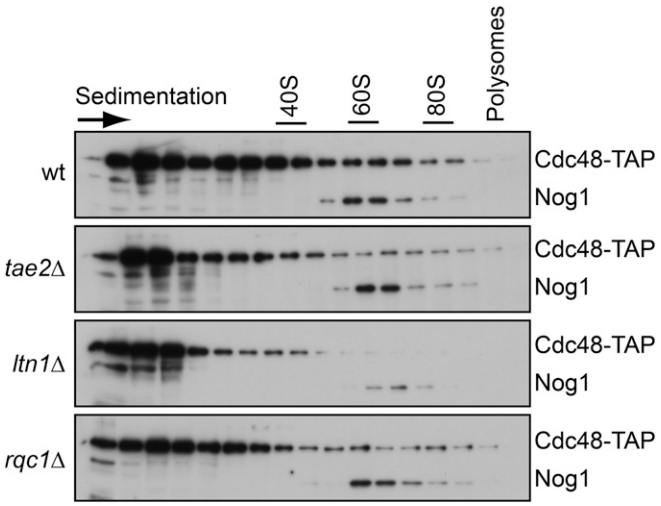


Fig. S2. Sedimentation of the AAA-ATPase Cdc48-TAP fusion protein in the absence of Ltn1, Tae2, or Rqc1 protein. Total cellular extracts from cells expressing Cdc48-TAP in WT or in the absence of Ltn1, Tae2, and Rqc1 were separated on a 10–30% sucrose gradient as described in Fig. 2 in the main text.

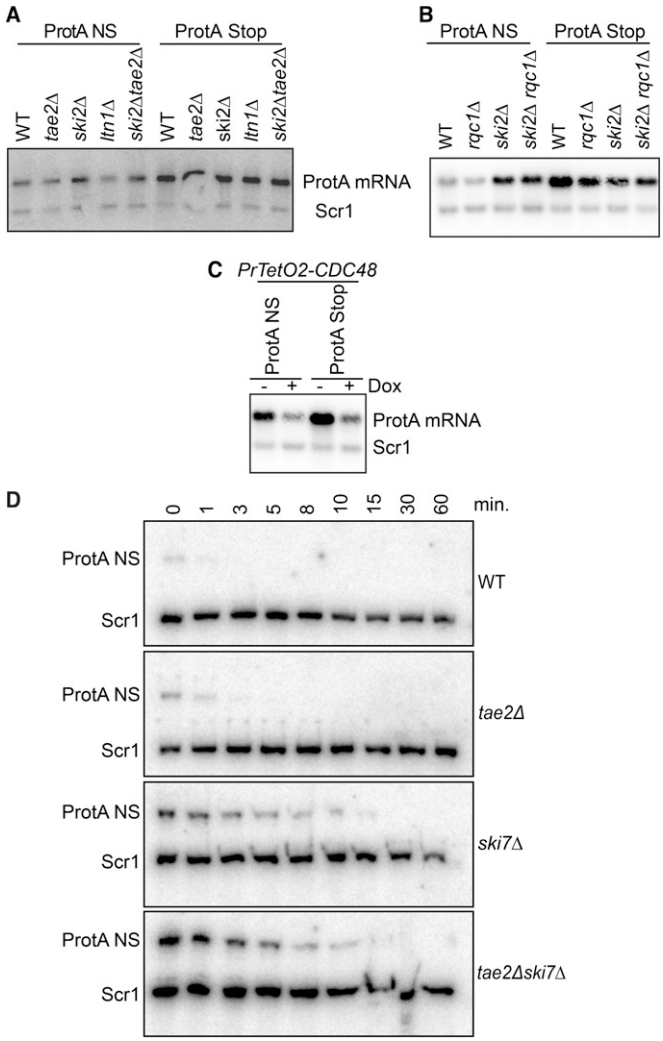


Fig. S3. The level of ProtA-Non-Stop mRNA is not affected in the absence of Tae2, Ltn1, or Rqc1 as well as upon depletion of Cdc48. (*A–D*) Northern blot analysis of total mRNAs using probes against ProtA mRNA or Scr1 RNA as indicated in *SI Materials and Methods*. Plasmid-borne reporter constructs expressing ProtA-NS (pAV184) or ProtA-Stop (pAV183) are described in Tables S1 and S2. (*A*) ProtA-Non-Stop mRNA does not accumulate in the *tae2*Δ mutant. ProtA-NS (Non-Stop) and ProtA-Stop mRNA levels in WT, *tae2*Δ, *ski2*Δ, *ltn1*Δ, and *ski2*Δ*tae2*Δ cells were analyzed by Northern blot. (*B*) *rqc1*Δ does not accumulate Non-Stop ProtA mRNA. ProtA-NS and ProtA-Stop mRNAs were analyzed as described in *A*. (*C*) Depletion of Cdc48 does not accumulate ProtA-NS mRNA. The *PrTetO2-CDC48* strain, where *CDC48* is under the control of a tetracyclin-repressible promoter, was incubated in the absence or the presence of Doxycyclin (5 μg/mL) for 13 h. ProtA-NS or ProtA-Stop mRNAs were detected as indicated in *A*. (*D*) The half-life of Non-Stop ProtA mRNA is not affected by the absence of Tae2. Shown is Northern blot analysis of ProtA-NS mRNA amounts during an expression shutoff time course, in WT, *tae2*Δ, *ski7*Δ, or *ski7*Δ*tae2*Δ cells.

Table S1. Yeast strains used in this study

Strains	Genotypes	Source
Wild type		
BY4741	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0*	(1)
BY4742	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0*	(1)
Fusion proteins		
LMA1949	As *BY4741*, ***Tae2-TAP***:*HIS3MX6*	(2)
LMA1951	As *BY4741*, ***Rqc1-TAP***:*HIS3MX6*	(2)
LMA2195	As *BY4741*, ***Rpl16a-TAP***:*HIS3MX6*	(2)
LMA2196	As *BY4741*, ***Cdc48-TAP***:*HIS3MX6,*	(2)
LMA2544	As *BY4741*, ***Ltn1-TAP***:*HIS3MX6*	(2)
LMA2685	As *BY4741*, ***Tae2-TAP***:*HIS3MX6,* ***ltn1***Δ::*KANMX4*	This study
LMA2686	As *BY4741*, ***Tae2-TAP***:*HIS3MX6,* ***rqc1***Δ::*KANMX4*	This study
LMA2688	As *BY4741*, ***Rqc1-TAP***:*HIS3MX6,* ***tae2***Δ::*KANMX4*	This study
LMA2689	As *BY4741*, ***Rqc1-TAP***:*HIS3MX6,* ***ltn1***Δ::*KANMX4*	This study
LMA2711	As *BY4741*, ***Cdc48-TAP***:*HIS3MX6,* ***ltn1***Δ::*URA3*	This study
LMA2712	As *BY4741*, ***Cdc48-TAP***:*HIS3MX6,* ***tae2***Δ::*KANMX4*	This study
LMA2713	As *BY4741*, ***Cdc48-TAP***:*HIS3MX6,* ***rqc1***Δ::*KANMX4*	This study
Mutants		
LMA1713	As *BY4741*, ***tae2***Δ::*HIS3*	This study
LMA1740	As *BY4741*, ***ski2***Δ::*URA3*	This study
LMA1986	As *BY4741*, ***ltn1***Δ::*URA3*	This study
LMA1741	As *BY4741*, ***tae2***Δ::*HIS3,* ***ski2***Δ::*URA3*	This study
LMA2026	As *BY4741*, ***tae2***Δ::*HIS3,* ***ltn1***Δ::*URA3*	This study
LMA1744	As *BY4741*, ***tae2***Δ::*URA3*	This study
LMA2203	As *BY4741*, ***ltn1***Δ::*HIS3*	This study
LMA2204	As *BY4741*, ***ltn1***Δ::*HIS3,* ***ski2***Δ::*URA3*	This study
LMA2714	As *BY4741*, ***rqc1***Δ::*HIS3*	This study
LMA2715	As *BY4741*, ***rqc1***Δ::*HIS3,* ***ski2***Δ::*URA3*	This study
LMA2649	As *BY4741, PrTetO2* ***CDC48***:: *KANMX4*	This study
LMA843	As *BY4742, yel068c*Δ::*PrαNATMX4,ydl242w*Δ::*KANMX4*	This study
LMA836	As *BY4742,* ***tae2***Δ::*PrαNATMX4, yel068c*Δ::*KANMX4*	This study
LMA837	As *BY4742,* ***ski2***Δ::*KANMX4, yel068c*Δ::*PrαNATMX4*	This study
LMA832	As *BY4742,* ***ski7***Δ::*KANMX4,* ***tae2***Δ::*PrαNATMX4*	This study
LMA839	As *BY4742,* ***ski7***Δ::*KANMX4, yel068c*Δ::*PrαNATMX4*	This study
LMA1921	As *BY4742,* ***ltn1***Δ::*KANMX4, yel068c*Δ::*PrαNATMX4*	This study
LMA830	As *BY4742,* ***tae2***Δ::*PrαNATMX4,* ***ski2***Δ::*KANMX4*	This study
LMA1920	As *BY4742,* ***tae2***Δ::*PrαNATMX4,* ***ltn1***Δ::*KANMX4*	This study
LMA1997	As *BY4742,* ***ski2***Δ::*PrαNATMX4,* ***ltn1***Δ::*KANMX4*	This study
LMA2001	As *BY4742,* ***ski7***Δ::*PrαNATMX4,* ***ltn1***Δ::*KANMX4*	This study
LMA2306	As *BY4742,* ***rqc1***Δ::*KANMX4, yel068c*Δ::*PrαNATMX4*	This study
LMA1996	As *BY4742,* ***rqc1***Δ::*KANMX4,,* ***ski2***Δ::*PrαNATMX4*	This study
LMA2709	As *BY4742, KANMX4:PrTetO2:****CDC48***	This study
LMA2719	As *BY4742, PrαNATMX4:PrTetO2:****CDC48***	This study
LMA2746	As *BY4742, PrαNATMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***ski2***Δ::*KANMX4*	This study
GIM query strains		
GIM123	As *BY4741,* ***ski2***Δ::*PrαNATMX4*	This study
GIM155	As *BY4741,* ***tae2***Δ::*PrαNATMX4*	This study
GIM225	As *BY4741,* ***ski8***Δ::*PrαNATMX4*	This study
GIM477	As *BY4741,* ***ski7***Δ::*PrαNATMX4*	This study
GIM479	As *BY4741,* ***rqc1***Δ::*PrαNATMX4*	This study
GIM503	As *BY4741,* ***ski3***Δ::*PrαNATMX4*	This study
GIM448	As *BY4741,* ***ltn1***Δ::*PrαNATMX4*	This study

The modified genes of interest are indicated in bold.

1. Brachmann CB, et al. (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* 14(2):115–132.
2. Ghaemmaghami S, et al. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425(6959):737–741.

Table S2. Yeast plasmids used in this study

Plasmid	Markers	Source
pGID1	URA3, HygR	(1)
pAV183	URA3	(2)
pAV184	URA3	(2)
pAV188	URA3	(2)
pTAP Stop	URA3	This study
pTAP Non-Stop	URA3	This study

1. Decourty L, et al. (2008) Linking functionally related genes by sensitive and quantitative characterization of genetic interaction profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(15):5821–5826.
2. van Hoof A, Frischmeyer PA, Dietz HC, Parker R (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science* 295(5563):2262–2264.

Table S3. Antibodies used for immunodetection

Target	Antibody	Dilution
TAP-tagged proteins	Peroxydase anti-peroxidase complex (PAP) (Sigma-Aldrich)	1/10,000
HA-tagged proteins	Anti-HA peroxidase (Roche)	1/500
Cdc48	Rabbit polyclonal, gift of Alexander Buchberger (University of Würzburg, Germany)	1/4,000
Nog1	Rabbit polyclonal	1/5,000
Rps8	Rabbit polyclonal, gift of Georgio Dieci (Università degli Studi di Parma, Italy)	1/5,000
G6PDH	Rabbit polyclonal	1/100,000
Ubiquitin	P4D1, monoclonal (Covance)	1/1,000

Nog1 is a pre60S factor which marks the 60S fractions. Rps8 is a ribosomal protein of the small subunit which marks 40S, 80S and polysomal fractions. G6PDH (Glucose-6-Phosphate-Deshydrogenase) is used as loading control.

Other Supporting Information Files

Dataset S1 (XLSX)
Dataset S2 (XLSX)
Dataset S3 (XLSX)
Dataset S4 (XLSX)

Ces résultats, publiés en 2013, nous ont permis de révéler l'existence du complexe RQC, ainsi que son rôle dans le contrôle qualité des produits aberrants de la traduction (Defenouillère et al., 2013). Les interactions fonctionnelles entre les facteurs du complexe SKI et du complexe RQC, révélées par des cribles génétiques, suggèrent que les cellules eucaryotes doivent être capables d'éliminer soit les transcrits aberrants qui entraînent l'arrêt traductionnel, soit les protéines aberrantes produites à partir de ces transcrits, afin de survivre en cas de stress traductionnel (dans notre cas, la présence de l'antibiotique Hygromycine, qui affecte la fidélité de la traduction). En effet, alors que les cellules respectivement déficientes pour le complexe SKI ou pour le complexe RQC sont capables de croître en présence d'Hygromycine, une déficience simultanée de ces deux complexes entraîne la mort des cellules spécifiquement en présence d'un stress traductionnel (voir **Figure 1** de l'article dans PNAS). Cette létalité synthétique, ainsi que la conservation des gènes codant pour les facteurs des complexes SKI et RQC chez l'ensemble des eucaryotes, montre l'importance des mécanismes de contrôle qualité de la traduction (reconnaissance et élimination des ARN messagers cytoplasmiques défectueux et des protéines aberrantes) pour limiter la toxicité cellulaire pouvant survenir lors d'un déséquilibre de l'homéostasie des protéines et ainsi permettre aux cellules de survivre en conditions de stress traductionnel.

Il est intéressant de remarquer que le quatrième mutant identifié dans les cribles génétiques ciblant le complexe SKI, correspondant au gène *VMS1*, ne fait en réalité pas strictement partie du complexe RQC, car bien qu'il soit significativement enrichi avec Rqc2-TAP, il n'apparait pas dans les purifications Rqc1-TAP. De plus, Vms1 n'est pas requis pour la dégradation des transcrits ou des peptides aberrants "Non-Stop". Cependant, il a été montré que Vms1 interagit directement avec Cdc48, et permet la relocalisation de cette ATPase du cytosol vers la mitochondrie en cas de stress oxydatif (Heo et al., 2010). Même si la raison pour laquelle Vms1 interagit fonctionnellement avec le complexe SKI n'est pas connue, on peut supposer que le maintien de l'homéostasie des protéines mitochondriales, processus qui requiert Vms1 et Cdc48, pourrait également nécessiter le contrôle qualité de certains transcrits aberrants par le complexe SKI (notamment des ARNm codant pour des protéines mitochondriales) afin de limiter l'accumulation de protéines aberrantes en cas de stress oxydatif.

Dans cette première publication, nous avions émis l'hypothèse que le processus de polyubiquitinylation des protéines aberrantes Non-Stop était un processus progressif qui pourrait commencer sur la particule 80S bloquée et se poursuivre, après dissociation de cette dernière, au niveau de la 60S contenant toujours un peptidyl-ARNt, grâce à l'activité E3 ubiquitine ligase de Ltn1. Cette hypothèse repose sur le profil de sédimentation du rapporteur aberrant dans un gradient de polysomes en absence de *SKI2* et après déplétion de *CDC48* (**Figure 6B**) : les bandes retardées sur gel correspondant à des formes polyubiquitinylées de la protéine aberrante semblent sédimenter au niveau de la 60S, mais aussi partiellement au niveau de la 80S. En réalité, le smear correspondant au peptide naissant polyubiquitinylé co-sédimente majoritairement avec la 60S bloquée, et les bandes de poids moléculaire supérieur à celui du peptide aberrant visibles dans la fraction 80S correspondent principalement à la forme liée covalemment à l'ARNt (peptidyl-ARNt, symbolisé par * sur la **Figure 6B**) qui a été caractérisée par la suite (Verma et al., 2013). Même si d'autres E3 ubiquitine ligases précèdent le complexe RQC pour l'association aux ribosomes bloqués (notamment Hel2 et Not4), il est en fait peu probable que la polyubiquitinylation du peptide naissant aberrant Non-Stop commence avant la dissociation du ribosome bloqué par Dom34-Hbs1 et Rli1 et le recrutement du complexe RQC sur la particule 60S bloquée.

2 - Le complexe RQC participe à l'adressage des protéines aberrantes au protéasome après leur extraction de la 60S

A la suite de ces deux articles mettant en évidence l'existence du complexe RQC (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013), plusieurs points d'incertitude restaient à élucider : tout d'abord, apporter une preuve directe que le complexe RQC interagit avec les particules 60S bloquées à la suite d'un évènement de traduction aberrant, ce qui avait été montré lors de la découverte de l'E3 ubiquitine ligase Ltn1 par immunoprécipitation d'un peptide naissant aberrant rapporteur Non-Stop (Bengtson and Joazeiro, 2010). Ensuite, lever l'ambiguïté concernant les évènements ayant lieu avant ou après dissociation du ribosome bloqué, notamment l'initiation du processus de polyubiquitinylation (discutée dans la partie précédente), ainsi que la reconnaissance des substrats par le complexe RQC.

En effet, même si les facteurs du RQC co-sédimentent tous au niveau de la 60S, il est possible que le recrutement de Ltn1, Rqc1 et Rqc2 ait lieu au niveau de la 80S bloquée, mais que cette étape soit trop transitoire pour être visible par les techniques de biochimie utilisées. Un résultat important qui favorise cette hypothèse est le fait que la majorité des peptides aberrants rapporteurs testés s'accumulent au niveau de la 80S, et non de la 60S, dans un gradient de polysomes en absence des partenaires du complexe RQC (Bengtson and Joazeiro, 2010; Defenouillère et al., 2013). Ce n'est que récemment, grâce à la structure des facteurs Ltn1 et Rqc2 en association avec la particule 60S, qu'une explication a été apportée pour ce paradoxe : la position occupée par le complexe RQC sur la particule 60S recouvre en partie la position de la 40S, ce qui exclut la possibilité d'une interaction RQC-80S (Lyumkis et al., 2014; Shao and Hegde, 2014; Shen et al., 2015). Par conséquent, l'accumulation des protéines aberrantes au niveau du 80S en absence de facteurs du RQC est la conséquence d'une compétition pour les 60S bloquées entre association au complexe RQC et réassociation avec des particules 40S libres (voir **Figure 14** de l'introduction). Enfin, même s'il était supposé que Cdc48 extrait les peptides aberrants du tunnel de sortie de la 60S bloquée et les escorte jusqu'au protéasome pour qu'ils soient dégradés, les facteurs impliqués dans ce mécanisme d'adressage au protéasome restaient à déterminer : est-ce que les autres partenaires du complexe RQC (Ltn1, Rqc1 et Rqc2) participent à cette escorte au protéasome? Existe-t-il d'autres facteurs capables d'adresser les protéines aberrantes à la dégradation en absence du complexe RQC?

De manière à répondre à plusieurs de ces questions, nous avons construit un rapporteur aberrant Non-Stop portant une étiquette TAP (Rigaut et al., 1999), appelé "TAP-NonStop" (voir **Figure 23A**), qui permet de purifier ce peptide naissant aberrant et d'identifier les protéines auxquelles il est associé en absence de différents partenaires du système de contrôle qualité de la traduction (notamment Ski2, Cdc48, et Rqc1) afin de stabiliser plusieurs intermédiaires de ce processus. Ces purifications d'affinité du TAP-NonStop couplées à un Western blot avec des anticorps αUbiquitine nous ont notamment permis de montrer que le smear de TAP-NonStop apparaissant dans la fraction 60S d'un gradient de polysomes, spécifiquement en absence de Ski2 et de Cdc48, correspond effectivement à des chaînes de polyubiquitine (Defenouillère et al., 2013). Cependant, les analyses par

spectrométrie de masse des éluats de ces purifications du TAP-NonStop n'ont pas permis de détecter des facteurs impliqués dans le contrôle qualité de la traduction (notamment Ltn1, Rqc1 et Rqc2), probablement car l'enrichissement des complexes liés au TAP-NonStop n'était pas assez spécifique. C'est la raison pour laquelle j'ai mis au point un protocole de purification d'affinité du TAP-NonStop couplée à une ultracentrifugation sur gradient de sucrose de l'éluat TEV (voir **Figure 23B**), qui permet d'isoler spécifiquement les fractions de forte sédimentation, contenant notamment les ribosomes et les protéasomes, des fractions de faible sédimentation qui contiennent la majorité des contaminants de purification (anticorps, protéase TEV, et protéines fortement abondantes chez *Saccharomyces cerevisiae*). En théorie, ce fractionnement des différents complexes associés au TAP-NonStop permet d'améliorer l'identification par spectrométrie de masse des protéines spécifiques mais peu abondantes, car chaque fraction est moins complexe au niveau de sa composition en protéines. De plus, les protéines contaminantes sont souvent très abondantes et ont tendance à perturber l'identification par spectrométrie de masse d'autres protéines spécifiquement enrichies mais moins abondantes : par conséquent, la séparation de ces protéines enrichies par rapport aux contaminants permet d'optimiser la détection de leurs peptides spécifiquement.

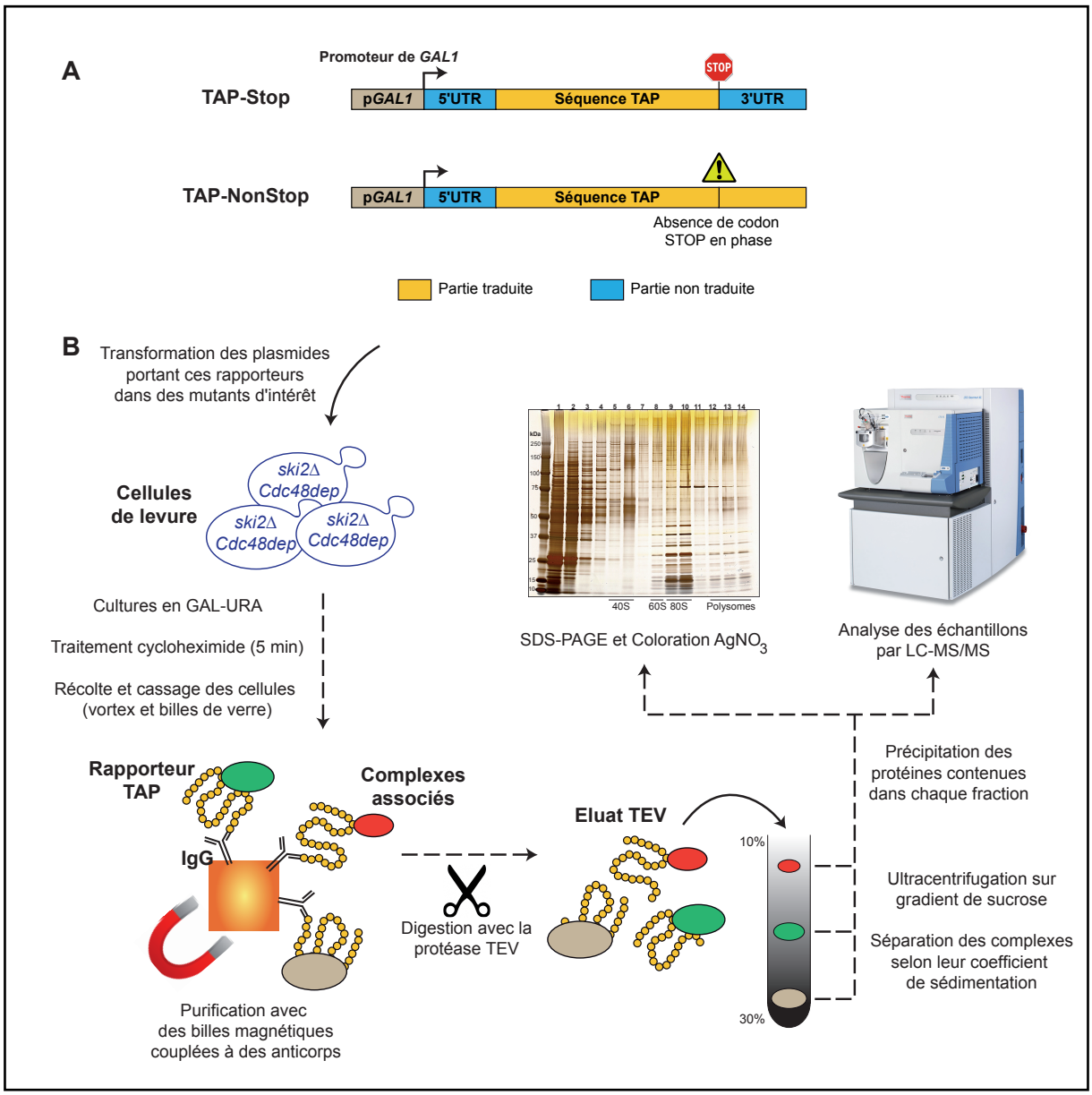


Figure 23. Constructions utilisées et protocole de purification sur gradient
(**A**) Schéma des rapporteurs TAP-Stop et TAP-NonStop
(**B**) Détail du protocole de purification d'affinité couplée à une ultracentrifugation sur gradient de sucrose (Gel $AgNO_3$: purification du TAP-NonStop en *ski2Δ Cdc48dep.*)

Ce protocole de purification sur gradient de sucrose a tout d'abord été testé en utilisant une souche délétée pour *SKI2* et déplétée de Cdc48 (*ski2Δ Cdc48dep.*), pour laquelle le profil de sédimentation du TAP-NonStop avait été précédemment caractérisé: dans ce double mutant, le TAP-NonStop s'accumule majoritairement au niveau des fractions 60S et 80S, et une faible proportion peut également être observée au niveau des fractions libres (Defenouillère et al., 2013). De plus, un smear correspondant à la forme polyubiquitinylée est visible spécifiquement au

niveau des fractions 60S. Le gel coloré au nitrate d'argent à partir des échantillons issus de cette purification sur gradient (**Figure 24A**) est en corrélation avec ce profil d'accumulation du TAP-NonStop dans ce double mutant : en effet, on observe au niveau des fractions 60S et 80S (8 et 9-10) un enrichissement en protéines ribosomiques ainsi qu'en protéines de plus haut poids moléculaire, alors que d'autres protéines co-sédimentent dans les fractions de plus faible coefficient de sédimentation (fractions "légères" 3-4). Les fractions 1-2 contiennent principalement des contaminants de purification tels que la protéase TEV et les chaînes d'IgG, enfin on peut apercevoir une petite quantité de TAP-NonStop liées aux polysomes dans les fractions 12-13-14.

Afin de déterminer dans quelle(s) fraction(s) du gradient les facteurs du complexe RQC pouvaient être enrichis après purification avec le TAP-NonStop, nous avons analysé différentes fractions de ce gradient par spectrométrie de masse (LC-MS/MS), notamment les fractions 60S, 80S, les fractions légères (3-4) ainsi qu'un aliquot de l'éluat TEV avant ultracentrifugation de manière à avoir un contrôle des protéines enrichies après immunoprécipitation. La comparaison des protéines identifiées entre les fractions 60S et 80S montre un fort enrichissement des protéines ribosomiques de la grande sous-unité (Rpl) dans les deux échantillons, alors que les Rps sont principalement enrichies au niveau du 80S (**Figure 24B**). De plus, la fraction 60S révèle un enrichissement spécifique des facteurs Rqc1, Rqc2 et Ltn1, ce qui d'une part suggère que ces protéines reconnaissent le peptide naissant aberrant uniquement après la dissociation du 80S bloqué car leur enrichissement est faible ou nul dans la fraction 80S, et d'autre part apporte une preuve directe *in vivo* que le complexe RQC s'associe aux particules 60S bloquées suite à la traduction d'ARN messagers aberrants "Non-Stop". De manière intéressante, on observe également un enrichissement des facteurs de dissociation des ribosomes bloqués Dom34 et Rli1 dans ces deux fractions 60S et 80S ; on peut donc supposer qu'à cette étape du processus de contrôle qualité, Hbs1 a déjà été recyclé et remplacé par le facteur de dissociation Rli1/ABCE1 (Shoemaker and Green, 2011). Ce résultat est important car il apporte plusieurs éléments de réponse concernant les mécanismes de NSD et de NGD : (1) comme montré précédemment (Tsuboi et al., 2012), ce sont effectivement Dom34 et Rli1 qui sont recrutés sur les ribosomes bloqués sur un transcrit "Non-Stop" chez *Saccharomyces cerevisiae* pour permettre leur dissociation, et non Ski7

comme il avait été initialement proposé, (2) les facteurs Dom34 et Rli1 sont capables de se lier aux ribosomes bloqués et de les dissocier indépendemment de la présence du complexe SKI (étant donné que cette purification a été réalisée dans un mutant *ski*2Δ pour lequel le complexe SKI est non fonctionnel) et (3) alors que les études portant sur le devenir d'eRF1 et Rli1/ABCE1 après dissociation du 80S lors de la terminaison canonique de la traduction ont mené à des conclusions contradictoires (certaines suggérant un recyclage immédiat de ces facteurs, une autre proposant qu'ils resteraient liés à la 30S après recyclage de la 50S chez les archées (Barthelme et al., 2011)), nos résultats suggèrent que dans le cas du Non-Stop mRNA Decay, Dom34 et Rli1 restent associés à la 60S bloquée après dissociation du 80S. Enfin, l'enrichissement en Ubiquitine, plus important dans la fraction 60S que la fraction 80S, est en corrélation avec la présence du smear de polyubiquitines visible spécifiquement au niveau de la fraction 60S en Western blot (Defenouillère et al., 2013).

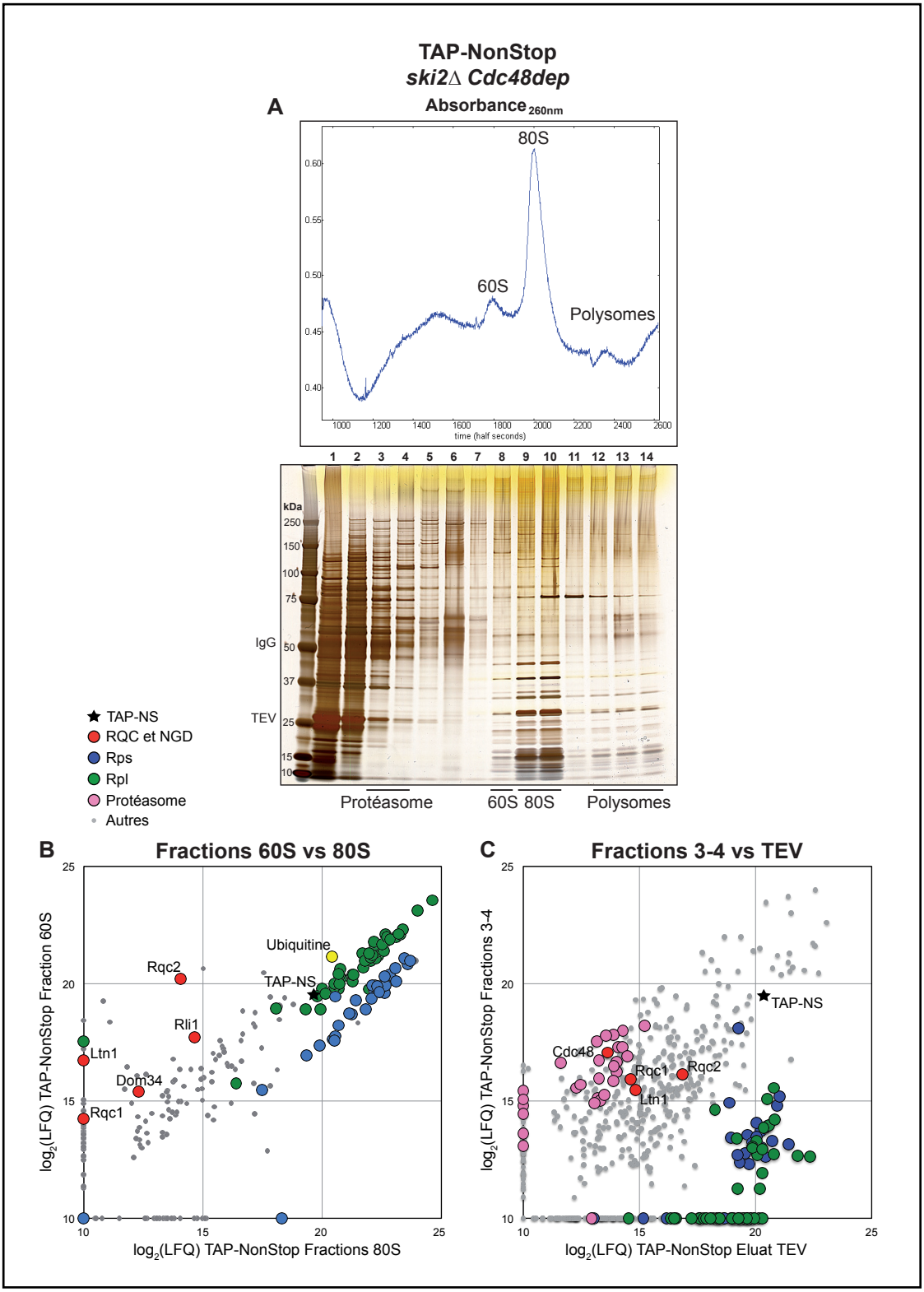


Figure 24. Le complexe RQC est associé aux protéines aberrantes sur la 60S bloquée et dans les fractions protéasomales d'un gradient de sucrose

(**A**) Profil de sédimentation (Absorbance à 260nm) et gel coloré au nitrate d'argent de la purification sur gradient du TAP-NonStop en *ski2*Δ et déplétion de Cdc48. Identification par LC-MS/MS et quantification des protéines contenues dans les fractions 60S et 80S (**B**) et dans les fractions 3-4 face au contrôle "Éluat TEV" (**C**)
Note : LFQ = Label Free Quantification (voir Cox et al., 2014)

En parallèle de ces fractions ribosomiques, nous avons également analysé la composition en protéines des fractions de faible sédimentation (Fractions 3-4) afin de déterminer si des facteurs de contrôle qualité, notamment le complexe RQC, pouvaient rester associés au TAP-NonStop après extraction du tunnel de sortie de la 60S, en utilisant comme comparatif d'enrichissement une analyse de l'éluat TEV. De manière surprenante, cette comparaison a révélé la présence des facteurs Rqc1, Rqc2 et Ltn1 dans les fractions légères, ainsi que Cdc48 (**Figure 24C**), dont la présence peut s'expliquer par la forte abondance de cette protéine dans les fractions de faible sédimentation (Defenouillère et al., 2013), et par une haute affinité d'association de Cdc48 avec les protéines aberrantes "Non-Stop" malgré la déplétion de ce facteur. De plus, tandis que les protéines ribosomiques (Rpl et Rps), Dom34 et Rli1 n'étaient pas enrichies dans ces fractions de faible sédimentation, nous avons observé un enrichissement de nombreuses sous-unités du protéasome (points roses sur le graphe de la **Figure 24C**). Par ailleurs, il est intéressant de remarquer l'absence dans ces échantillons des facteurs Ufd1 et Npl4, co-facteurs de Cdc48 normalement présents lors d'un enrichissement du complexe RQC : cela pourrait être une conséquence de la déplétion de Cdc48, facteur nécessaire à leur association au complexe RQC, qui est lui-même non détecté ou à un niveau très faible dans ces analyses. Ces résultats montrent que le complexe RQC (Rqc1-Rqc2-Ltn1-Cdc48) existe également sous une forme "libre" indépendamment de la 60S *in vivo* et que ces facteurs de contrôle qualité restent associés au peptide aberrant TAP-NonStop après son extraction de la 60S, ce qui suggère que le complexe RQC participe à l'adressage des protéines aberrantes "Non-Stop" au protéasome pour qu'elles soient dégradées.

On peut donc supposer que la déplétion de Cdc48 stabilise non seulement les peptides naissants polyubiquitinylés au niveau de la 60S bloquée, mais stabilise également un intermédiaire du mécanisme d'escorte de ces substrats au protéasome. En effet, étant donné l'importance de Cdc48 pour l'escorte des substrats polyubiquitinylés aux machineries de dégradation des protéines (Richly et al., 2005), sa déplétion rend le processus d'adressage au protéasome inefficace, ce qui pourrait expliquer l'accumulation des facteurs Rqc1, Rqc2 et Ltn1 associés au TAP-NonStop dans des fractions de faible sédimentation du gradient. Cependant, ce phénomène résultant de la déplétion de Cdc48 soulève une question majeure :

compte tenu du modèle actuel qui propose que l'hexamère de Cdc48 se lie à la 60S bloquée et hydrolyse de l'ATP pour extraire le peptide naissant aberrant du tunnel de sortie, comment peut-on expliquer qu'en absence de Cdc48 ces peptides aberrants puissent être extraits du 60S et ainsi s'accumuler dans les fractions non ribosomiques? Une possibilité est que la liaison peptidyl-ARNt soit hydrolysée de manière indépendante de Cdc48, et qu'une fois désolidarisé de l'ARNt, ce peptide puisse être extrait du tunnel de sortie de la 60S même en absence de Cdc48. Dans ce modèle, le rôle de l'hexamère de Cdc48 serait principalement d'accélérer l'extraction des peptides aberrants pour optimiser leur adressage au protéasome. Cependant, la découverte du rôle de Rqc2, qui se lie au niveau de l'ARNt contenu dans le site P et coordonne l'addition de CAT tails au peptide naissant (Shen et al., 2015), suggère d'autres possibilités. En effet, la reprise de l'élongation de la traduction par l'ajout d'alanines et de thréonines à l'extrémité C-terminale du peptide aberrant rend le système beaucoup plus dynamique que la vision statique d'un peptidyl-ARNt immobile dans le tunnel de sortie (voir **4.4** de l'introduction), ce qui pourrait favoriser son extraction par d'autres mécanismes que Cdc48.

3 - Systèmes de contrôle qualité éliminant les agrégats protéiques non adressés au protéasome par le complexe RQC

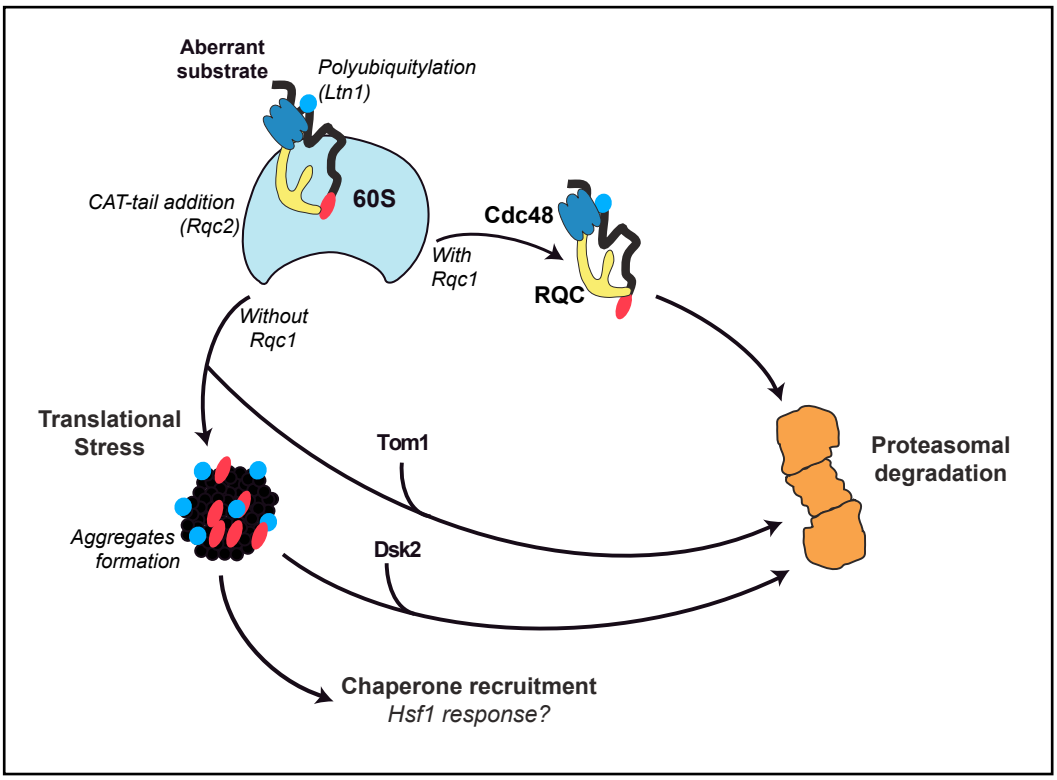
En parallèle de la découverte de l'existence du complexe RQC libre durant l'adressage des substrats aberrants au protéasome, nous avons identifié un nouveau phénotype spécifique du mutant *rqc1*∆ : en absence de Rqc1, la majorité des protéines aberrantes s'accumulent dans le gel de concentration (stacking gel) lors d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide, au lieu de migrer à la taille théorique (la protéine TAP-NonStop fait environ 30 kDa). Ces formes de haut poids moléculaire du TAP-NonStop (appelées HMW) correspondent en réalité à des agrégats de protéines aberrantes, qui co-sédimentent dans les mêmes fractions d'un gradient de sucrose que le complexe RQC libre associé au TAP-NonStop. Ces résultats, suggérant qu'une déficience du processus d'adressage au protéasome *via* le complexe RQC pouvait mener à la formation d'agrégats protéiques, font l'objet d'un manuscrit présenté ci-dessous, que nous avons récemment soumis au journal *Molecular Cell* pour publication.

Dans cette étude, nous avons caractérisé la forme libre du complexe RQC, tout d'abord grâce à des purifications sur gradient en utilisant le TAP-NonStop comme appât (**Figures 2** et **S1**) puis en utilisant Rqc1-TAP, une forme de Rqc1 portant une étiquette TAP en C-terminal qui s'accumule dans les fractions de faible sédimentation d'un gradient de polysomes après déplétion de Cdc48 (**Figure 3**). Ces expériences ont montré que l'enrichissement du complexe RQC ainsi que du protéasome dans les fractions légères du gradient était spécifique du processus de contrôle qualité des protéines aberrantes "Non-Stop", car aucun enrichissement de ces complexes n'était visible après purification sur gradient du contrôle négatif TAP-Stop (rapporteur présenté dans la **Figure 23A** de la **Partie 2**).

En parallèle, une étude des formes agrégées du TAP-NonStop qui apparaissent dans ces mêmes fractions légères du gradient spécifiquement en absence de Rqc1 a conduit à plusieurs conclusions : tout d'abord, ces agrégats de protéines aberrantes sont également éliminés par le protéasome (**Figure 1**). De plus, ces agrégats contiennent des chaînes de polyubiquitine, dont la présence dépend de l'activité de l'E3 ubiquitine ligase Ltn1, cependant le processus de polyubiquitinylation par Ltn1 n'est pas requis pour l'agrégation (**Figure 4**). Enfin, la présence de Rqc2 est essentielle à la formation de ces agrégats, ce qui suggère que l'ajout de CAT tails par Rqc2 en C-terminal des peptides naissants aberrants peut conduire à leur agrégation en absence de Rqc1 (**Figure 4**). L'une des fonctions de Rqc1 serait donc de prévenir l'agrégation des protéines contenant des CAT tails pour optimiser leur élimination par le protéasome et ainsi éviter leur accumulation sous formes d'agrégats cellulaires potentiellement toxiques.

Au delà de la caractérisation du rôle du complexe RQC dans l'élimination des peptides naissants aberrants et dans la prévention de leur agrégation, nous avons découvert au cours de cette étude d'autres facteurs de contrôle qualité capables d'adresser ces protéines aberrantes au protéasome lorsque certains composants du complexe RQC sont délétés ou déficients. Tout d'abord, l'E3 ubiquitine ligase Tom1 est capable d'interagir physiquement avec le complexe RQC libre lorsque Cdc48 est déplété (**Figure 3**) pour faciliter l'élimination des protéines aberrantes par le protéasome, permettant ainsi de limiter l'accumulation d'agrégats protéiques dans le cytosol (**Figures 4** et **5**). Ensuite, une analyse de la composition en protéines des agrégats en absence de Rqc1 a permis d'identifier plusieurs chaperonnes et co-

chaperonnes dont Ssa1/2, Hsp82, Sis1 et Sgt2 (**Figure S4**), connues pour participer au contrôle qualité de protéines défectueuses s'accumulant dans le cytosol ou dans l'agrésome (voir **Figure 19** et paragraphe **6.3** de l'introduction). Ce réseau de chaperonnes pourrait avoir un rôle important pour le repliement des protéines agrégées, la prévention de l'expansion des agrégats et la mise en place de la réponse Hsf1 au stress traductionnel, conséquence connue d'une déficience du complexe RQC (Brandman et al., 2012). Enfin, l'étude de la dynamique de formation de l'agrésome en absence de Rqc1 et de Tom1 a révélé que le facteur d'adressage au protéasome Dsk2, capable à la fois d'interagir avec les chaînes de polyubiquitine et le protéasome (Funakoshi et al., 2002), pouvait être recruté sur les formes solubles et agrégées du TAP-NonStop, et permettre leur élimination par le protéasome (**Figures 2** et **6**). La polyubiquitinylation des produits aberrants de la traduction par Ltn1 est essentielle à la fois pour l'interaction entre le complexe RQC et Tom1 (**Figure S2**) et pour le recrutement de Dsk2 sur l'agrésome (**Figure 6**), ce qui souligne la place prépondérante occupée par Ltn1 dans la mise en place de ces différentes voies d'adressage des protéines aberrantes au protéasome. Un abstract graphique résumant les principaux résultats décrits dans ce manuscrit est présenté ci-après.



Abstract graphique du manuscrit soumis pour publication à *Molecular Cell*

Le complexe RQC participe à l'escorte des protéines aberrantes au protéasome, qui ont tendance à former des agrégats protéiques lorsque Rqc1 est absent ou déficient. Le recrutement de Tom1 sur le complexe RQC libre et de Dsk2 sur ces agrégats permet l'élimination des protéines aberrantes pour limiter l'expansion de l'agrésome. L'interaction de chaperonnes pourrait induire la réponse Hsf1 au stress traductionnel.

Multiple quality control pathways eliminate aberrant proteins that form aggregates when they fail to be degraded *via* the RQC complex

Quentin Defenouillère[1,2], Abdelkader Namane[1], John Mouaikel[1], Alain Jacquier[1] and Micheline Fromont-Racine[1,#]

Running title: ***Proteasomal targeting of aberrant peptides***

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

[2] Sorbonne Universités, UPMC Paris 6, Complexité Du Vivant, 75252 Paris Cedex 05, France

[#] To whom correspondence should be addressed: mfromont@pasteur.fr

Summary

Translational quality control mechanisms detect and eliminate aberrant translation products to maintain protein homeostasis. Proteins synthesized from aberrant transcripts causing translational arrest are degraded *via* a pathway involving the Ribosome-bound Quality Control complex, composed of Ltn1, Rqc1, Rqc2 and Cdc48. Aberrant nascent peptides are polyubiquitylated by Ltn1 and extracted from the 60S exit tunnel by ATPase Cdc48, which ultimately targets them to proteasomal degradation.

Here we show that the entire RQC complex participates in the escort of these substrates to the proteasome, and that Rqc1 prevents the aggregation of aberrant proteins. A deficiency of Rqc1 triggered both the recruitment of Tom1 on the RQC complex and the binding of Dsk2 to aberrant proteins to ensure their proteasomal targeting, thus preventing further aggregation. This study reveals that translational quality control is not limited to the RQC complex, but integrates multiple pathways that ensure aberrant peptide degradation to limit protein aggregation.

Introduction

Protein homeostasis in eukaryotic cells is maintained by quality control pathways that ensure the recognition and the degradation of defective translation products. While misfolded proteins are detected and refolded by a network of molecular chaperones, 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 non functional and are prone to aggregation. However in the presence of a translational stress, the rapid increase of misfolded and aberrant proteins often leads to the accumulation of cytoplasmic aggregates (for review see Richter *et al.*, 2010). It has been shown that these protein aggregates can be transported *via* the microtubules network to a deposit called the aggresome (Johnston *et al.*, 1998), 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 (Kopito, 2000).

Defective proteins can appear in several cellular compartments and are eliminated by specific quality control mechanisms (for review see Nielsen *et al.*, 2014). In the cytosol, accumulation of aberrant proteins can result from the translation of aberrant mRNAs, such as Non-Sense transcripts that are degraded by the Non-Sense mediated mRNA decay (for review see Nicholson *et al.*, 2010) or aberrant mRNAs that can trigger ribosome stalling during translation elongation. Two types of aberrant transcripts causing translational arrest have been identified: mRNAs lacking a STOP codon (Non-Stop mRNAs) (van Hoof *et al.*, 2002) for which ribosome stalling is caused by the translation of their poly(A) tail into a highly charged poly-lysine (Dimitrova *et al.*, 2009) and mRNAs carrying a sequence or a structure that prevents elongating ribosomes from reaching the canonical termination codon (No-Go mRNAs) (Doma and Parker, 2006). In both cases, stalled ribosomes are dissociated by the Dom34-Hbs1 heterodimer and aberrant transcripts are degraded *via* the recruitment of the SKI complex, Ski7, the cytoplasmic exosome and Xrn1 (Doma and Parker, 2006; van Hoof *et al.*, 2002; Tsuboi *et al.*, 2012).

After ribosome dissociation, the exit tunnel of the 60S subunit still contains an aberrant nascent peptide bound to a tRNA that needs to be degraded to prevent the accumulation of defective translation products. Recent studies revealed that these stalled 60S were detected and targeted to proteasomal degradation by the Ribosome-bound Quality Control complex (RQC), composed of the RING domain E3 ubiquitin ligase Ltn1, the factors Rqc1 and Rqc2, a hexamer of Cdc48 and its factors Npl4 and Ufd1 (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013). Rqc2 binds to the 60S intersubunit surface, senses the tRNA in the P-site of the stalled 60S (Lyumkis *et al.*, 2014) and coordinates the recruitment of Alanyl- and Threonyl-tRNAs in the A-site to add a C-terminus Alanine/Threonine tail (CAT-tail) to the nascent peptide that is important to trigger the Hsf1 response to translational stress (Shen *et al.*, 2015). The E3 ubiquitin ligase Ltn1 spans from the Rqc2 binding region to the 60S exit tunnel and performs the polyubiquitylation of the aberrant peptide (Bengtson and Joazeiro, 2010; Lyumkis *et al.*, 2014; Shao *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2015). This enables the recruitment of Cdc48 that hydrolyses ATP to extract the aberrant substrate from the 60S exit tunnel and to escort it to the proteasome for degradation (Defenouillère *et al.*, 2013; Verma *et al.*, 2013). Whereas Rqc1 is not involved in the polyubiquitination process, it is required for Cdc48 recruitment on the 60S ribosomal subunit, and therefore essential for efficient degradation of these aberrant proteins (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013).

Although the mechanistic steps between stalled 80S dissociation and aberrant peptide extraction from the 60S have been partly described, the downstream events leading to proteasomal delivery and degradation of the aberrant peptide remain to be elucidated. After its extraction from the 60S, it is not clear whether the aberrant nascent peptide is escorted to the proteasome only by Cdc48, or if other factors such as Ltn1, Rqc1 and Rqc2 also stay associated during proteasomal targeting. In addition, whether additional factors are recruited and also participate in this process remains unknown. Furthermore, rapid accumulation of defective proteins in case of stress often results in a saturation of quality control mechanisms (Tyedmers *et al.*, 2010) and the fate of aberrant translation products in the absence of a functional RQC complex is yet to be determined.

In this study, we show that Rqc1 prevents the aggregation of aberrant proteins, which can only form in the presence of Rqc2. We also show that the RQC complex exists as a free complex, and interacts with the E3 ubiquitin ligase Tom1 to facilitate the degradation aberrant peptides, thus preventing further protein aggregation. When this Tom1-mediated quality control pathway is impaired, the aggregated forms of aberrant peptides are targeted to the aggresome where the proteasome-recruiting factor Dsk2 triggers their degradation to limit aggresome expansion. This work reveals mechanistic features of proteasomal targeting by the RQC complex, and shows that multiple quality control pathways can participate in the degradation of aberrant translation products.

Results

Deletion of Rqc1 results in the formation of high molecular weight species of aberrant proteins

Whereas some of the functions of the RQC complex factors have been described, the role of Rqc1 in this complex remains largely elusive. We therefore analyzed the accumulation in a polysome gradient of an aberrant reporter lacking a STOP codon called "TAP-NonStop" (Defenouillère *et al.*, 2013) in *rqc1*Δ cells. Surprisingly, in addition to the previously observed sedimentation of the TAP-NonStop in ribosomal fractions, blotting of both lower and stacking acrylamide gels revealed the presence of high molecular weight species (HMW) of aberrant proteins accumulating in the stacking gel specifically in the absence of Rqc1 compared to a wild type strain (**Figure 1A**). Since aberrant Non-Stop proteins are known to be polyubiquitinated by Ltn1 and targeted to the proteasome for degradation (Bengtson and Joazeiro, 2010), we wondered if these HMW species were also degraded by the proteasome or by a different process. To analyze this, we impaired proteasomal degradation using the proteasome inhibitor MG-132, in the presence or the absence of Rqc1. Whereas no HMW forms of the TAP-NonStop accumulated upon proteasome inhibition when Rqc1 was present, their accumulation was strongly increased in *rqc1*Δ cells (**Fig. 1B**), demonstrating that HMW species of aberrant proteins are also proteasomal substrates, but never form in the presence of Rqc1 even when the proteasome is impaired. This suggests that Rqc1 prevents the formation of HMW forms of aberrant proteins even when these substrates are not efficiently eliminated by the proteasome.

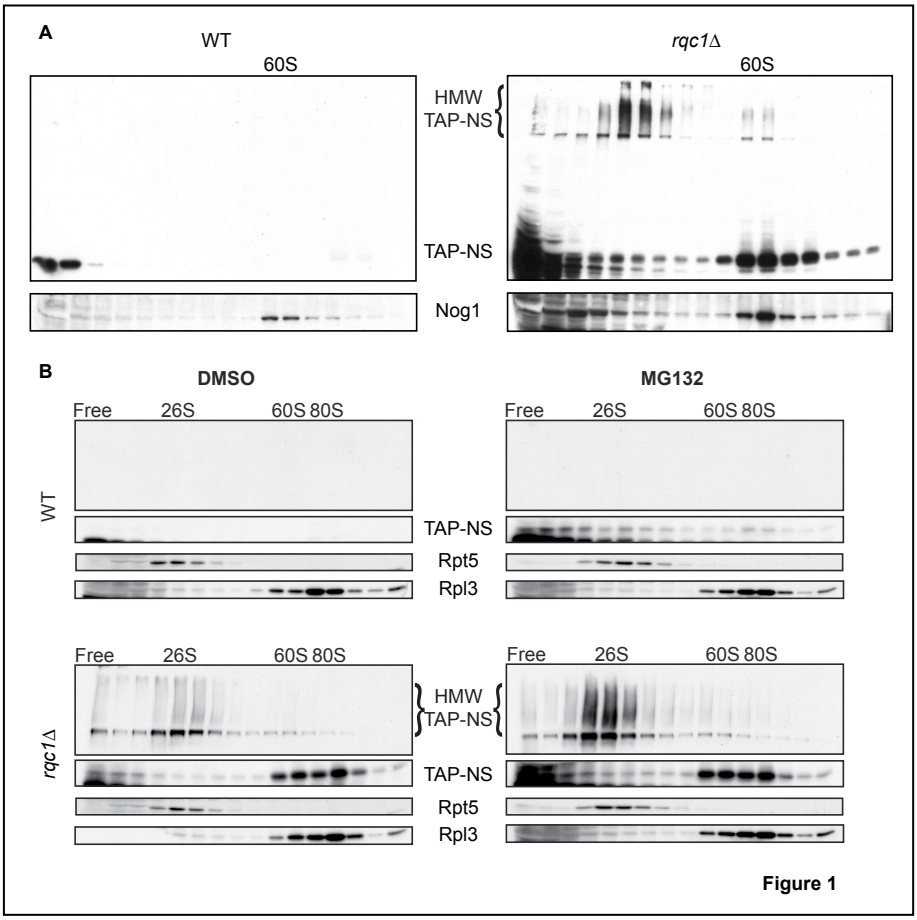


Fig. 1 HMW forms of TAP-NS accumulate in the absence of Rqc1 and are degraded by the proteasome
(A) Polysome extracts from WT and *rqc1*Δ transformed with the TAP-NS reporter gene were separated by their sedimentation coefficient on a sucrose gradient (10-50%). Proteins of each fraction were TCA-precipitated and separated on a 10% polyacrylamide gel. Stacking and running parts of the gel were analyzed by Western blot using antibodies against TAP. The antibody against Nog1 indicates the 60S subunit fractions. (B) Polysome extracts from WT or *rqc1*Δ strains transformed with the TAP-NS reporter gene-containing plasmid were separated and analyzed as in (A), but were previously treated with MG132 or with DMSO as a negative control. The antibodies against Rpt5 and Rpl3 indicate the proteasome and the 60S subunit fractions respectively.

The entire RQC complex participates in the escort of aberrant proteins to the proteasome for their degradation

A particular feature of these HMW forms of aberrant proteins is that they accumulate in low-sedimenting fractions of the polysome gradient, whereas aberrant proteins were previously observed in ribosomal fractions for mutants of the RQC complex (Bengtson and Joazeiro, 2010; Defenouillère *et al.*, 2013). In addition, low-sedimenting fractions also contained a subset of canonical molecular weight TAP-NonStop (**Figure 1A**), that could be intermediates of the proteasomal targeting pathway. In order to better understand the role of Rqc1 in this proteasomal escort, we affinity-purified the TAP-NonStop reporter (Rigaut *et al.*, 1999) upon Cdc48 depletion to optimize the stabilization of this aberrant protein, in the presence or absence of Rqc1. Eluates were loaded on sucrose gradients to separate low-sedimenting HMW forms (sedimenting in fractions here called “light fractions”) of the TAP-NonStop from ribosome-bound forms, and the fractionated samples were analyzed by gel silver staining (**Fig. 2A**). Whereas the 80S-sedimenting eluates were very similar with or without Rqc1, the purified 60S were more abundant in the absence of Rqc1, which correlates with the accumulation of the TAP-NonStop at the 60S level in *rqc1*Δ cells (Defenouillère *et al.*, 2013). In addition, a set of proteins was visible in the light fractions of the gradient for both samples: we thus performed a comparative mass spectrometry analysis of these fractions, with or without Rqc1. We identified several proteasome subunits, ubiquitin, as well as the partners of the RQC complex Rqc1, Rqc2, Ltn1 in fractions 4-5 (**Fig. 2B & Dataset. S1**). Interestingly, two additional factors were specifically enriched

in the absence of Rqc1: Dsk2 and Rad23, which are known to bind polyubiquitinated substrates and target them to the proteasome for proteolysis (Funakoshi *et al.*, 2002), which raises the possibility that other proteasomal targeting factors may recognize aberrant proteins in the absence of Rqc1. Fractions 1 to 3 were devoid of these proteins (data not shown) and were not analyzed further.

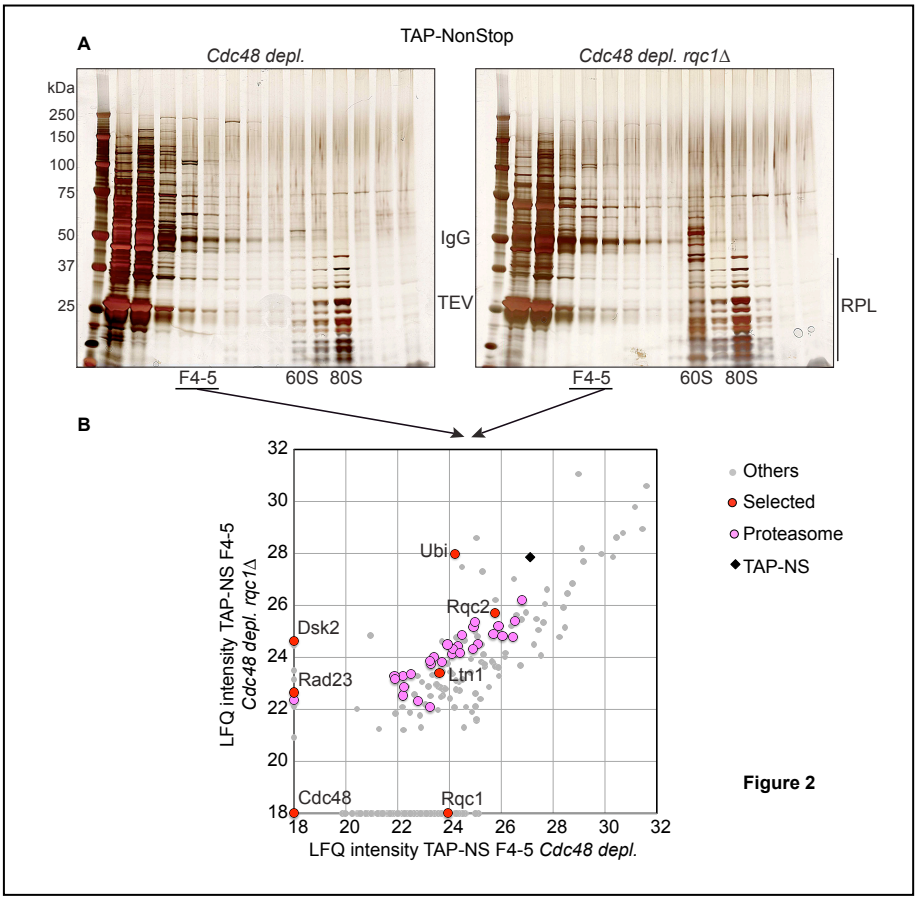


Fig. 2 The RQC complex remains associated to the aberrant nascent peptides during their escort to the proteasome
(A) Affinity purifications of the TAP-NonStop-associated complexes upon depletion of Cdc48 (13h30 with Doxycycline) with or without Rqc1. TEV eluates of TAP-NS affinity purifications in the absence of Rqc1 (right panel) or in the presence of Rqc1 (left panel) were loaded on a sucrose gradient (10/30%). Components of each fraction were separated on a polyacrylamide gel and revealed by silver staining. (B) The proteins associated to TAP-NS complex from low-sedimenting fractions (F4-5) were identified by LC-MS/MS. The graph shows the comparison between the intensities (LFQ) for each protein identified. Each circle indicates an identified protein. The black diamond indicates the TAP-NS bait.

These results show that the entire RQC complex remains associated to aberrant peptides after their extraction from the 60S exit tunnel and suggests that it participates in their proteasomal targeting. Since the RQC complex was only known to co-purify with 60S particles, it is surprising to observe it co-sedimenting with the proteasome in non-ribosomal fractions. To confirm that the presence of proteasome subunits in these RQC-containing fractions was due to an enrichment with the TAP-NonStop and not the result of a non-specific contamination, we performed TAP-NonStop purifications upon Cdc48 depletion, this time in a *ski2*Δ background to stabilize the aberrant reporter mRNA, and used a STOP codon containing reporter (TAP-Stop) as negative control (**Fig. S1A**). The MS analysis revealed the enrichment of proteasome subunits and of Ltn1 and Rqc2 in the TAP-NonStop eluate compared to the control, although this time Rqc1 was below the detection threshold (**Fig. S1B & Dataset. S1**). These results confirm the specific enrichment of these two protein complexes with aberrant proteins and suggest that the RQC complex could participate in the escort of aberrant proteins to the proteasome for efficient proteolysis.

The RQC complex interacts with E3 ubiquitin ligase Tom1 during proteasomal targeting of aberrant substrates

To verify that the accumulation of aberrant peptides associated to the free RQC complex did not depend on the overexpression of an aberrant non-stop reporter, we searched for a TAP-tagged version of an RQC protein that could also accumulate in light fractions of a sucrose gradient in reporter-free cells. We noticed that the Rqc1-TAP fusion, which usually co-sediments with the 60S fraction of a polysome gradient in wild type cells, was accumulating in the light fractions in mutants of other RQC factors (**Fig. 3A**). Interestingly, ubiquitinated forms of Rqc1-TAP were visible in the absence of Cdc48, a phenomenon that is likely due to the autoregulation process of Rqc1 by the RQC complex itself that has been demonstrated to be a consequence of the N-terminal polybasic stretch carried by Rqc1 (Brandman *et al.*, 2012). Since these light fractions corresponded to the sedimenting fractions of HMW species of aberrant proteins that accumulate in the absence of Rqc1, we suspected this Rqc1-TAP fusion to be partially non functional. To test this, we analyzed the accumulation of the TAP-NonStop reporter in Rqc1-TAP cells compared to the *rqc1*Δ mutant, and observed a similar level of HMW species in the two strains (**Fig. 3B**). Although the Rqc1-TAP fusion is functional for 60S-binding and Cdc48 recruitment (Defenouillère *et al.*, 2013), it is defective in proteasomal targeting of aberrant proteins, which results in the formation of HMW forms of the aberrant peptides as in the absence of Rqc1. This phenotype was aggravated upon Cdc48 depletion, revealing a synergistic effect between Rqc1 deficiency and Cdc48 depletion on the accumulation of HMW forms of aberrant proteins. Therefore, in order to dissect the mechanism of proteasomal targeting by the free RQC complex, we used this Rqc1-TAP fusion that enables the stabilization of an intermediate of the degradation pathway to perform affinity purifications upon Cdc48 depletion, using an untagged strain depleted from Cdc48 as a negative control. As previously, eluates were loaded on sucrose gradients to separate the low-sedimenting form of Rqc1-TAP from its 60S-bound version, and the samples were analyzed by gel silver staining (**Fig. 3C**) and mass spectrometry (**Fig. 3D & Dataset. S2**). Whereas the 60S fraction purified with Rqc1-TAP corresponded to the previously described 60S-bound RQC complex (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013), the light fractions also contained the RQC complex (Rqc1, Rqc2, Ltn1), as observed with the TAP-NonStop purifications. Cdc48 was also identified in this sample even though this factor was depleted: this can be due to a high binding affinity between Rqc1-TAP and Cdc48 despite the low cellular abundance of this protein after its depletion. Proteasome subunits were not significantly enriched, however we observed an enrichment of ubiquitin as well as another partner, the E3 ubiquitin ligase Tom1, bound to the RQC complex (**Fig. 3D**, left panel). This high molecular protein (374kDa) was also visible on the silver stained gel for the Rqc1-TAP purification, specifically co-sedimenting with the light fractions (**Fig. 3C**, right panel). Affinity purifications of Rqc1-TAP in several RQC mutants indicated that the binding of Tom1 to the RQC complex could only be seen upon Cdc48 depletion (**Fig. S2A**).

We thus identified Tom1 as an additional E3 ubiquitin ligase able to interact with the RQC complex during an intermediate step of the proteasomal targeting, that we stabilized by using a deficient version of Rqc1 and a depletion of Cdc48. Since the mammalian ortholog of Tom1, Huwe1, contains a UBA domain which is capable of binding polyubiquitin chains (Chen *et al.*, 2005), we tested if the polyubiquitylation process by Ltn1, a crucial step of RQC-associated protein degradation, was essential for Tom1 binding to the RQC complex. Affinity purifications of Rqc1-TAP upon Cdc48 depletion in various mutants revealed that Tom1 is not enriched anymore in the absence of Ltn1 (**Fig. S2A & S2B & Dataset. S3**) or with a mutant of Ltn1 lacking its RING domain (**Fig. S2D & S2E & Dataset. S3**), suggesting that prior ubiquitylation by Ltn1 is essential for Tom1 interaction with the RQC complex. However, the absence of Rqc2 did not affect this interaction (**Fig. S2A & S2C & Dataset. S3**). Altogether, these results suggest that Tom1 interacts with the free RQC complex after polyubiquitylation by Ltn1, but independently from Rqc2, in the context of Cdc48 depletion.

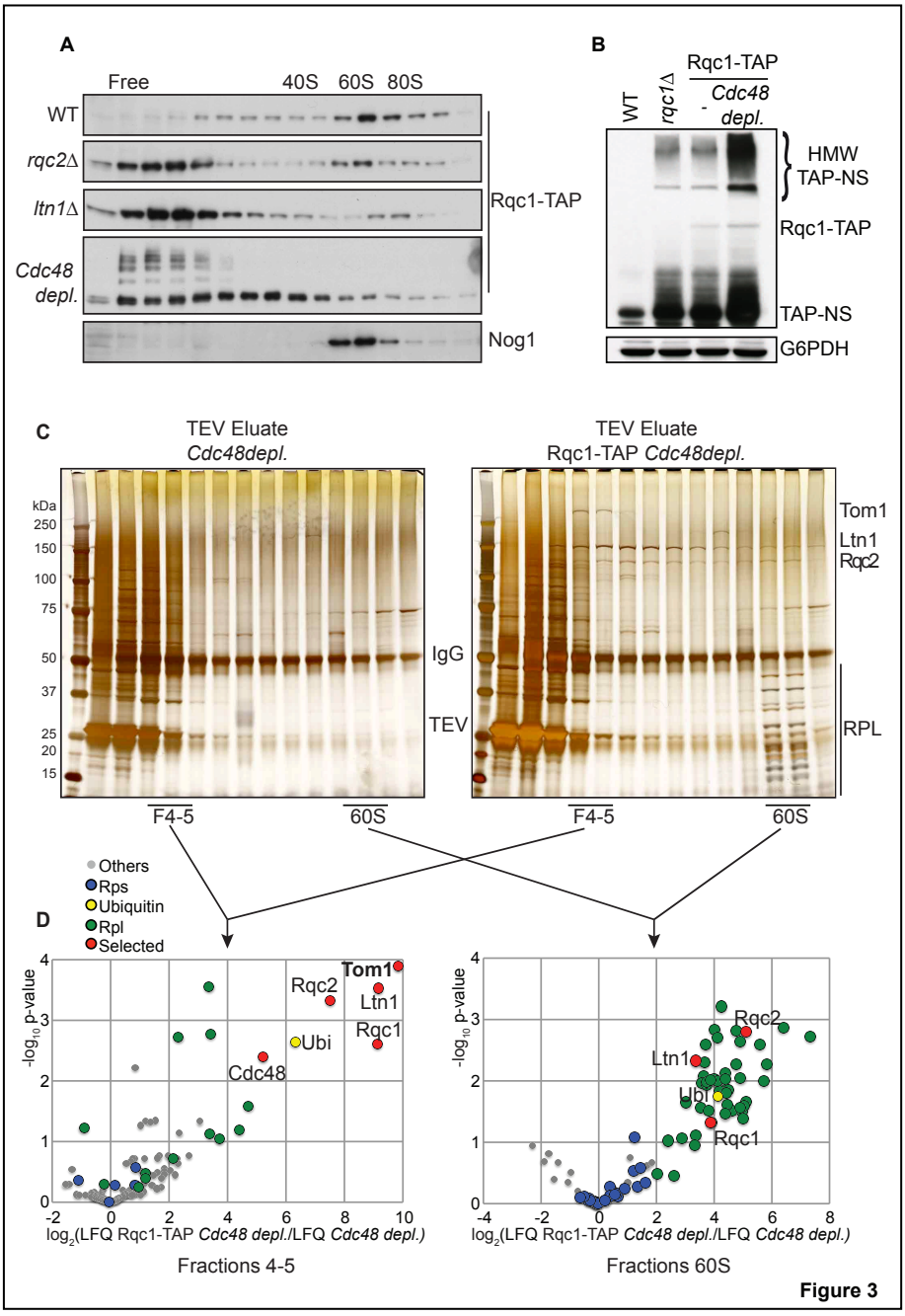


Fig. 3 Tom1 is associated to the free form of the RQC complex upon Cdc48 depletion

(A) Polysome extracts from Rqc1-TAP in WT, *rqc2*Δ, *ltn1*Δ or upon Cdc48 depletion (13h30 with Doxycycline) were separated on a sucrose gradient. Each fraction was analyzed as in Fig. 1A.

(B) Total cellular extract from strains *rqc1*Δ or expressing Rqc1-TAP in WT or upon Cdc48 depletion transformed with the TAP-NS reporter gene-containing plasmid were separated on a polyacrylamide gel and analyzed as in Fig.1A. The antibody against G6PDH was used as loading control.

(C) TEV eluates of Rqc1-TAP affinity purifications upon Cdc48 depletion were loaded on a sucrose gradient (right panel). Components of each fraction were separated on a polyacrylamide gel and revealed by silver staining. TEV eluate from a Cdc48 depleted strain was used as negative control (left panel).

(D) The proteins associated to Rqc1-TAP complex (upon Cdc48 depletion) from low-sedimenting or 60S fractions were identified by LC-MS/MS and quantified by comparison with a no TAP strain depleted of Cdc48. Volcano plot shows the fold change (log2 LFQ Cpx/LFQ ref.) on the x axis and the p-value distribution (-log10 p-value) on the y axis for the proteins identified in the TAP purifications. Each circle indicates an identified protein (in red, the most significant enriched candidates in the TAP purification; in green, the RPLs; in blue, the RPSs, in yellow, Ubiquitin).

Tom1 prevents the accumulation of extended forms of aberrant proteins in the absence of Rqc1

Tom1 is a HECT-domain E3 ubiquitin ligase, which has been described as being involved in the degradation process of specific proteins, notably in the turnover of Dia2 during the cell cycle (Kim *et al.*, MBC 2012), in the stability of Cdc6 after DNA damage (Kim *et al.*, JBC 2012), and in the degradation of excess histones (Singh *et al.*, 2009). To investigate the role of Tom1 when associated with the RQC complex during the escort of aberrant proteins to the proteasome, we assessed the effect of a Tom1 deletion on the accumulation of the TAP-NonStop reporter, but did not observe any stabilization of this aberrant protein (**Fig. 4A**). We also tested if Tom1 could regulate the ubiquitination level of Rqc1-TAP, but could not detect any effect in the absence of Tom1 (data not shown). Since the Rqc1-TAP fusion combined with a Cdc48 depletion generated high amounts of HMW forms of aberrant proteins (**Fig. 3B**), and because Tom1 was sedimenting in the same fractions as these HMW species, we wondered if Tom1 could have a role on the accumulation of HMW aberrant proteins that form in the absence of functional Rqc1. To test this hypothesis, we analyzed the accumulation of the TAP-NonStop in a *tom1*Δ*rqc1*Δ double mutant compared to the *rqc1*Δ mutant, and observed a strong synergistic effect in this double mutant (**Fig. 4A**), revealing that Tom1 becomes important for the degradation of aberrant proteins when Rqc1 is impaired, thus reducing HMW species accumulation. In the absence of Rqc1 and Tom1, HMW species were mainly accumulating in low-sedimenting fractions, however we could detect a subset that was co-sedimenting with the 60S. All together, our data show that aberrant proteins accumulate into high molecular weight species in the absence of Rqc1, and suggest that Tom1 can interact with the RQC complex to trigger a back-up quality control mechanism to ensure the proteasomal degradation of aberrant proteins that are not efficiently degraded when Rqc1 is deficient, and thus preventing their accumulation into HMW species.

Ltn1 activity regulates HMW species polyubiquitination but is not essential for their formation

Since aberrant proteins are usually polyubiquitylated by Ltn1, and because HMW species were also targeted to the proteasome (**Fig. 1B**), we tested if these HMW forms were constituted of polyubiquitinated proteins. We thus performed Western blots on sucrose gradient fractions using an anti-ubiquitin antibody in reporter-free cells lacking Rqc1 and Tom1 (**Fig. 4B**). Whereas no polyubiquitin chain could be detected in the stacking gel in *tom1*Δ cells, extended polyubiquitin chains were visible in the *rqc1*Δ mutant, which confirms that HMW species that form in the absence of Rqc1 are constituted (at least in part) of polyubiquitinated substrates. It also shows that these HMW species can spontaneously appear when Rqc1 is impaired and are not a consequence of the overexpression of the aberrant non-stop reporter. The abundance of polyubiquitin chains in the stacking gel was even higher in the *rqc1*Δ*tom1*Δ double mutant, which correlates with the synergistic effect of Tom1 deletion in the absence of Rqc1. We then tested the importance of Ltn1 and Tom1 polyubiquitylation activities for HMW species formation and ubiquitination. Interestingly, we could not observe any polyubiquitin chains in the stacking gel for the *rqc1*Δ*tom1*Δ*ltn1*Δ triple mutant, revealing that the polyubiquitinated fraction of HMW species is a result of Ltn1 E3 ligase activity during RQC-mediated protein degradation (**Fig. 4B**). Nevertheless, the abundance of HWM forms of the TAP-NonStop reporter was similar in *rqc1*Δ*tom1*Δ and *rqc1*Δ*tom1*Δ*ltn1*Δ mutants (**Fig. S3A**), indicating that the polyubiquitylation of aberrant proteins by Ltn1 is not required for HMW species formation. The use of the *HECT-C3235A tom1* mutant devoid of its E3 Ubiquitin ligase activity (Duncan *et al.*, 2000) revealed that, in contrast to what was observed upon deletion of *TOM1*, there was no additional accumulation of HMW forms of the TAP-NonStop, or any effect on their polyubiquitination level when this mutant was introduced into an *rqc1*Δ background (**Fig. S3B**). Thus, Tom1-mediated clearance of HMW species in the absence of Rqc1 does not rely on the E3 ligase activity of Tom1, which suggests that other functions carried out by this protein are required to perform this process. Therefore, whereas the polyubiquitylation activity of Ltn1 is essential for proteasomal targeting of aberrant proteins, the formation of HMW species that occurs when these substrates are not efficiently degraded is independent of the polyubiquitylation activities of Ltn1 or Tom1.

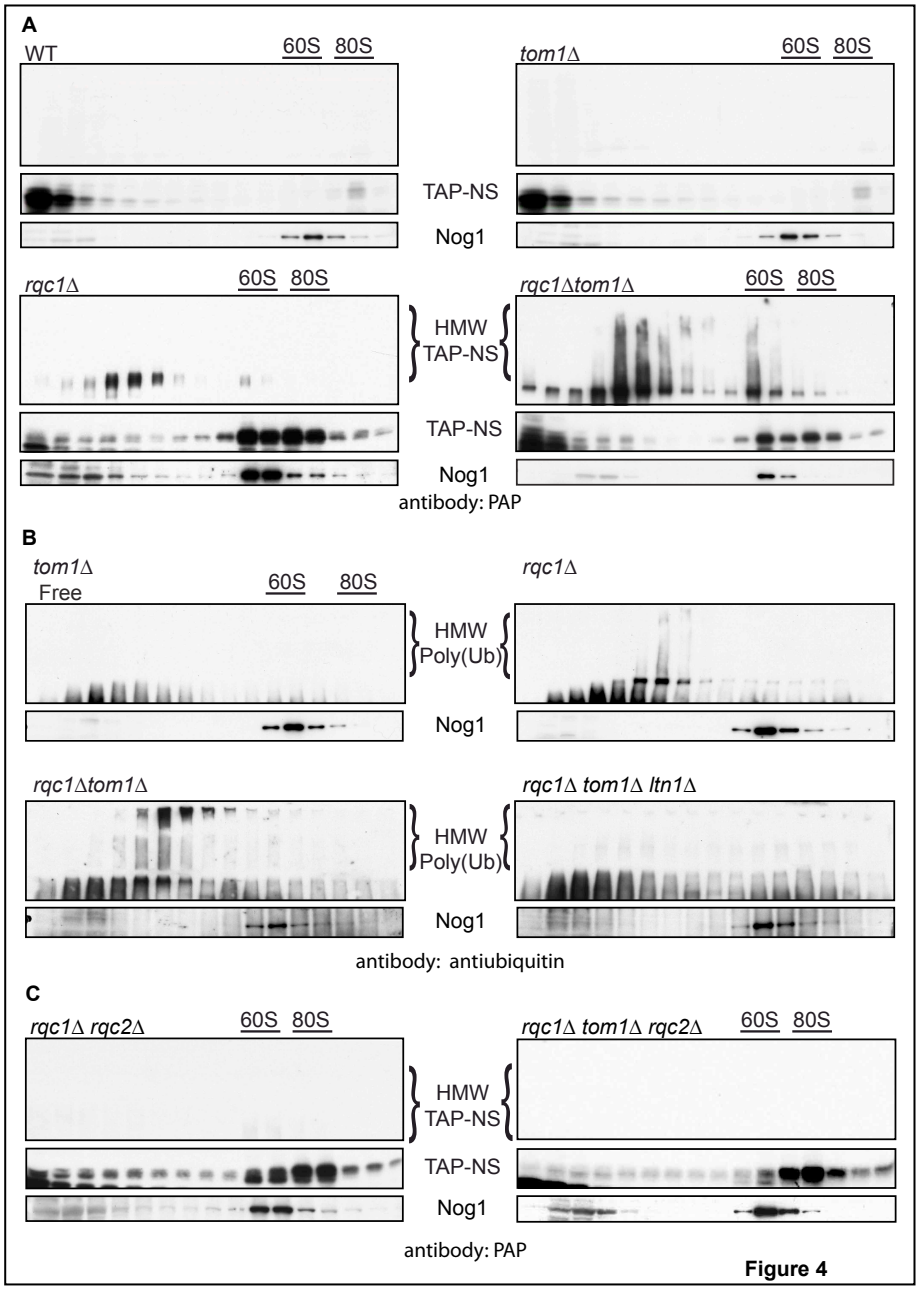


Fig. 4 Tom1 is required for the degradation of polyubiquitinated proteins that aggregate in the absence of Rqc1

(A) Polysome extracts from *tom1Δ, rqc1Δ, rqc1Δtom1Δ* or *rqc1Δtom1Δrqc2Δ* strains expressing the TAP-NS reporter gene were separated on a sucrose gradient and analyzed as in Fig. 1. For each mutant the stacking gel (upper part) and the canonical TAP-NS (middle part) are shown.

(B) Polysome extracts from *tom1Δ, rqc1Δ, rqc1Δtom1Δ* or *rqc1Δtom1Δltn1Δ* were analyzed as in (A). The anti-Ubiquitin antibody (P4D1) revealed the ubiquitinated forms of aggregated endogenous proteins (stacking gel-upper part).

(C) Polysome extracts from *rqc1Δrqc2Δ* and *rqc1Δtom1Δrqc2Δ* transformed with the TAP-NS reporter gene were separated and analyzed as in (A).

Aberrant proteins are prone to aggregation in the absence of Rqc1 and Tom1

Previous studies described polyubiquitinated proteins accumulating in a stacking acrylamide gel as aggregates of sequestered substrates that prevent proteasomal degradation (Maynard *et al.*, 2009; Verhoef *et al.*, 2002). To test if the HMW species accumulating in the absence of Rqc1 and Tom1 corresponded to aggregates of aberrant proteins, we replaced the TAP cassette by a GFP sequence in our Non-Stop reporter and monitored the cellular localization of the GFP-NonStop protein in *rqc1*Δ*tom1*Δ cells by fluorescence microscopy (**Fig. 5**). The green fluorescent signal was weak in wild type and *tom1*Δ cells, an expected result since NSD and RQC pathways are efficiently degrading transcripts lacking a STOP codon and proteins synthesized from these aberrant mRNAs, respectively. In contrast, soluble GFP-NonStop was accumulating in *rqc1*Δ cells, and small foci could also be detected, showing that aggregates of the GFP-NonStop protein can form when Rqc1 is impaired. The GFP-NonStop soluble fraction was similar in *rqc1*Δ*tom1*Δ cells, however the fluorescence intensity and the size of the foci increased dramatically, which shows that the absence of both Rqc1 and Tom1 results in the formation of large aberrant protein aggregates. Interestingly, we could observe several foci per cell for the *rqc1*Δ*tom1*Δ mutant, while *rqc1*Δ cells never contained more than one aggregate (**Fig. 5**). Finally, Hoechst staining revealed that these protein aggregates were localized in the cytoplasm, and were partly juxtanuclear in *rqc1*Δ*tom1*Δ cells. These findings corroborate those obtained using the TAP-NonStop reporter by Western blot in the same mutants (**Fig. 4A**), indicating that aberrant proteins form aggregates when Rqc1 is impaired, and that Tom1 becomes essential for aberrant protein elimination in the absence of Rqc1, hence preventing the expansion of potentially toxic aggregates in the cytoplasm.

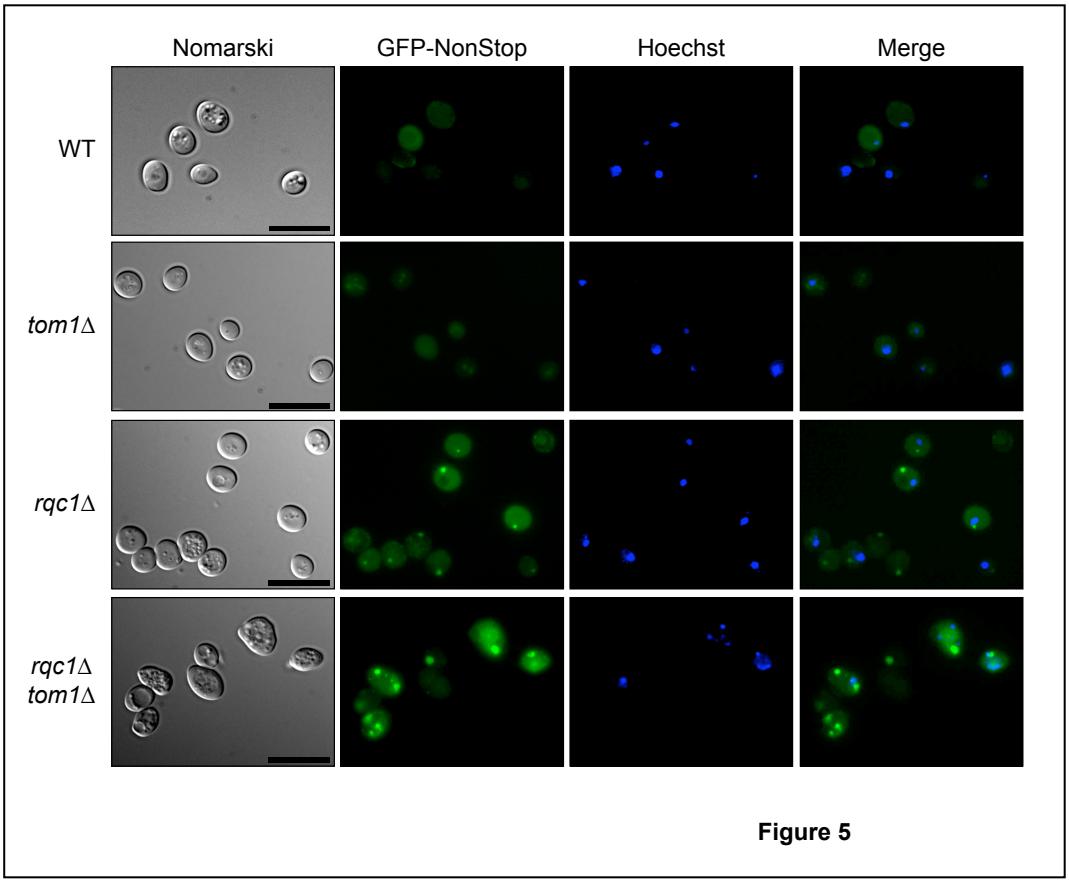


Fig. 5 The absence of Tom1 leads to increased aggregation of the GFP-NS when Rqc1 is defective
WT, *tom1*Δ, *rqc1*Δ or *rqc1*Δ*tom1*Δ strains expressing the GFP-NS reporter gene were analyzed by fluorescence microscopy. Yeast cells are displayed in left column (Nomarski) GFP and Hoechst fluorescent signals are displayed in middle columns and merged in the right column. Scale bar = 15μm.

The formation of aggregates that occurs in the absence of Rqc1 and Tom1 depends on Rqc2

Rqc2 was recently shown to direct the addition of alanine-threonine C-terminal tails (CAT-tails) to aberrant nascent peptides (Shen *et al.*, 2015), yet polyalanine-containing proteins are known to form intracellular aggregates (Rankin *et al.*, 2000). We therefore tested if the activity of Rqc2 in CAT-tails addition could promote the aggregation of aberrant proteins observed in the absence of Rqc1 and Tom1, by assessing the effect of an Rqc2 deletion (*rqc2*∆) on the accumulation of the TAP-NonStop reporter in *rqc1*∆ and *rqc1*∆*tom1*∆ cells by Western blot from sucrose gradient fractions (**Fig. 4C**). Strikingly, the absence of Rqc2 completely hindered the accumulation of protein aggregates even when Rqc1 and Tom1 were absent. This result demonstrates that aberrant protein aggregation that occurs specifically when Rqc1 is impaired strictly depends on the presence of Rqc2, suggesting that CAT-tails addition by Rqc2 could cause aberrant proteins to aggregate. Rqc1 and Rqc2 thus have antagonist effects on protein aggregation, which raises the possibility that following CAT tail addition to an aberrant nascent peptide by Rqc2, Rqc1 may protect this substrate from CAT tail-induced aggregation until it is efficiently targeted to the proteasome for degradation.

Aberrant proteins are targeted to the aggresome and eliminated via Dsk2 in the absence of Rqc1 and Tom1

Taken together, these results show that Tom1 has an essential role for the clearance of aberrant proteins that aggregate when they are not efficiently targeted to the proteasome by the RQC complex. However, several possibilities remain concerning the Tom1 mechanism of action: Tom1 could either be recruited on protein aggregates that form in the absence of Rqc1 and thus mediate their degradation, or could interact with the RQC complex to facilitate proteasomal targeting of aberrant substrates. Concerning the first hypothesis, the recruitment of Tom1 should rely on the formation of protein aggregates, however we showed that the absence of Rqc2 completely impairs aggregate accumulation (**Fig. 4C**) but does not affect RQC-Tom1 interaction (**Fig. S2C**), suggesting that the role of Tom1 in this quality control process is independent from, or at least precedes, the aggregation step. In addition, we extracted the material retained in stacking gels of protein extracts from wild type and *rqc1*∆ cells, in order to identify the proteins enriched in aggregates by mass spectrometry (**Fig. S4**). The t-test revealed a significant enrichment of Ubiquitin, the co-chaperones Sis1 and Sgt2, their associated chaperones Ssa1 and Ssa2 (Lu and Cyr, 1998), as well as Hsp82 in protein aggregates that accumulate in *rqc1*∆ (**Fig. S4 & Dataset. S4**). This indicates that aberrant polyubiquitinated proteins aggregating in the absence of Rqc1 are recognized by a network of chaperones and co-chaperones that could limit aggregate expansion and perform protein refolding. However, Tom1 was not identified in aggregates resulting from the absence of Rqc1, which suggests that Tom1 is not recruited on protein aggregates and rather plays a role upstream of the process, while interacting with the RQC complex, to eliminate soluble aberrant proteins before they form aggregates. The accumulation of protein aggregates in the absence of Rqc1 and Tom1 would thus be a consequence of inefficient proteasomal degradation of soluble aberrant proteins by the RQC complex alone or *via* its interaction with Tom1.

To better understand the fate of protein aggregates in the absence of Rqc1 and Tom1, we performed proteomics analyses using a protocol similar as the one used in **Fig. S4**, except that aggregates were enriched by a sucrose gradient ultracentrifugation before protein extraction from the stacking gels. In addition to Ubiquitin, Sis1 and Sgt2, which were already identified in *rqc1*∆ aggregates, the protein Dsk2 was also significantly enriched in the *rqc1*∆*tom1*∆ double mutant compared to a wild type (**Fig 6A & Dataset. S4**). This factor was already identified with TAP-NonStop purifications in the absence of Rqc1 (**Fig. 2**), suggesting that Dsk2 could have a role in translational quality control when the RQC pathway is impaired. Dsk2 contains a UBA domain capable of binding K48-linked polyubiquitin chains and a UBL domain that interacts physically with the proteasome, and acts as an adaptor between polyubiquitin chains and proteasome moieties to target polyubiquitinated proteins to degradation (Funakoshi *et al.*, 2002). Interestingly, Ubiquitin, Sis1, Sgt2 and Dsk2 were all identified in a previous study focusing on polyglutamine-induced aggregates, in which the authors showed that Sis1, Sgt2 and Dsk2 were associated with a juxtanuclear organelle called the aggresome that forms in case of polyglutamine-induced proteotoxic stress (Wang *et al.*, 2008). Dsk2 requires a polyubiquitin chain to interact with its targets, and since the presence of polyubiquitin in aggregates of aberrant proteins relied on the polyubiquitination activity of Ltn1 (**Fig. 4B**), we compared the protein composition in aggregates of *rqc1*∆*tom1*∆ cells *versus* an *rqc1*∆*tom1*∆*ltn1*∆ triple mutant (**Fig. 6A,**

bottom panel & Dataset. S4). Strikingly, only Ubiquitin and Dsk2 were significantly decreased in the absence of Ltn1, which reveals that polyubiquitination of aberrant proteins by Ltn1 is essential for aggregate recognition by Dsk2. In contrast, the presence of Sis1 and Sgt2 in aggregates was not affected by the deletion of Ltn1. Finally we tested if the deletion of Dsk2 had an impact on RQC- and Tom1-mediated protein quality control pathways by monitoring the accumulation and aggregation levels of the TAP-NonStop reporter protein (**Fig. 6B**). The absence of Dsk2 had no effect on aberrant protein quality control in the presence of Rqc1 and Tom1, suggesting that Dsk2 recruitment on aberrant proteins in *rqc1*Δ (**Fig. 2**) is not the major degradation pathway. In contrast, Dsk2 became essential for the degradation of aggregated aberrant proteins in the *rqc1*Δ*tom1*Δ double mutant, since the accumulation of TAP-NonStop aggregates in the *rqc1*Δ*tom1*Δ*dsk2*Δ triple mutant was much stronger. Taken together, these data reveal a critical role for Dsk2 in aberrant protein elimination when both the RQC complex and Tom1 are impaired, and indicate that protein aggregates that form in the absence of Rqc1 and Tom1 are transported to the aggresome, where they are processed *via* the proteasome-recruiting factor Dsk2.

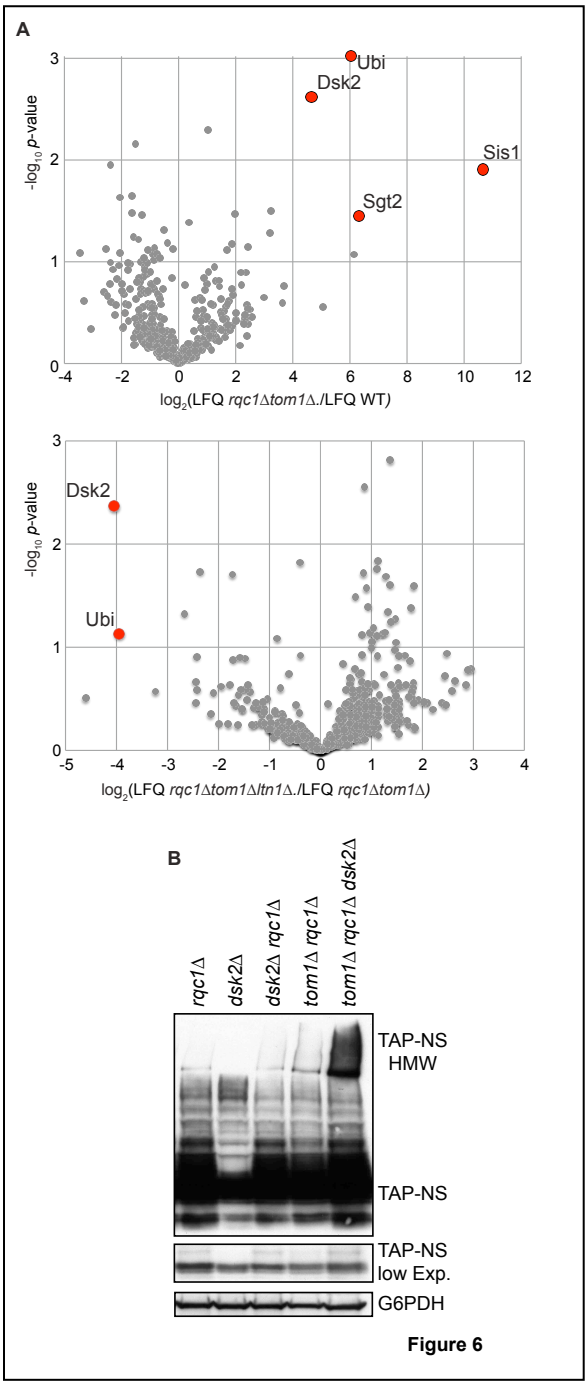


Fig. 6 Dsk2 is required for the degradation of polyubiquitinated aggregated proteins when Rqc1 and Tom1 are absent

(A) Biochemical characterization of the aggregates in *rqc1*Δ*tom1*Δ with or without Ltn1 strain. After separation of polysome extracts from *rqc1*Δ*tom1*Δ or WT strains on a sucrose gradient (10-50%), the fractions corresponding to small complexes were pooled, precipitated and separated on a polyacrylamide gel. Aggregates present in the stacking gel were treated and subjected to LC-MS/MS for identification and quantification. Aggregates present in *rqc1*Δ*tom1*Δ strain were compared to WT strain (upper panel) or aggregates present in *rqc1*Δ*tom1*Δ*ltn1*Δ strain were compared to *rqc1*Δ*tom1*Δ strain (lower panel). Volcano plot shows the comparison between strains as in Fig.3. The red circles represent the most significant enriched candidates.

(B) Total cellular extracts from *rqc1*Δ, *dsk2*Δ, *dsk2*Δ*rqc1*Δ, *tom1*Δ*rqc1*Δ or *tom1*Δ*rqc1*Δ*dsk2*Δ expressing the TAP-NS reporter gene were analyzed as in Fig. 3B.

Discussion

Previous studies identified the Ribosome-bound Quality Control complex as a multiprotein complex that binds stalled 60S to ubiquitylate aberrant nascent peptides that are then addressed to the proteasome for degradation (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013). In this work, we showed that the RQC also exists as a free complex during proteasomal escort of aberrant proteins (**Fig. 2**) that have a strong propensity to form aggregates when they are not efficiently degraded by the proteasome (**Fig. 1 & 5**). Whereas deletions of any component of the RQC complex causes an accumulation of soluble aberrant proteins (Defenouillère *et al.*, 2013), this aggregation phenomenon occurred specifically when Rqc1 was impaired. Although Rqc1 is known to be essential for the recruitment of Cdc48 on stalled 60S particles, a depletion of Cdc48 alone did not result in protein aggregation, which suggests that, independently from its role in Cdc48 recruitment, Rqc1 also acts to maintain aberrant proteins soluble, thus preventing their aggregation. Further research will thus determine whether Rqc1 possesses a chaperone-like activity or if it recruits specific chaperones to prevent the aggregation of aberrant proteins. Interestingly, our proteomics analysis revealed that aggregates of aberrant proteins that accumulate in the absence of Rqc1 were recognized by a set of chaperones and co-chaperones (**Fig. S4**), some of which have already been shown to function together in protein refolding (Lu and Cyr, 1998). These aggregates could only be observed in the presence of Rqc2 (**Fig. 4C**), which is responsible for the addition of C-terminal Alanine-Threonine tails to aberrant proteins, a process that is essential to trigger to Hsf1 response to translational stress (Shen *et al.*, 2015). Since polyalanine tracts are known to promote protein aggregation (Rankin *et al.*, 2000), it is likely that CAT-tails addition by Rqc2 promotes protein aggregation in the absence of Rqc1, and that these aggregates induce Hsf1 activation. Furthermore, Hsf1 response promotes the expression of Hsp90 chaperones such as Hsp82, which has been shown to inhibit Hsf1 response (Duina *et al.*, 1998) and that we found enriched in aggregates that form in the absence of Rqc1 (**Fig. S4**). Hence, there could be a cellular equilibrium between the Hsf1 response and the expression of chaperones that recognize RQC-induced aggregates to modulate the response to translational stress.

In parallel, we observed that the free RQC complex was able to interact physically with an additional partner, Tom1, and that this RQC-Tom1 interaction facilitate the degradation of aberrant proteins that are not efficiently targeted to the proteasome, for example when Rqc1 was impaired or when Cdc48 was depleted (**Fig. 3 & 4**). Intriguingly, the importance of Tom1 for aberrant protein elimination was only observed in specific mutants of the RQC complex, which raises the question of the biological relevance of this RQC-Tom1 interaction in wild type cells. The autoregulatory loop performed by the RQC complex constantly maintains Rqc1 at a low cellular abundance (Brandman *et al.*, 2012), hence it is possible that during translational stress the sudden accumulation of aberrant substrates rapidly titrates Rqc1, in which case this Tom1-mediated quality control pathway would ensure the degradation of aberrant translation products. However, the molecular mechanism underlying proteasomal targeting of aberrant substrates by the interaction between the RQC complex and Tom1 remains obscure. Our study reveals that this RQC-Tom1 interaction does not depend on protein aggregation, because Rqc2 was essential for aggregate formation whereas its absence did not affect RQC-Tom1 interaction (**Fig. 4C & S2C**), suggesting that Tom1 targets soluble forms of aberrant proteins. Curiously, Tom1 was only identified in purifications using Rqc1-TAP as bait, but not when the TAP-NonStop was used; in counterpart, proteasome subunits were enriched with TAP-NonStop purifications, but their enrichment was not significant in the case of Rqc1-TAP. An explanation for these discrepancies could reside in the phenotypic difference between the *rqc1*Δ deletion and the Rqc1-TAP fusion. In the absence of Rqc1, Cdc48 is not recruited at the 60S level (Brandman *et al.*, 2012; Defenouillère *et al.*, 2013), suggesting that aberrant peptides are extracted and targeted to the proteasome *via* an alternative process. In the case of Rqc1-TAP, Cdc48 is recruited on stalled 60S particles and triggers peptide extraction from the exit tunnel, however aberrant proteins are not efficiently degraded (**Fig. 3B**). Since the RQC pathway is not blocked at the same steps for *rqc1*Δ and Rqc1-TAP, the stabilized intermediates are not identical, which could explain the differences in protein identifications for each sample. In the absence of both Rqc1 and Tom1, aggregates of aberrant proteins were targeted to the aggresome, in which the proteasome recruiting factor Dsk2 became essential for their elimination (**Fig. 6**). Dsk2 required prior polyubiquitination by Ltn1 to bind to these aggregates, and has been shown to recognize both polyubiquitin chains *via* its UBA domain and the proteasome with its UBL domain, thus linking together polyubiquitinated proteins and proteasome moieties to ensure protein degradation (Funakoshi *et al.*, 2002). Interestingly, the polyubiquitination process by Ltn1 was also essential for Tom1 binding to the RQC complex (**Fig. S2B**), and the mammalian ortholog of Tom1, Huwe1, contains a UBA domain conferring Huwe1 the capacity to

interact with polyubiquitin chains (Chen *et al.*, 2005). Moreover, Huwe1 was identified as a proteasome-associated factor (Besche *et al.*, 2009); it is therefore possible that Tom1 functions similarly to Dsk2, recognizing RQC-bound aberrant proteins and associating with the proteasome, and thus acting as a bridge between polyubiquitinated substrates and proteasome moieties to ensure the elimination of aberrant proteins. Further investigation of proteasomal targeting by the RQC-Tom1 complex could determine whether Tom1 can bind polyubiquitin chains and the proteasome, and how Tom1 promotes proteasomal delivery of aberrant proteins when interacting with the RQC complex.

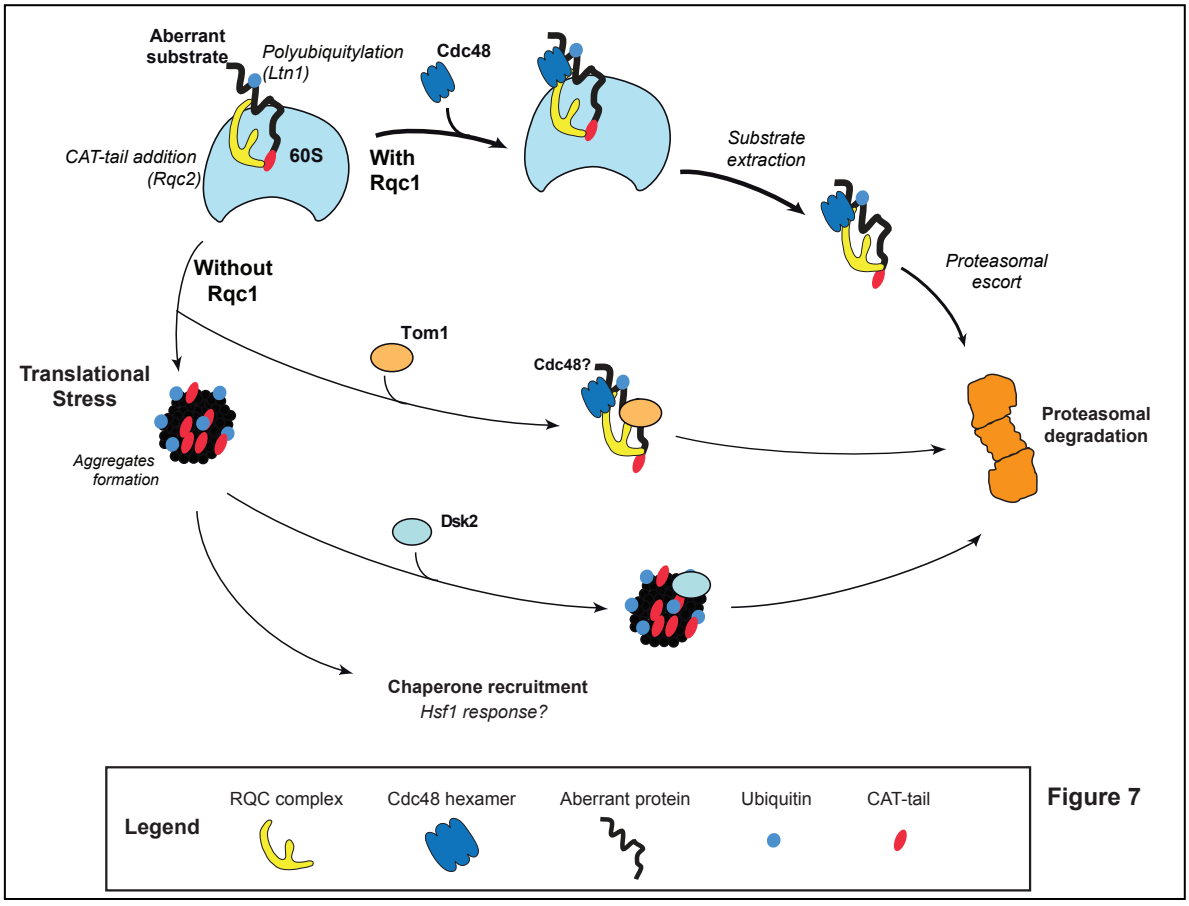


Fig. 7 Summary of pathways involved in translational quality control
Aberrant proteins are recognized, polyubiquitinated, extracted from the 60S and targeted to the proteasome by the RQC complex. A deficiency of Rqc1 causes translational stress, which triggers Tom1 recruitment on the RQC complex to perform proteasomal targeting. In parallel, Dsk2 and Rad23 recognize aberrant proteins and could also participate in their degradation. Aberrant substrates form aggregates when Rqc1 is impaired, which are recognized by a network of chaperones that could be involved in Hsf1 response. Finally, the absence of Tom1 causes further protein aggregation and aggresome formation, in which Dsk2 performs proteasome recruitment to limit aggresome expansion.

In conclusion, our study shows that translational quality control is not limited to the action of the Ribosome-bound Quality Control complex to prevent the accumulation of aberrant proteins, but integrates many levels of quality control pathways including RQC-Tom1 interaction, aggregate recognition by a network of chaperones and co-chaperones, and finally Dsk2-mediated aggresome processing by proteasome recruitment (see summary in **Fig. 7**). Translational quality control is therefore not limited to a unique degradation mechanism but features multiple cellular stress responses that enable refolding or clearance of defective proteins to prevent the toxicity arising from their aggregation. This quality control network could confer eukaryotic cells the ability to rapidly adapt and overcome stressful conditions to maintain protein homeostasis even in case of translational stress.

Material and methods

Yeast strains and plasmids

The yeast strains used in this study are listed in **Table S1**. 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 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.

Polysome gradients, proteins extraction and western blotting

Briefly, 120 OD_{600} mid-log phase yeast cells were treated with 50µg.mL^{-1} cycloheximide for 5 minutes and broken with glass beads using a MagNA Lyser (3 times for 60 seconds at 3000rpm) in breaking buffer (20mM Tris HCl pH7.4, 50mM KCl, 5mM $MgCl_2$, cycloheximide, 10mM *N*-ethylmaleimide and EDTA-free protease inhibitors from Roche). For proteasome inhibition, cells were deleted from *ERG6* and treated for 2 hours with 100µM MG132 before lysis. 7OD_{260} of clarified cell lysates were loaded on 10-50% sucrose gradients. Collected fractions were precipitated with 10% TCA, resuspended in 40 µL of sample buffer and 10 µL were loaded on 10% SDS-PAGE. Total protein extracts were prepared from 5 OD_{600} of exponential culture and loaded on 10% SDS-PAGE. After transfer to nitrocellulose membrane with a semi-dry system, proteins were detected by hybridization with the appropriate antibodies (**Table. S3**).

Preparative sucrose gradients for aggregate characterization

Polysome extracts were prepared and loaded on a sucrose gradient 10-50% as described above. Fractions containing the aggregates were pooled and precipitated with methanol/chloroform. Samples were loaded on an acrylamide gel containing a 3mm thick stacking gel that was cut up after electrophoresis and treated for LC-MS/MS analysis.

Affinity purifications coupled with sucrose gradient separation

Affinity purifications were performed as in (Defenouillère *et al.*, 2013). For Rqc1-TAP purifications, 4 liters of yeast cells grown in rich medium were depleted from *CDC48* for 13:30 hours with 10µg.mL^{-1} doxycyclin and harvested at OD=1.0. Cells were washed with water, frozen with dry ice and lyzed with a French Press (twice at 1200psi) in Lysis Buffer (50mM Tris HCl, 100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 1mM PMSF, water with EDTA-free protease inhibitor cocktail from Roche). Lysates were centrifuged at 15 000g for 20 minutes at 4°C and incubated for 45 minutes at 4°C with 50µL of magnetic beads coupled with IgG antibodies, 1/2500 antifoam and 0.075% IGEPAL. Beads were washed twice with Lysis Buffer with 0.075% IGEPAL and twice without. Elution was performed in Lysis Buffer with 10µL of TEV protease (AcTEV, Life Technologies) for 100 minutes at 17°C. TEV eluates were loaded on a 10-30% sucrose gradient and ultracentrifugation was performed at 27000g for 15 hours. Sucrose fractions were collected and precipitated with methanol/chloroform. Samples were divided 1/3rd for NuPAGE gel loading and silver staining, 2/3rd for analysis by LC-MS/MS. Same procedures were used for TAP-NonStop purifications, except that cells were grown in galactose -uracil and lyzed 4 times with glass beads, and ultracentrifugation was performed at 39000g for 3 hours.

Mass spectrometry experiments and data analysis

For sample preparations 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 (Shevchenko *et al.*, 2006). 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 (Defenouillère *et al.*, 2013).

Fluorescence microscopy

Fluorescence microscopy was performed on GFP-NonStop-containing yeast cells grown for 48 hours on plates containing galactose synthetic medium without uracil and resuspended in sterile water. DNA was stained with Hoechst 33352 (5 ng.µl^{-1}) for 5 minutes 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 (GFP, Leica) for 2000 milliseconds and Hoechst 33352 (A, Leica) for 30 milliseconds. Images were acquired with a Hamamatsu ORCAII-ER cooled CCD camera controlled by the Openlab software (version 3.5, Improvision) and processed using Adobe Photoshop CS3 software (version 10, Adobe).

Acknowledgments

We thank Antonia Doyen for her support in yeast strain construction, Frank Feuerbach for helpful advice concerning 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. Q.D. was supported by fellowships from the Ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche and from the Association pour la Recherche contre le Cancer. This work was supported by the grants from the Agence Nationale de la Recherche ANR-2011-BSV6-011-02, the Institut Pasteur and the CNRS.

References

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.

Besche, H.C., Haas, W., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2009). Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins. Biochemistry (Mosc.) *48*, 2538–2549.

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.

Chen, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. Cell *121*, 1071–1083.

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.

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.

Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. Nature *440*, 561–564.

Duina, A.A., Kalton, H.M., and Gaber, R.F. (1998). Requirement for Hsp90 and a CyP-40-type cyclophilin in negative regulation of the heat shock response. J. Biol. Chem. *273*, 18974–18978.

Duncan, K., Umen, J.G., and Guthrie, C. (2000). A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. Curr. Biol. CB *10*, 687–696.

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.

Hall, J.R., Kow, E., Nevis, K.R., Lu, C.K., Luce, K.S., Zhong, Q., and Cook, J.G. (2007). Cdc6 stability is regulated by the Huwe1 ubiquitin ligase after DNA damage. Mol. Biol. Cell *18*, 3340–3350.

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.

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

Kim, D.-H., Zhang, W., and Koepp, D.M. (2012). The Hect Domain E3 Ligase Tom1 and the F-box Protein Dia2 Control Cdc6 Degradation in G1 Phase. J. Biol. Chem. *287*, 44212–44220.

Kopito, R.R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends Cell Biol. *10*, 524–530.

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.

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.

Maynard, C.J., Böttcher, C., Ortega, Z., Smith, R., Florea, B.I., Díaz-Hernández, M., Brundin, P., Overkleeft, H.S., Li, J.-Y., Lucas, J.J., *et al.* (2009). Accumulation of ubiquitin conjugates in a polyglutamine disease model occurs without global ubiquitin/proteasome system impairment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 13986–13991.

Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metze, S., Zamudio Orozco, R., Kleinschmidt, N., and Mühlemann, O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *67*, 677–700.

Nielsen, S.V., Poulsen, E.G., Rebula, C.A., and Hartmann-Petersen, R. (2014). Protein quality control in the nucleus. Biomolecules *4*, 646–661.

Rankin, J., Wyttenbach, A., and Rubinsztein, D.C. (2000). Intracellular green fluorescent protein-polyalanine aggregates are associated with cell death. Biochem. J. *348 Pt 1*, 15–19.

Richter, K., Haslbeck, M., and Buchner, J. (2010). The heat shock response: life on the verge of death. Mol. Cell *40*, 253–266.

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.

Shao, S., Brown, A., Santhanam, B., and Hegde, R.S. (2015). Structure and Assembly Pathway of the Ribosome Quality Control Complex. Mol. Cell.

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.

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.

Singh, R.K., Kabbaj, M.-H.M., Paik, J., and Gunjan, A. (2009). Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. Nat. Cell Biol. *11*, 925–933.

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.

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

Verhoef, L.G.G.C., Lindsten, K., Masucci, M.G., and Dantuma, N.P. (2002). Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins. Hum. Mol. Genet. *11*, 2689–2700.

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.

Wang, Y., Meriin, A.B., Zaarur, N., Romanova, N.V., Chernoff, Y.O., Costello, C.E., and Sherman, M.Y. (2008). Abnormal proteins can form aggresome in yeast: aggresome-targeting signals and components of the machinery. FASEB J. *23*, 451–463.

Supplementary material

Table S1. Yeast strains

Strains	Genotypes	References
Wild type		
BY4741	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0*	(Brachmann *et al.*, 1998)
BY4742	*MATalpha, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0*	(Brachmann *et al.*, 1998)
Fusion proteins		
LMA1951	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6*	(Ghaemmaghami *et al.*, 2003)
LMA2688	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6,* ***rqc2****Δ::KANMX4*	(Defenouillère *et al.*, 2013)
LMA2689	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6,* ***ltn1****Δ::KANMX4*	(Defenouillère *et al.*, 2013)
LMA2648	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6, KANMX4:PrTetO2:****CDC48***	This study
LMA2870	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6, KANMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***ltn1****Δ::URA3*	This study
LMA3002	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6, KANMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***tom1****Δ::LEU2*	This study
LMA3058	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6, KANMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***ltn1****Δ****RING****::URA3*	This study
Mutants		
LMA1967	as *BY4742*, ***rqc1****Δ::KANMX4*	Euroscarf
LMA2070	as *BY4741*, ***rqc1****Δ::KANMX4*	Euroscarf
LMA2714	as *BY4741*, ***rqc1****Δ::HIS3*	This study
LMA2948	as *BY4742,* ***tom1****Δ::LEU2*	This study
LMA3123	as *BY4742,* ***tom1****Δ::LEU2,* ***rqc1****Δ::KANMX4*	This study
LMA3202	as *BY4742,* ***tom1****Δ::LEU2,* ***rqc1****Δ::KANMX4,* ***ltn1****Δ::NATMX4*	This study
LMA3193	as *BY4742,* ***tom1****-hectC3235A:LEU2,* ***rqc1****Δ::KANMX4*	This study
LMA2039	as *BY4742*, ***rqc1****Δ:: PralphaNATMX4,* ***ltn1****Δ::KANMX4,*	This study
LMA2135	as *BY4742*, ***rqc1****Δ::KANMX4,* ***rqc2****Δ:: PralphaNATMX4*	This study
LMA3645	as *BY4742*, ***rqc1****Δ::KANMX4,* ***tom1****Δ::LEU2* ***rqc2****Δ::HIS3*	This study
LMA2719	as *BY4742*, *PralphaNATMX4:PrTetO2:****CDC48***	(Defenouillère *et al.*, 2013)
LMA2746	as *BY4742*, *PralphaNATMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***ski2****Δ::KANMX4*	(Defenouillère *et al.*, 2013)
LMA3121	as *BY4742*, *PralphaNATMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***rqc1****Δ::KANMX4*	This study
LMA3041	as *BY4741,* ***erg6****Δ::LEU2*	This study
LMA3120	as *BY4741,* ***erg6****Δ::LEU2,* ***rqc1****Δ::KANMX4*	This study
LMA3265	as *BY4741*, ***dsk2****Δ::LEU2*	This study
LMA3267	as *BY4741*, ***dsk2****Δ::LEU2,* ***rqc1****Δ::HIS3*	This study
LMA3306	as *BY4742*, ***dsk2****Δ::LEU2,* ***rqc1****Δ::HIS3,* ***tom1****Δ::LEU2*	This study

Table S2. Plasmids used in this study

Plasmid	Markers	Reference
pTAP Non-Stop	URA3	(Defenouillère *et al.*, 2013)
pTAP Stop	URA3	(Defenouillère *et al.*, 2013)
pGFP Non-Stop	URA3	This study

Table S3. Antibodies used for immunodetection

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

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.

Supplemental figures

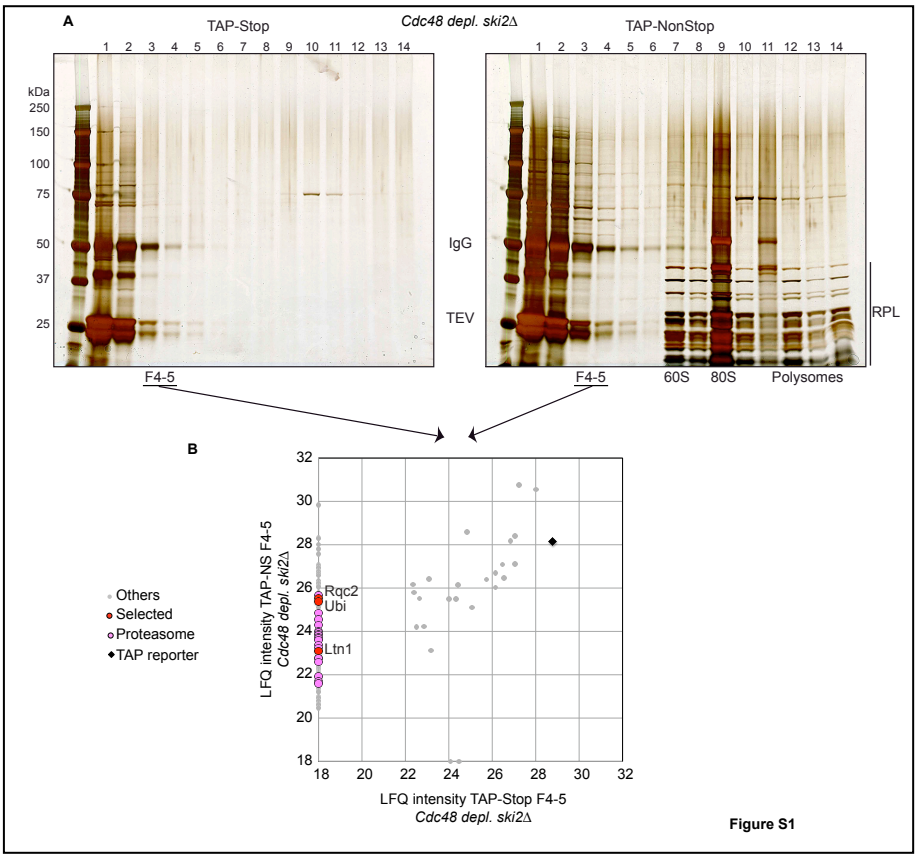


Fig. S1 The TAP-NonStop is specifically associated with the free RQC and proteasome complexes
(A) Affinity purifications the TAP-NonStop (right panel) or the TAP-Stop (left panel) associated complexes in *ski2*Δ *Cdc48* depleted strain (culture for 13h30 with Doxycycline). TEV eluates of affinity purifications were loaded on a sucrose gradient. Components of each fraction were separated on a polyacrylamide gel and revealed by silver staining.
(B) The proteins associated to TAP-NonStop and TAP Stop reporters from low-sedimenting fractions (F4-5) were identified by LC-MS/MS. The graph shows the comparison between the intensities (LFQ) for proteins identified in each affinity purification. Each circle indicates an identified protein (in red, candidates of interest (see text); in pink, proteasome components, in black, the TAP reporter.

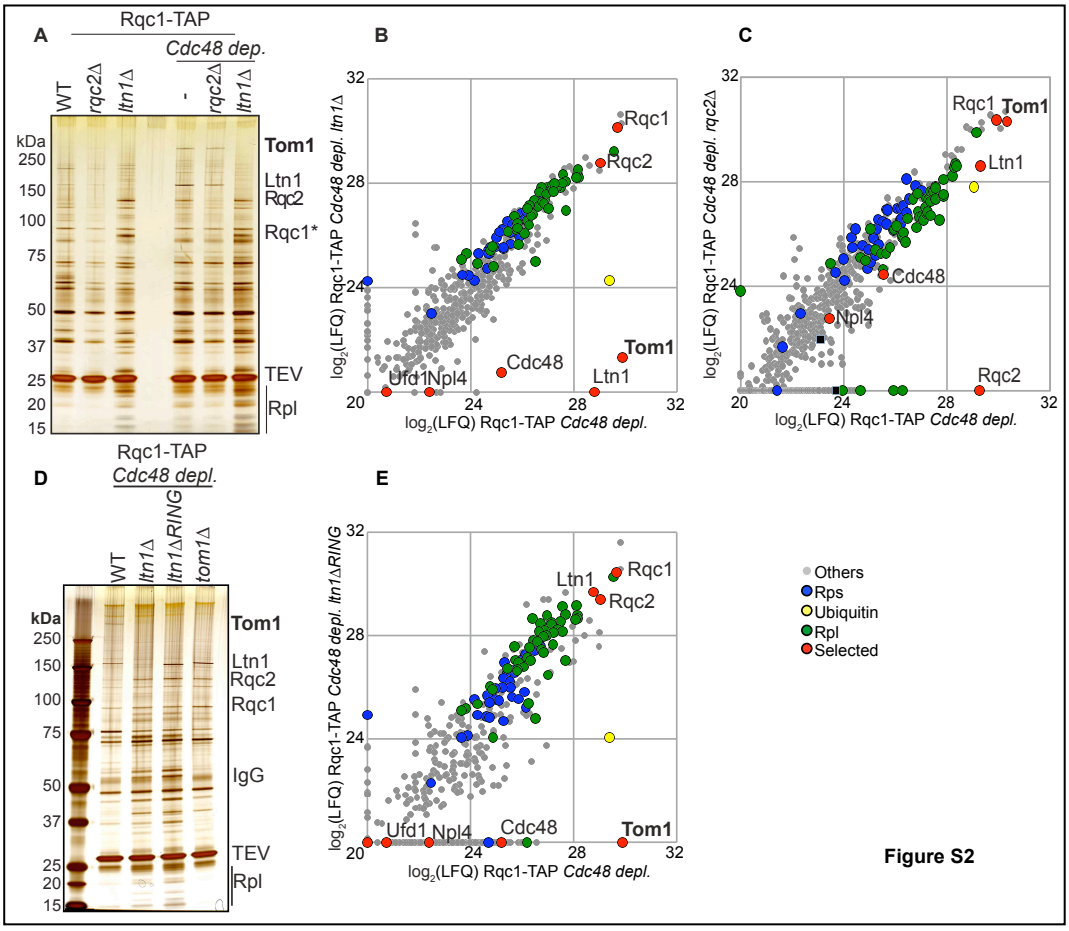


Fig. S2 The association of Tom1 to the RQC complex upon Cdc48 depletion requires ubiquitylation by Ltn1 but not Rqc2

(A) Affinity purifications of Rqc1-TAP associated complexes in WT or *rqc2*Δ or *ltn1*Δ with or without Cdc48 depletion (culture for 13h30 with Doxycycline). The associated proteins were separated on a polyacrylamide gel and revealed by silver staining.

(B) Affinity purifications of Rqc1-TAP associated complexes upon Cdc48 depletion with or without Ltn1. The graph shows the comparison between the intensities (LFQ) for each protein identified by LC-MS/MS (log2 scale). Each circle indicates an identified protein (in red, candidates of interest (see text); in blue, Rps proteins, in green, the Rpl proteins, in yellow, Ubiquitin).

(C) as in (B) to compare Rqc1-TAP associated complexes upon Cdc48 depletion with or without Rqc2.

(D) Affinity purifications of Rqc1-TAP associated complexes upon Cdc48 depletion combined with the *ltn1*Δ or *ltn1*Δ*RING* or *tom1*Δ mutations. The associated proteins were separated on a polyacrylamide gel and revealed by silver staining.

(E) as in (B) to compare affinity purifications of Rqc1-TAP associated complexes upon Cdc48 depletion in the presence or absence of Ltn1 and with or without Ltn1 RING domain.

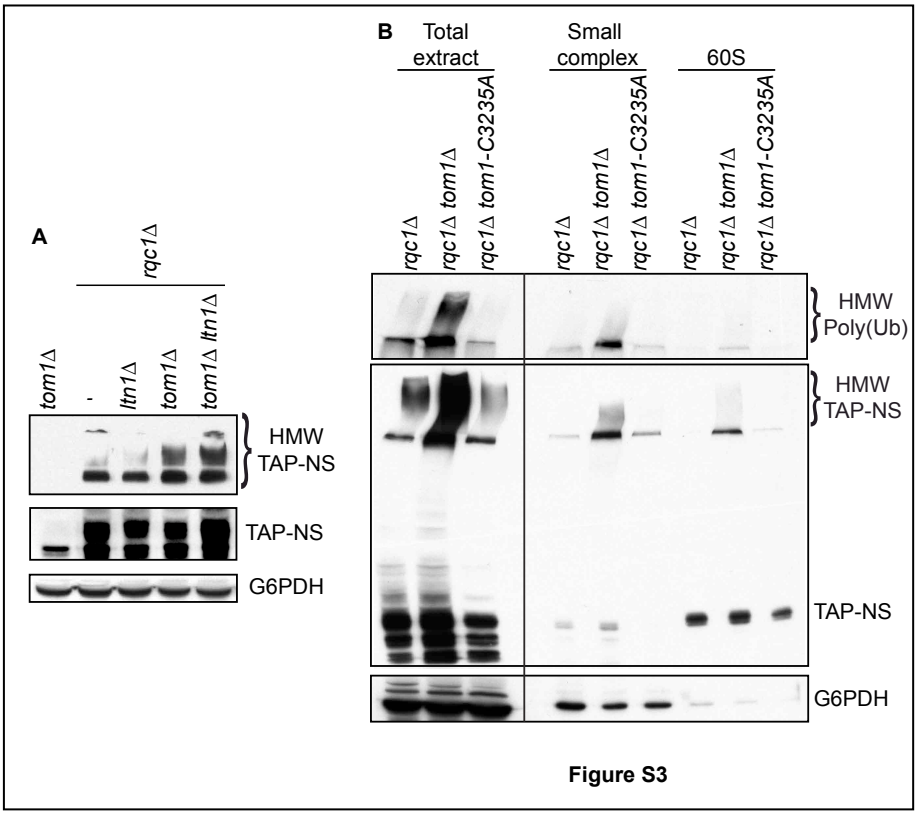


Fig. S3 E3 ubiquitin ligase activities of Tom1 and Ltn1 are not required for the clearance of HMW forms of the TAP-NonStop reporter protein

(A) Total cellular extract from strains *tom1*Δ, *rqc1*Δ, *rqc1*Δ*ltn1*Δ, *rqc1*Δ*tom1*Δ, *rqc1tom1*Δ*ltn1*Δ transformed with the TAP-NS reporter gene-containing plasmid were separated on a polyacrylamide gel and analyzed by Western blot using antibodies against TAP. The antibody against G6PDH was used as loading control.

(B) The E3 ubiquitin ligase activity of Tom1 is not required for the clearance of the aggregated forms of TAP-NS. Left panel: total cellular extracts from *rqc1*Δ, *rqc1*Δ*tom1*Δ and *rqc1*Δ*tom1-C3235A* (mutation in the HECT domain of Tom1) transformed with the TAP-NS reporter gene-containing plasmid were separated on a polyacrylamide gel. Right panel: After separation on a sucrose gradient (10-50%) of polysome extracts from strains analyzed in the left panel, the fractions corresponding to small complexes and to the 60S subunits were pooled, precipitated and separated on a polyacrylamide gel. Total cellular extracts and pools were analyzed by Western blot using antibodies against TAP. The antibody against Ubiquitin (P4D1) revealed the ubiquitinated forms of the TAP-NonStop. They are indicated as HMW Poly(Ub). The antibody against G6PDH was used as loading control.

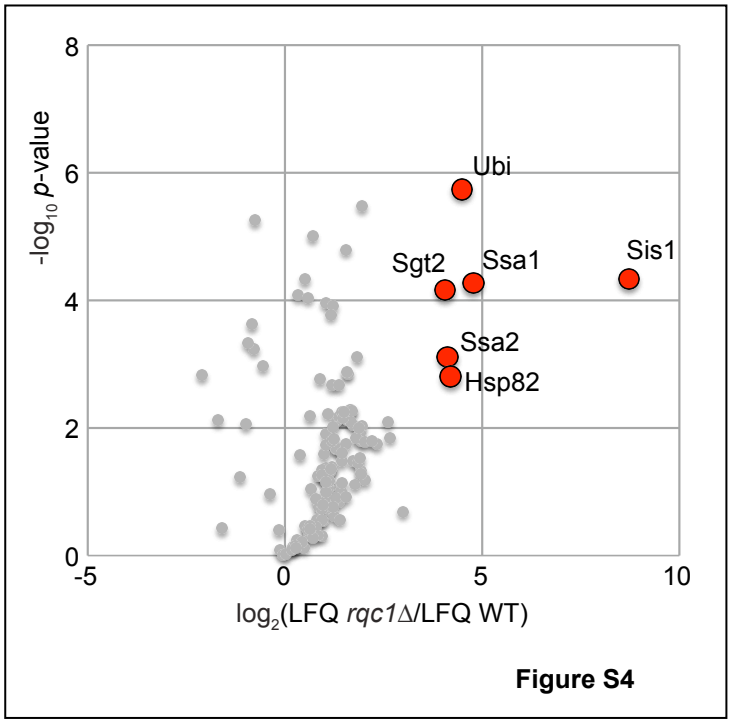


Fig. S4 Biochemical characterization of the aggregates accumulating in the absence of Rqc1
Total cellular extracts from *rqc1*Δ or wild type strains were separated on a polyacrylamide gel. Aggregates present in the staking gel were treated and subjected to LC-MS/MS for identification and quantification. Aggregates present in the *rqc1*Δ strain were compared to the WT strain. Volcano plot shows the fold change (log2 LFQ *rqc1*Δ/LFQ WT) on the x axis and the p-value distribution (-log10 p-value) on the y axis for the identified proteins. Each circle indicates an identified protein. The red circles represent the significantly enriched candidates (p-value≥0.05).

Cette deuxième partie de notre étude du complexe RQC a permis de mettre en évidence la suite du mécanisme de contrôle qualité des protéines aberrantes après polyubiquitinylation par Ltn1, addition de CAT tails par Rqc2, et extraction du tunnel de sortie de la 60S par Cdc48. En effet, nous avons montré dans cette étude que le complexe RQC dans son intégralité (Rqc1-Rqc2-Ltn1-Cdc48) participe à l'escorte de ces protéines aberrantes vers le protéasome, et non l'hexamère de Cdc48 seul comme proposé dans le cas du mécanisme de dégradation associé au réticulum endoplasmique (Richly et al., 2005). De plus, les résultats obtenus concernant la formation d'agrégats protéiques en absence de Rqc1 suggèrent un rôle pour Rqc1 dans la protection des CAT tails ajoutées par Rqc2 sur les peptides aberrants afin de limiter leur agrégation, ce qui favorise leur élimination rapide par un adressage efficace au protéasome. Enfin, notre étude protéomique des agrégats apparaissant en absence de Rqc1 ont permis d'identifier plusieurs systèmes de contrôle qualité capables d'assister le complexe RQC, dont l'interaction du RQC avec Tom1, la reconnaissance par des chaperonnes et des co-chaperonnes, et enfin le recrutement du protéasome *via* la protéine Dsk2.

L'ensemble de ces données montre que le contrôle qualité de la traduction n'est pas constitué d'un mécanisme unique permettant l'adressage des protéines aberrantes au protéasome, mais fait intervenir de nombreux processus dont le but est de replier ou d'éliminer ces protéines défectueuses, pour éviter leur accumulation pouvant générer une toxicité cellulaire. Il est intéressant de noter que chez *Saccharomyces cerevisiae*, des mutants thermosensibles à 37°C ont été identifiés pour les gènes *CDC48*, *DSK2*, *TOM1* et *SIS1* (Latterich et al., 1995; Biggins et al., 1996; Duncan et al., 2000; Ben-Aroya et al., 2008), ce qui souligne l'importance de ces facteurs de contrôle qualité des protéines en cas de stress traductionnel résultant de températures élevées ou d'un choc thermique. Par ailleurs, nous avons réalisé des tests de croissance qui ont révélé que la souche *tetO$_2$CDC48*, mutant hypomorphe par rapport au gène *CDC48* sauvage (sous contrôle de son promoteur endogène), est particulièrement thermosensible à 37°C, même en absence de doxycycline. De plus, une combinaison de cette mutation hypomorphe avec une délétion de *RQC1* est létale pour les cellules à 37°C (résultats présentés en **Figure 41** de l'**Annexe**). De manière encore plus surprenante, une délétion de *LTN1* restaure la croissance du double mutant *tetO$_2$CDC48 rqc1*Δ. Afin d'identifier d'autres

mutants de délétion ayant un fort lien fonctionnel avec *tetO$_2$CDC48*, et d'autres mutants capables de supprimer la phénotype de croissance du mutant *tetO$_2$CDC48 rqc1*Δ à 37°C, j'ai réalisé des cribles GIM (Decourty et al., 2008) à 37°C ciblés sur ces mutants d'intérêt. Cependant, même si les cribles à 37°C avec le mutant *rqc1*Δ ont donné des résultats similaires aux cribles GIM réalisés avec *rqc1*Δ en présence d'antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine et Nourséothricine) qui ont mis en évidence une interaction fonctionnelle avec le complexe SKI (Defenouillère et al., 2013), les cribles réalisés avec *tetO$_2$CDC48* ont révélé un très grand nombre de mutants de gènes n'ayant aucun lien connu les uns avec les autres, alors que les mutants du RQC (*rqc1*Δ et *ltn1*Δ) n'ont pas été identifiés en tant que mutants de létalité synthétique ou épistatiques. Le fait que ces cribles génétiques présentent une faible spécificité concernant le complexe RQC est probablement dû à l'effet pléiothropique du mutant hypomorphe *tetO$_2$CDC48*, ce qui est logique compte tenu du très grand nombre de processus cellulaires dans lequel la protéine Cdc48 est impliquée (détaillé dans l'**Introduction**). Même si ces cribles génétiques ainsi que l'analyse des mutants obtenus n'ont pas été poursuivis, les résultats des cribles sont disponibles dans la **Figure 42** de l'**Annexe**.

4 - Etude structurale du complexe RQC lié à la 60S bloquée

4.1 Caractérisation structurale du complexe RQC par cryo-EM

Parallèlement à cette caractérisation fonctionnelle du complexe RQC, nous avons commencé en septembre 2013 une collaboration avec Thomas Becker et Christian Schmidt du laboratoire de Roland Beckmann à l'université de Munich, spécialistes en cryo-microscopie électronique, dont le but était de déterminer la structure du complexe RQC associé à la particule 60S bloquée. Ma participation à cette collaboration a consisté à purifier des complexes RQC-60S à partir de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* portant des fusions génomiques TAP à l'extrémité C-terminale de facteurs du complexe RQC (Ghaemmaghami et al., 2003).

4.1.1 Introduction à la cryo-microscopie électronique

La cryo-microscopie électronique (ou cryo-EM) est une technique utilisée notamment en biologie structurale pour résoudre la structure de macromolécules (complexes protéiques, ribonucléoprotéiques ou protéo-membranaires par exemple) par la détermination des volumes occupés par ces macromolécules. La détermination de ces volumes est rendue possible par le bombardement des échantillons à l'aide d'un canon à électrons, qui permet de discriminer les régions denses en électrons des régions où la densité en électrons est faible. Avant cette étape de visualisation au microscope électronique, l'échantillon biologique est purifié, concentré, puis déposé sur une grille de cuivre recouverte de carbone. L'échantillon présent sur cette grille peut être alors soit métallisé grâce à un produit de contraste tel que l'acétate d'uranyle, qui permet une coloration négative (les biomolécules apparaissent alors plus claires que leur environnement et sont visualisables à faible résolution en microscopie électronique à transmission, voire **Figure 25**), soit congelé dans de l'éthane liquide à ultra-basse température (environ -188°C), un procédé appelé "vitrification" qui permet de solidifier l'échantillon et son environnement aqueux tout en évitant la formation de cristaux de molécules d'eau qui pourraient endommager la structure des biomolécules. L'avantage majeur de la cryo-EM (visualisation de grilles préalablement vitrifiées) par rapport à la coloration négative (qui s'effectue à température ambiante) est la diminution considérable du mouvement brownien, ce qui rend la visualisation des molécules beaucoup plus précise. En effet, la structure des molécules étant plus labile à température ambiante, elle apparait plus floue lors de la visualisation au microscope électronique qu'à ultra-basse température. Cependant en cryo-EM, les échantillons ne sont pas contrastés à l'aide d'acétate d'uranyle : le contraste est alors obtenu par une défocalisation de l'objectif plus ou moins importante.

Les images acquises des molécules présentes sur les grilles sont alors enregistrées sous forme de micrographes (voir **Figure 25**) constituant l'ensemble des données de l'échantillon ou "dataset". Plusieurs logiciels permettent ensuite de sélectionner les particules d'intérêt à partir des micrographes du dataset, le plus utilisé étant Signature, qui applique une procédure de criblage permettant d'identifier les particules ressemblant à un ensemble de modèles déterminés par l'utilisateur (Chen and Grigorieff, 2007). L'ensemble des images de particules ainsi isolées,

corespondant généralement à plusieurs centaines de milliers de particules différentes, doit alors être trié de manière à déterminer des classes de particules ayant des structures similaires, et à éliminer le bruit de fond (particules ne correspondant pas au complexe d'intérêt). Par ailleurs, les complexes biologiques présentent souvent plusieurs conformations possibles, il est donc important de trier ces différentes conformations avant de poursuivre vers l'étape suivante de l'analyse, qui est la reconstitution tridimensionnelle des complexes correspondant à chaque classe de particules, réalisé grâce à des logiciels tels que RELION ou SPIDER (Frank et al., 1996; Scheres, 2012).

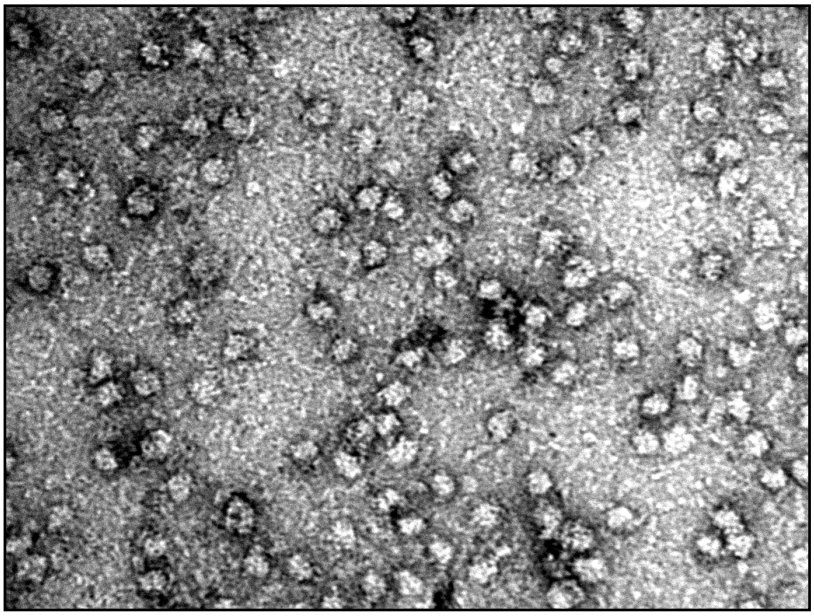


Figure 25. Micrographe de particules 60S révélées par coloration négative
Image obtenue avec un microscope électronique à transmission FEI Morgagni 268

Cette reconstitution 3D est l'étape la plus complexe du processus, elle nécessite notamment une répartition suffisamment uniforme de toutes les conformations possibles du complexe dans l'ensemble d'une classe d'images : en d'autres termes, si un complexe s'oriente préférentiellement dans une conformation donnée par rapport au plan de la grille, la majorité des images vont représenter la même vue 2D du complexe, ce qui va considérablement biaiser le dataset et rendre la reconstitution 3D impossible. De plus, la qualité des reconstitutions 3D dépend énormément de l'homogénéité des images des particules dans chaque classe : en effet, plus les particules d'une même classe se ressemblent d'un point de vue structural, plus la résolution du volume final reconstitué sera élevé. Parallèlement, le fait d'augmenter le nombre maximum de classes possibles lors du tri des images va

logiquement augmenter l'homogénéité des particules au sein de chaque classe, cependant le nombre de particules par classe va diminuer. Or, lors de la reconstitution 3D, plus le nombre d'images de particules dans une classe est important, plus la résolution finale sera élevée, car le nombre de conformations disponibles du complexe augmente (à condition que la répartition des conformations soit effectivement uniforme). Par conséquent, l'optimisation de la résolution finale d'un complexe reconstitué nécessite un juste milieu entre le nombre de classes dans lesquelles les particules sont triées et l'homogénéité structurale des particules dans chaque classe. Les logiciels tels que RELION permettent également de raffiner la structure des volumes reconstitués par un tri des particules après reconstitution 3D, qui permet de réassigner certaines images d'une classe à l'autre afin d'optimiser la qualité de la structure finale du complexe. Ce raffinement peut aussi se faire à partir d'un modèle structural préalablement connu : si le volume occupé par la structure du complexe étudié est disponible, il est possible de trier les images de manière à établir directement une classe contenant uniquement les images de particules ressemblant au modèle souhaité. Par exemple, ce procédé est très utilisé lorsqu'on cherche à résoudre la structure d'un complexe qui a été préalablement déterminée chez un autre organisme (Anger et al., 2013).

En conclusion, cette technique de biologie structurale permet la résolution de structures de molécules de très grande taille, en comparaison avec la résonance magnétique nucléaire par exemple. De plus, elle nécessite peu de matériel biologique de départ et ne requiert pas une pureté d'échantillon équivalente à celle nécessaire pour l'obtention de cristaux, contrairement à la cristallographie aux rayons X. Cependant, la résolution maximale de la structure des complexes obtenus par cryo-microscopie électronique, bien qu'en augmentation constante ces dernières années (4,5 ångströms actuellement), n'est pas aussi élevée qu'avec ces autres techniques de biologie structurale.

4.1.2 Purification des particules 60S associées au complexe RQC

Le premier échantillon que j'ai purifié afin qu'il soit analysé par cryo-microscopie électronique a été avec l'appât Rqc2-TAP, car cette protéine de fusion permet d'obtenir un excellent enrichissement du complexe RQC associé aux particules 60S en seulement une étape de purification (liaison de la protéine A à des

billes magnétiques couplées aux anticorps IgG) suivie d'une d'élution à la protéase TEV (Defenouillère et al., 2013). Cependant, la préparation de grilles pour la cryo-EM nécessite une étape de concentration de l'échantillon, car le dépôt de particules ribosomiques sur les grilles nécessite une concentration d'environ 3 à 6 unités de densité optique à 260nm afin d'obtenir assez de particules par micrographe. C'est pourquoi j'ai déposé l'éluat TEV sur un coussin de sucrose (750 mM), ultracentrifugé 75 minutes à 80000 rpm, éliminé le surnageant, puis resuspendu dans 25µL de tampon aqueux, ce qui a permis de concentrer l'échantillon environ 13 fois, d'après les mesures de DO_{260nm} par unité de volume et coloration au bleu de Coomassie de l'échantillon avant et après ultracentrifugation (2,15 contre 27,4 unités de DO/mL et voir **Figure 26**). Par la suite, les autres échantillons analysés par cryo-EM ont été préparés en suivant ce même protocole de purification et de concentration sur coussin de sucrose.

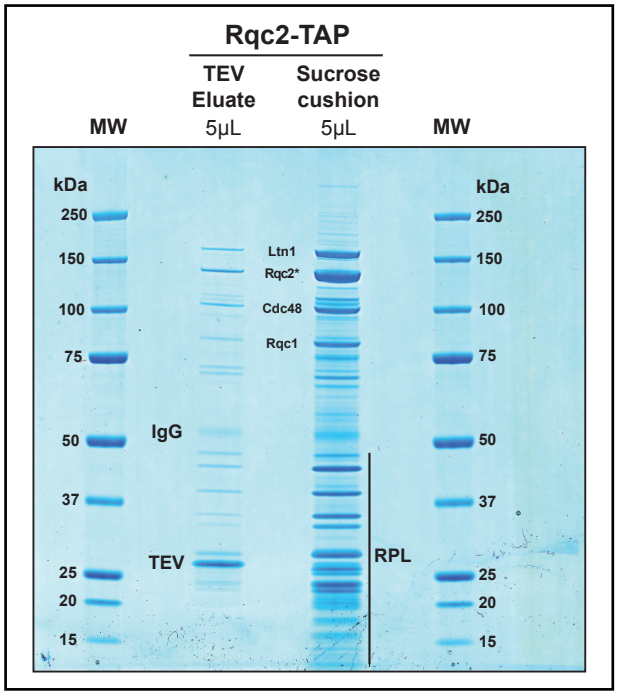


Figure 26. Echantillon Rqc2-TAP purifié et isolé sur coussin de sucrose
5µL de l'éluat TEV et de la resuspension du culot après ultracentrifugation ont été déposés sur gel NuPAGE et colorés 30 minutes avec de l'Instant*Blue* (Expedeon)

4.1.3 Analyse par cryo-microscopie électronique des complexes purifiés

L'échantillon présenté dans le paragraphe précédent (Rqc2-TAP) a été préparé dans le laboratoire d'Alain Jacquier, et il a fallu le congeler dans de l'azote liquide de manière à pouvoir l'expédier à Munich. Cette étape de congélation peut

parfois dénaturer les complexes biologiques, surtout lors de la décongélation dans le but de préparer des grilles pour la cryo-EM. Cet échantillon a ensuite été analysé par Thomas Becker, et la reconstitution tridimensionnelle obtenue à partir du dataset (composé d'environ 50000 particules) est présentée ci-dessous en superposition avec une 60S vide (**Figure 27**). Cette reconstitution correspond effectivement à la structure de la 60S, et il est intéressant de constater, même à faible résolution, la présence d'un ARNt dans le site P, d'après la densité supplémentaire visible sur la vue présentant l'interface avec la 40S. De plus, le segment d'expansion 27 de l'ARNr 25S présente une conformation atypique en comparaison avec la 60S vide : l'extrémité de cette hélice d'ARN se retrouve positionnée à proximité du tunnel de sortie du peptide naissant.

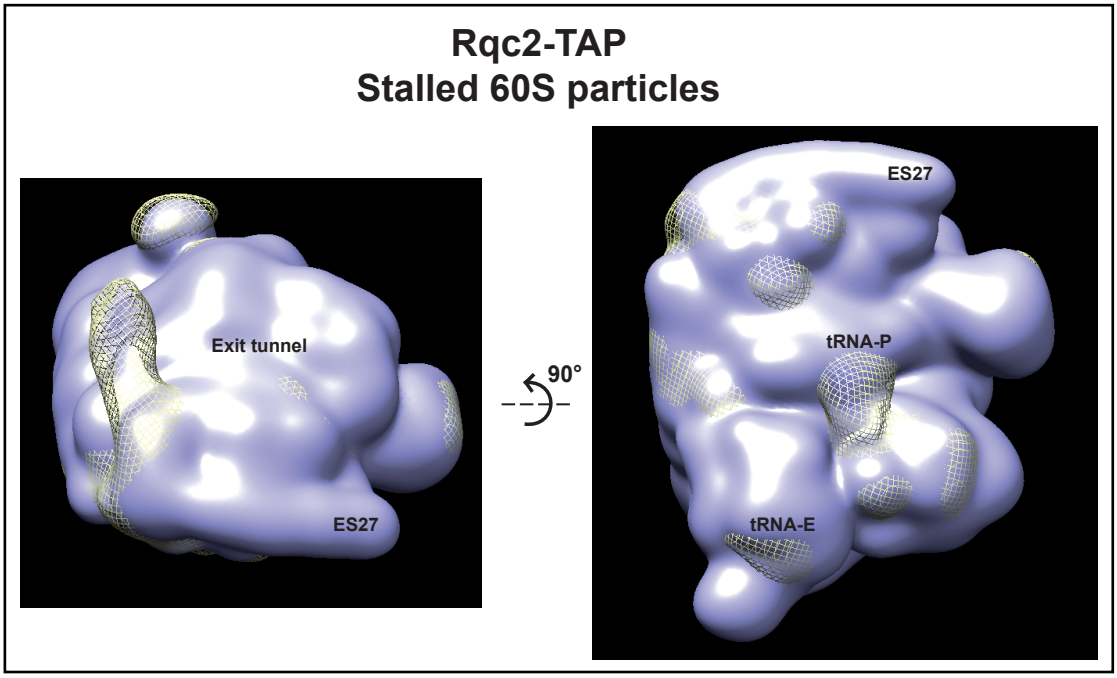


Figure 27. Reconstitution 3D des particules 60S purifiées avec Rqc2-TAP
Analyse du dataset réalisée par Christian Schmidt. Le grillage jaune représente le volume obtenu à partir des particules purifiées. On remarque un changement de conformation du segment d'expansion 27 de l'ARNr par rapport à la particule 60S vide (en violet) ainsi qu'une densité supplémentaire au niveau du site P des ARNt.

Cependant, cette première reconstitution de la 60S associée à Rqc2-TAP ne comporte aucune densité supplémentaire qui pourrait correspondre à des protéines du complexe RQC. Suite à ce résultat, notre hypothèse était que le complexe avait pu se dissocier lors de l'étape de congélation-décongélation, et nous avons décidé de préparer les échantillons directement sur place pour que les grilles soient

préparées extemporanément sans étape de congélation préalable. Pour cela, j'ai préparé et congelé des cellules de levure Rqc2-TAP et je me suis rendu au centre de génétique de l'université de Munich pour effectuer les purifications d'affinité avec Christian Schmidt afin de visualiser les complexes purifiés à la fois en coloration négative et en cryo-EM. La coloration négative de l'éluat TEV de Rqc2-TAP révèle une grande quantité de particules 60S (voir **Figure 28A**), les micrographes ne présentant pas plus de 5% de particules 80S, une proportion inhabituellement faible qui résulte probablement de la non-compatibilité d'association aux 60S entre Rqc2, utilisé ici comme appât, et les sous-unités 40S (Lyumkis et al., 2014).

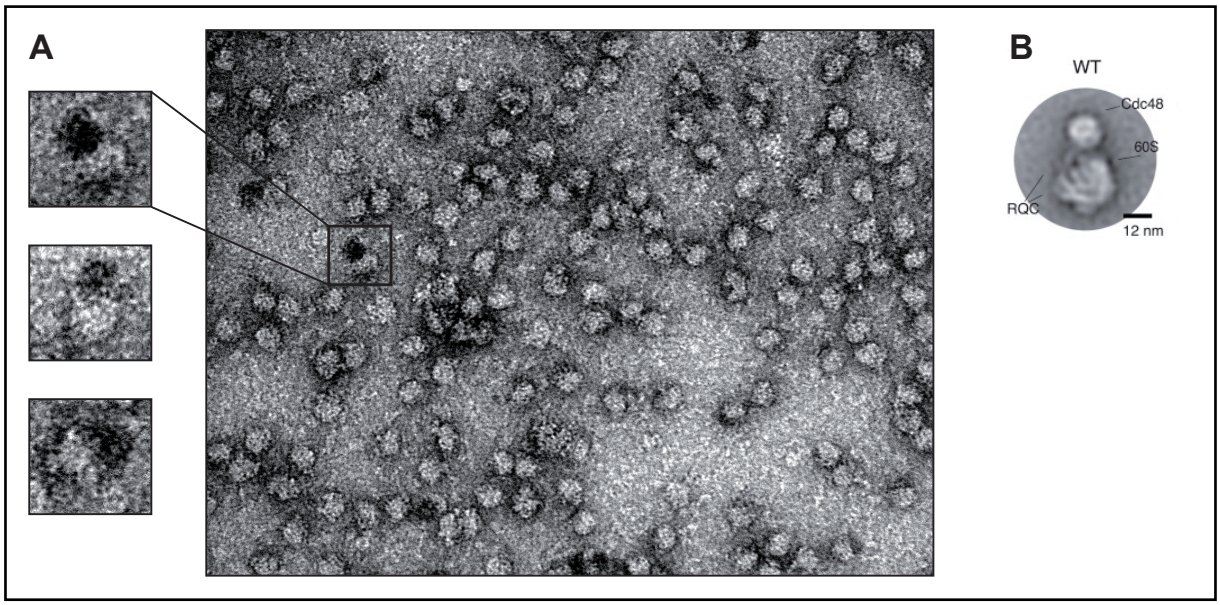


Figure 28. Coloration négative de particules 60S associées à Rqc2-TAP
(**A**) Image obtenue avec un microscope électronique à transmission FEI Morgagni. Coloration négative à l'acétate d'uranyle réalisée par Christian Schmidt.
A gauche sont montrés des zooms de 60S liées à ces régions denses aux électrons.
(**B**) Coloration négative de 60S associées à Rqc1-FLAG (Brandman et al., 2012).

De manière surprenante, certaines particules 60S observées semblent être associées à des régions denses aux électrons (**Figure 28A**, voir aussi **Figure 25**), qui ressemblent fortement aux particules RQC-60S observées par le laboratoire de Jonathan Weissman après purification de Rqc1-FLAG et qui pourraient correspondre à la position occupée par le complexe RQC, notamment l'hexamère de Cdc48 (**Figure 28B**). Il semble donc que les complexes RQC liés aux particules 60S soient préservés en absence de congélation à l'azote liquide, contrairement au premier

échantillon Rqc2-TAP. Nous avons ensuite préparé des grilles pour la cryo-EM par vitrification, et sommes allés analyser ces grilles sur un microscope prototype financé par l'EMBL et localisé à l'Institut Max Planck pour la Biochimie de Martinsried, en collaboration avec le laboratoire de Friedrich Förster, qui s'intéresse au protéasome et à l'hexamère de Cdc48. La spécificité de ce microscope, appelée "phase plate", permet d'augmenter le contraste des grilles vitrifiées afin d'améliorer la résolution finale des reconstructions 3D par une meilleure détection des parties faiblement contrastées (Danev and Nagayama, 2001). Ceci est particulièrement utilisé en tomographie électronique, une technique de cryo-EM qui consiste à incliner progressivement la grille et à acquérir des images des particules au fur et à mesure de l'inclinaison afin de reconstituer les particules observées en 3D à partir de l'ensemble d'images obtenues pour chacune de ces particules. Ce procédé nécessite cependant l'ajout de nanoparticules d'or à l'échantillon de manière à créer un repère sur les micrographes, ce qui va permettre l'alignement de la grille par rapport au faisceau d'électrons pour chaque image acquise au cours de l'inclinaison. L'acquisition de micrographes des grilles Rqc2-TAP par cryo-tomographie électronique, ainsi que par cryo-EM classique sur un microscope Spirit, et la reconstitution 3D de l'ensemble des images obtenues, ont permis d'observer une petite densité supplémentaire par rapport à la 60S vide, localisée à proximité de l'hélice 69 et de l'ARNt localisé dans le site P de la 60S (**Figure 29**). Or, nous savons à présent que Rqc2 se lie par ses domaines N et C aux particules 60S au niveau de son site P occupé par un ARNt (Shao et al., 2015), il est donc probable que cette densité observée corresponde à une portion de la protéine Rqc2, utilisée comme appât pour la préparation de cet échantillon. La superposition des reconstitutions 3D obtenues à partir des datasets collectés par les microscopes Spirit (volume vert clair) et Phase plate (grillage bleu) montre que le volume occupé par cette densité supplémentaire est plus important dans le cas du Phase plate (**Figure 29**). Cependant, elle ne correspondrait qu'à une petite partie du volume théorique de Rqc2, et aucune autre densité pouvant correspondre à Rqc1, Ltn1 ou l'hexamère de Cdc48 n'est visible.

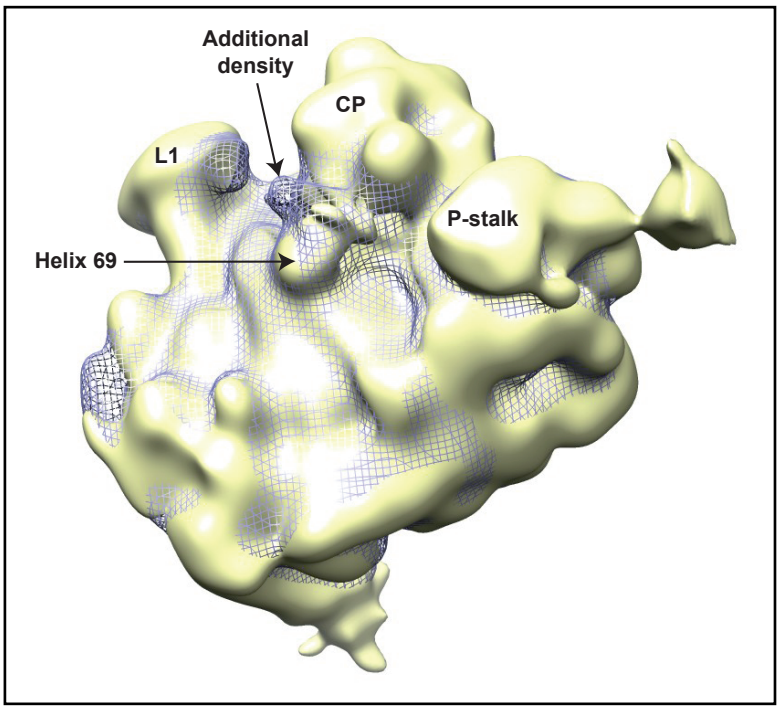


Figure 29. Reconstitutions 3D des 60S liées à Rqc2-TAP : Spirit vs Phase plate
Spirit = volume vert clair, Phase plate = grillage bleu. CP = Protubérance centrale. Analyse effectuée avec les logiciels Signature, SPIDER et RELION.

Une possibilité pouvant expliquer l'absence de densités correspondant au complexe RQC dans ces reconstitutions 3D a été proposée par Jan Schuller, étudiant en thèse dans le laboratoire de Friedrich Förster, qui a testé de nombreuses conditions de vitrification de l'hexamère de Cdc48 : lors de la congélation, que ce soit dans de l'azote liquide ou de l'éthane liquide, les hexamères de Cdc48 se dissocient immédiatement, la seule condition limitant ce phénomène est une forte concentration en sucrose (30%). Par conséquent, lors de la préparation des grilles à partir de l'échantillon Rqc2-TAP, il est possible que la présence de l'hexamère de Cdc48 ait tendance à destabiliser, voire même dissocier le complexe RQC de la particule 60S. Afin de tenter de stabiliser les facteurs Rqc1, Rqc2 et Ltn1 associés à la 60S, nous avons ensuite préparé des échantillons à partir de souches délétées du domaine RING de Ltn1, car l'absence de polyubiquitinylation par Ltn1 empêche le recrutement de Cdc48 sur les 60S bloquées (Brandman et al., 2012; Defenouillère et al., 2013). Cette fois-ci, l'appât utilisé a été Rqc1-TAP, dont l'enrichissement en particules 60S est particulièrement élevé en absence de Ltn1 ou de son domaine RING (voir **Figure S2** du manuscrit soumis à *Mol. Cell*).

La collection d'images de particules à partir de grilles cryo-EM préparées avec un éluat TEV d'une souche Rqc1-TAP Ltn1Δ*RING*, qui permet de conserver la majeure partie de la protéine Ltn1 tout en bloquant le processus de polyubiquitinylation, a permis d'établir un dataset d'environ 80000 particules, dont la classification par Christian Schmidt avec le logiciel SPIDER a révélé deux classes prépondérantes de particules 60S. La première, dont la reconstitution est présentée ci-dessous (volume gris), contient 30000 particules 60S et présente une expansion ES27 en position canonique (voir **Figure 30**). De plus, on observe deux densités supplémentaires par rapport à la 60S vide (volume rose) : une densité qui s'étend de l'ARNt situé dans le site P jusqu'au P-stalk, qui ressemble fortement à la petite densité observée pour la reconstitution obtenue avec Rqc2-TAP (**Figure 29**), et qui d'après les structures publiées récemment correspond au volume occupé par Rqc2 (Shao et al., 2015; Shen et al., 2015). L'autre densité supplémentaire est localisée de l'autre côté de la particule 60S à proximité de tunnel de sortie du peptide naissant, et pourrait être une partie du complexe RQC (Rqc1 ou Ltn1Δ*RING*) positionnée ainsi afin de détecter la présence d'un peptide naissant aberrant dans le tunnel de sortie de la 60S.

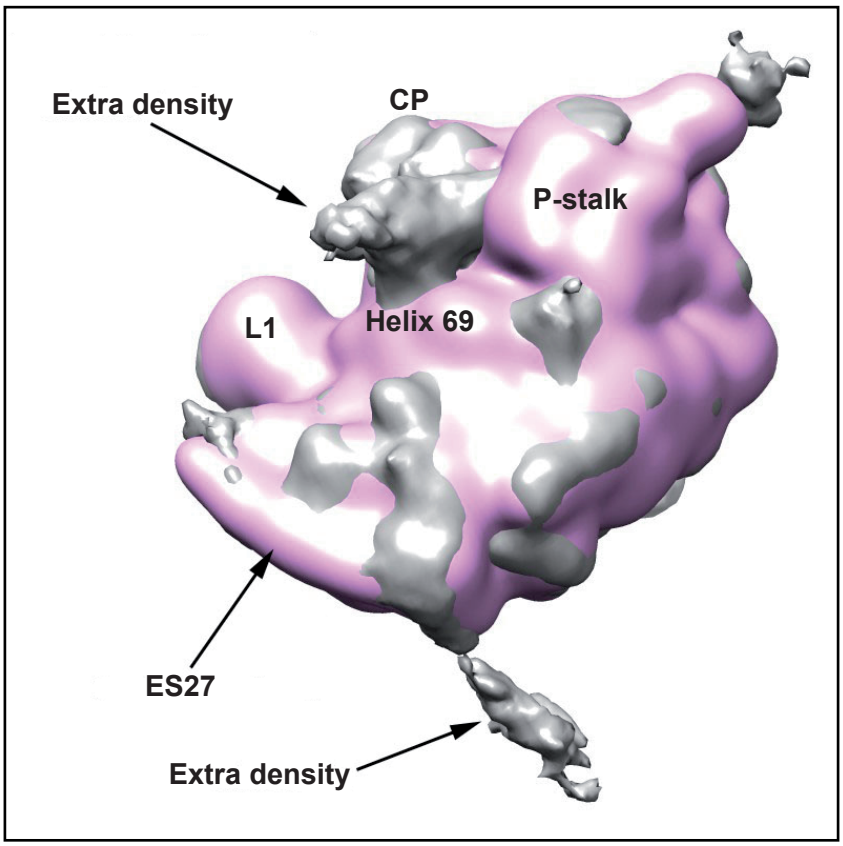


Figure 30. Reconstitution 3D des 60S purifiées avec Rqc1-TAP Ltn1Δ*RING*
Données de cryo-EM collectées avec un microscope Spirit et traitées avec SPIDER. Volume gris = reconstitution 3D Rqc1-TAP Ltn1Δ*RING*, volume rose = 60S vide.

La deuxième classe contient environ 20000 particules, qui présentent à nouveau un changement de conformation de l'ES27, comme observé lors de la reconstitution à partir du premier échantillon Rqc2-TAP (**Figure 27**). De plus, il semblerait qu'un ARNt soit présent dans le site A de la sous-unité 60S : ce phénomène, également observé puis décrit par le laboratoire de Jonathan Weissman, est lié à l'activité de Rqc2, qui recrute des ARNt Alanine et Thréonine dans le site A de la 60S bloquée afin d'ajouter une CAT tail au peptide naissant aberrant (Shen et al., 2015). Néanmoins, cette classe de particules ne présente aucune densité supplémentaire pouvant correspondre aux protéines du complexe RQC. Compte tenu de la qualité du dataset obtenu à partir des grilles Rqc1-TAP Ltn1Δ*RING*, nos collaborateurs ont réalisé une acquisition de particules avec un microscope TITAN, qui permet un grossissement plus important que le microscope Spirit, afin d'augmenter la résolution finale des densités observées. Après plusieurs étapes de classification du dataset (constitué de 5400 micrographes contenant un total de 480000 particules) avec RELION, la reconstitution 3D de la classe contenant

les deux densités décrites en **Figure 30** a été raffinée avec SPIDER, ce qui a permis d'obtenir une meilleure résolution des deux volumes correspondant à ces densités. Le Volume 1, associé à la 60S au niveau de son interface avec la 40S, présente trois extensions qui entrent en contact avec la région L1, la protubérance centrale (CP) et le "P-stalk" respectivement (**Figure 31**). Cependant, alors que les reconstitutions précédentes semblaient indiquer une interaction de ce volume avec l'ARNt présent dans le site P, il semblerait que le Volume 1 soit en réalité situé juste au dessus de l'ARNt et de l'hélice 69 sans pour autant entrer en contact direct. Le Volume 2, mieux résolu que précédemment, est localisé de l'autre côté de la 60S, et semble s'étendre sur du dessus le tunnel de sortie du peptide naissant, entrant en contact avec la 60S de part et d'autre de l'extrémité de ce tunnel. D'autres densités plus petites sont visibles sur la partie latérale du 60S (au-dessus du P-stalk sur le panel droit de la **Figure 31**), et semblent relier les deux volumes principaux entre eux. La résolution finale obtenue pour cette reconstitution est de l'ordre de 12 ångströms pour le cœur de la sous-unité 60S et pour certaines parties des densités supplémentaires, mais est beaucoup plus faible pour les parties périphériques des Volumes 1 et 2, qui sont présentés avec un filtre Gaussien (réalisé avec le logiciel Chimera) sur la **Figure 31** ci-dessous.

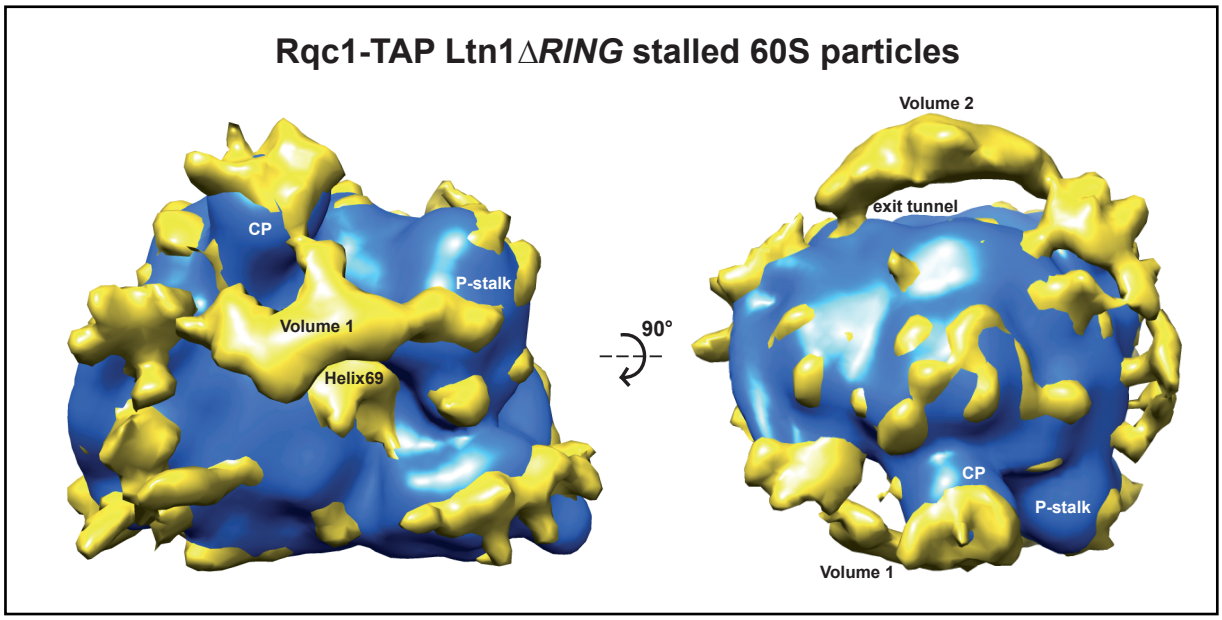


Figure 31. Reconstitution 3D du dataset TITAN de Rqc1-TAP Ltn1Δ*RING*
Données de cryo-EM collectées avec un microscope TITAN, classées avec RELION puis raffinées avec SPIDER par Christian Schmidt. Figure réalisée avec Chimera. Volume doré = reconstitution 3D de Rqc1-TAP Ltn1Δ*RING*, volume bleu = 60S vide.

Afin d'améliorer la résolution de ces volumes, Christian Schmidt a utilisé une méthode de raffinement du logiciel SPIDER appelée BPRP (Back Projection in Real Space) qui consiste à calculer la rétroprojection d'un volume à partir des petits volumes obtenus dans l'espace réel (et non dans l'espace de Fourier). Cette méthode a permis d'obtenir une meilleure résolution du Volume 1, ainsi que des petites densités additionnelles visibles entre les Volumes 1 et 2 (indiqués Volumes 3 et 4 sur la **Figure 32**). Dans cette représentation, le Volume 1 est positionné de manière similaire à précédemment, situé au-dessus de l'hélice 69 et de l'ARNt dans le site P, et possédant des contacts avec le L1-stalk, la protubérance centrale et le P-stalk. Cependant, la forme de cette densité étant à présent mieux définie, on commence à apercevoir la structure globale du volume qui pourrait correspondre à Rqc2, d'après les récentes publications de la structure de Rqc2 et Ltn1 sur la 60S.

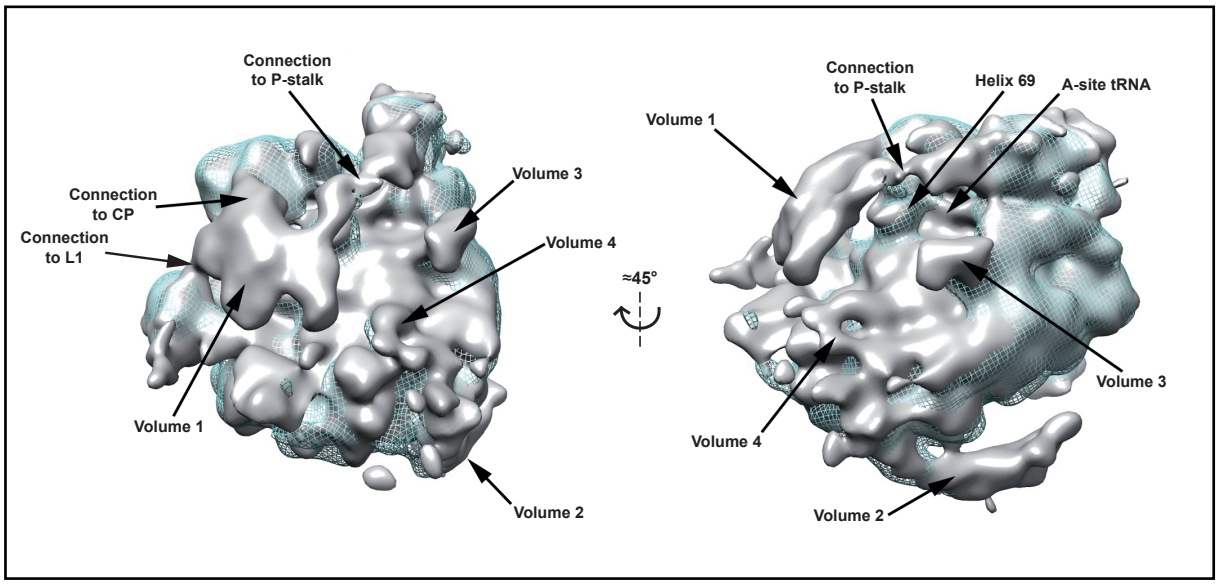


Figure 32. BPRP d'une reconstitution de la 60S liée à Rqc1-TAP en Ltn1Δ*RING*
BPRP réalisée par Christian Schmidt avec le logiciel SPIDER à partir de la reconstitution 3D présentée en **Figure 31**. Figure réalisée avec Chimera.
Volume gris = BPRP de Rqc1-TAP Ltn1Δ*RING*, grillage bleu ciel = 60S vide.

La suite de l'analyse de ce dataset n'a cependant pas permis d'obtenir une meilleure résolution des volumes observés ci-dessus, et malgré un retour à Munich et la préparation de nouveaux échantillons (Rqc2-TAP Ltn1Δ*RING*, puis Rqc1-TAP Ltn1Δ*RING rqc2*Δ pour tenter de déterminer le volume occupé par Rqc2), les acquisitions d'images avec le microscope TITAN et les analyses avec SPIDER et RELION n'ont pas permis de déterminer la position et la structure de ces facteurs sur

la particule 60S avec une résolution suffisante pour faire l'objet d'une publication. Plusieurs problèmes pourraient être à l'origine de ces limitations : tout d'abord, une trop forte hétérogénéité des particules contenues dans le dataset a pu rendre difficile les étapes de classification et de raffinement. En effet, étant donné que nous avons purifié des 60S bloquées provenant d'évènements aberrants de traduction sans utiliser de peptide naissant rapporteur (tel que le TAP-NonStop), il existe une multitude de peptidyl-ARNt différents dans le tunnel de sortie de ces 60S, ce qui augmente considérablement l'hétérogénéité du dataset, d'autant plus si la conformation ou la position des facteurs du RQC s'adaptent à chacun de ces subtrats. De plus, des limitations technologiques sont également à prendre en considération : alors que nos compétiteurs (notamment Ramanujan Hegde et Sjors Scheres) utilisent un détecteur d'électrons direct, qui permet d'acquérir plusieurs images par seconde avec une meilleure sensibilité et de les convertir immédiatement au format numérique, cette technologie n'est pas encore disponible à l'université de Munich. Par ailleurs, Jonathan Weissman nous a expliqué que leurs premiers essais avec des grilles recouvertes de carbone n'ont pas fonctionné car le complexe RQC-60S avait une forte affinité pour s'orienter dans une conformation donnée sur les grilles, ce qui biaise l'homogénéité de conformation du dataset. Ils ont par la suite réussi à obtenir des résultats de meilleure qualité en utilisant des grilles sans carbone, cependant cette technologie n'est au point que dans un nombre très restreint de laboratoires, dont celui de Yifan Cheng à l'université de San Francisco (Shen et al., 2015).

C'est alors que nous avons appris la présentation en congrès, puis la soumission pour publication, des études structurales sur le complexe RQC associé à la 60S effectuées par Claudio Joazeiro avec Bridget Carragher, puis par Jonathan Weissman avec Yifan Cheng et Adam Frost, et enfin par Ramanujan Hegde avec Sjors Scheres, à la suite de quoi notre projet structural RQC-60S a été abandonné. Cependant, la collaboration entre les laboratoires d'Alain Jacquier et de Roland Beckmann a été poursuivie, d'une part pour la réalisation de crosslinks protéine-protéine entre le complexe RQC et la 60S (présentés dans le **paragraphe 4.2**), et d'autre part pour la validation *in vivo* de l'interaction entre le complexe SKI et les ribosomes bloqués sur un ARNm aberrant Non-Stop (**Partie 5**).

4.2 Crosslinks protéine-protéine des facteurs du complexe RQC avec les protéines de la particule 60S

4.2.1 Description de la méthode de crosslink protéine-protéine au DSS

Parallèlement aux purifications effectuées pour la cryo-EM, Christian Schmidt et moi avons également préparé un échantillon purifié à partir de Rqc2-TAP dans le but de réaliser des expériences de crosslink avec un réactif appelé DSS (Disuccinimidyl suberate, voir **Figure 33**), technique disponible dans le laboratoire de Franz Herzog à l'université de Munich. Le DSS est une molécule symétrique possédant un groupement NHS-ester à chacune de ses deux extrémités, capables de se lier covalemment avec deux lysines contenues dans des polypeptides, à condition que l'espacement entre ces lysines soit inférieur à 11,4 ångströms. Par conséquent, lorsqu'on traite un échantillon contenant des protéines au DSS, les lysines crosslinkées entre elles sont nécessairement proches l'une de l'autre. Après cette étape de crosslink, l'échantillon est traité à la trypsine afin d'obtenir des peptides identifiables en spectrométrie de masse. La trypsine digère les protéines en C-terminal des lysines et des arginines, cependant les lysines crosslinkées par le DSS sont protégées de la digestion : l'échantillon après digestion contient donc aussi des peptides covalemment liés par leur lysine respective *via* une molécule de DSS, entité appelée "dipeptide". L'analyse de cet échantillon crosslinké qui contient à la fois des peptides et des dipeptides par LC-MS/MS nécessite l'analyse en parallèle d'un aliquot de l'échantillon non crosslinké pour déterminer l'ensemble des protéines présentes. Ce contrôle est important car il va permettre au logiciel xQuest (Leitner et al., 2014) d'établir une base de données de l'ensemble des dipeptides pouvant théoriquement exister dans cet échantillon. Cette base de données contient les valeurs de m/z de toutes les combinaisons possibles de crosslinks Lysine-DSS-Lysine entre toutes les protéines identifiées dans l'échantillon contrôle non crosslinké. Par conséquent, le nombre de dipeptides listés augmente exponentiellement avec le nombre de protéines identifiées. Une fois cette base de données établie, les m/z des spectres identifiés par LC-MS/MS pour l'échantillon crosslinké sont comparés à la fois aux peptides et aux dipeptides théoriques contenus dans cette base de données par le logiciel xProphet, ce qui permet d'identifier les peptides crosslinkés entre eux par une molécule de DSS. En conclusion, cette technique peut s'avérer très informative sur la proximité de

certaines lysines contenues dans une protéine d'intérêt, par rapport à des lysines contenues soit dans cette même protéine, soit dans une autre protéine, ou bien dans un complexe macromoléculaire contenant des protéines tel que le ribosome.

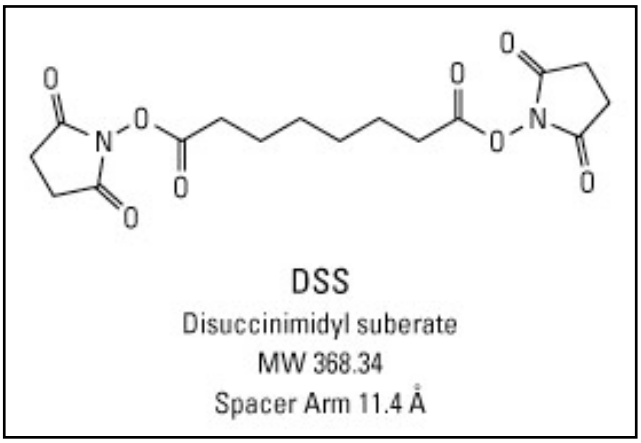


Figure 33. Formule chimique du Disuccinimidyl suberate ou DSS
N° d'identification du composant (CID) : 100658.

Premièrement, notre éluat TEV de Rqc2-TAP a été testé avec des concentrations croissantes de DSS, afin de déterminer quelle concentration minimale de DSS est nécessaire pour crosslinker les protéines d'intérêt. Une coloration au nitrate d'argent des échantillons de test réalisée par Franz Herzog est présentée en **Figure 34** : sans DSS on observe les bandes correspondant au complexe RQC, cependant plus l'excès de DSS par rapport au nombre total théorique de lysines dans l'échantillon augmente, plus ces bandes disparaissent, ce qui suggère que la proportion de protéines du RQC crosslinkées augmente au fur et à mesure que les lysines sont saturées par le DSS. Pour la plupart des protéines ribosomiques (Rpl), on n'observe pas de variation en fonction de l'excès de DSS, ce qui est attendu car la plupart des Rpl sont uniquement liées à l'ARN ribosomique et situées à plus de 11,4 ångströms des autres Rpl, et ne peuvent donc pas être crosslinkées au DSS.

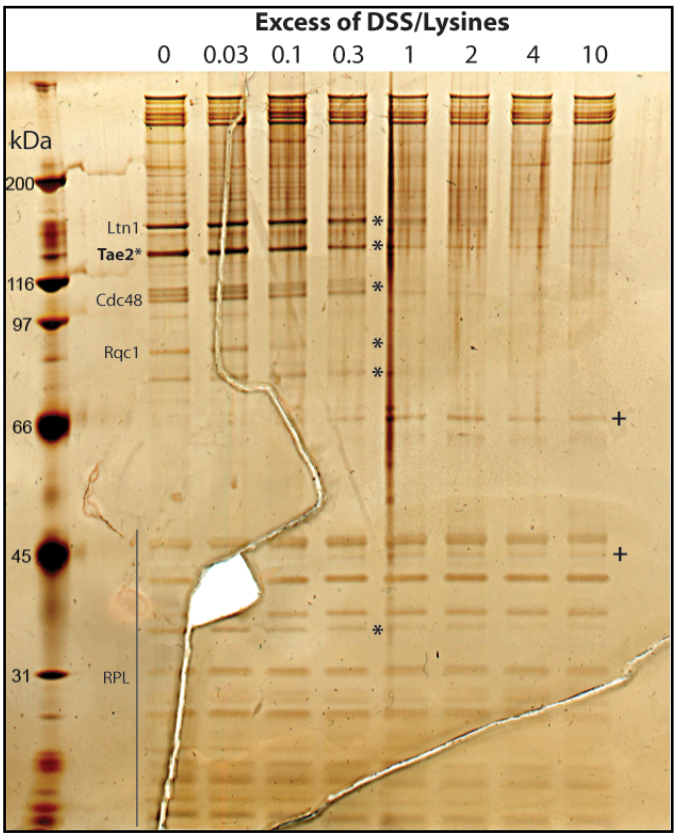


Figure 34. Test de crosslink protéine-protéine au DSS de Rqc2-TAP
Les ratios d'excès de DSS par rapport aux Lysines sont estimés en fonction de la quantité totale théorique de lysine par masse de protéines. Tae2 = Rqc2. Les * et les + représentent les protéines disparaissant et apparaissant en fonction de la concentration croissante de DSS, respectivement.

4.2.2 Résultats du crosslink au DSS de l'échantillon Rqc2-TAP

Suivant les résultats de ce test, nous avons choisi de crosslinker l'ensemble de l'échantillon restant (en conservant un aliquot non crosslinké) avec un rapport DSS/Lysines de 1 (quantités théoriquement équimolaires), car à cette concentration de DSS la majorité des protéines du complexe RQC sont déjà crosslinkées, or un trop fort excès de DSS peut conduire à l'apparition de crosslinks non spécifiques (bruit de fond). Les échantillons crosslinkés et non-crosslinkés ont ensuite été analysés par Franz Herzog en LC-MS/MS, et les dipeptides obtenus pour les protéines du complexe RQC sont présentés dans le **Tableau 1**. De manière à mieux comprendre la position des crosslinks obtenus les uns par rapport aux autres, nous les avons cartographiés sur une superposition de structures cryo-EM et par cristallographie aux rayons X de la 60S (**Figure 34**).

Protéine du RQC (Lysine crosslinkée)	Protéine de la 60S (Lysine crosslinkée)
Rqc2 (K810, K849, K874)	Rpl2 (K155)
Rqc2 (K874)	Rpl23 (K66)
Rqc2 (K211)	Rpl16 (K176)
Rqc1 (K40)	Rpl2 (K155)
Rqc1 (K40)	Rpl23 (K64)
Rqc1 (K32)	Rpl8 (K122)
Ltn1 (K123)	Rpl24 (K91)
Ltn1 (K127)	Rpl35 (K32)
Ltn1 (K227)	Rpl18 (K98)
Ufd1 (K211)	Rpl21 (K97)

Tableau 1. Crosslinks au DSS des protéines du RQC obtenues avec Rqc2-TAP
Chaque ligne représente un crosslink entre la protéine indiquée dans la colonne de gauche avec la protéine indiquée dans la colonne de droite. D'autres crosslinks indépendants du complexe RQC (environ 45 crosslinks) ont aussi été identifiés et relient majoritairement des Rpl situées à proximité l'une de l'autre sur la structure de la 60S, ce qui valide la qualité de l'ensemble des dipeptides obtenus.

La première observation est que ces résultats ne contiennent aucun dipeptide entre des protéines du RQC, seulement des dipeptides entre protéines du RQC et Rpl. Parmi ces 12 dipeptides RQC-60S, on remarque que les lysines situées entre les amino-acides 810 à 874 de Rqc2 ont tendance à crosslinker avec Rpl2 et Rpl3, alors que la lysine K211 de Rqc2 possède un crosslink avec Rpl16. Le N-ter de Rqc1 présente aussi des crosslinks avec Rpl2 et Rpl23, ainsi qu'avec Rpl8. Enfin, des crosslinks du N-ter de Ltn1 ont été obtenus avec Rpl18, Rpl24 et Rpl35, et un crosslink a été trouvé pour Ufd1 avec Rpl21. On peut constater une très forte similitude entre les crosslinks de Rqc1 et de Rqc2 : en effet, ces protéines ont toutes deux des lysines crosslinkées avec les lysines K155 de Rpl2 et K64/K66 de Rpl23. Par conséquent, le N-terminal de Rqc1 pourrait être situé à proximité de Rpl2 et de Rpl23, ainsi que du fragment de Rqc2 constitué des amino-acides 810 à 874 (proches de l'extrémité C-terminale) : il se pourrait également que le N-ter de Rqc1 et le C-ter de Rqc2 interagissent ensemble au niveau des protéines Rpl2 et Rpl23, qui sont situées relativement proches l'une de l'autre sur la particule 60S (les lysines

crosslinkées de ces Rpl sont à 84 ångströms de distance). Par ailleurs, un crosslink du N-ter de Rqc1 indique un rapprochement avec Rpl8, or cette protéine ribosomique se trouve à proximité de Rpl2, ce qui conforte l'hypothèse que Rqc1 interagit avec la 60S (ou avec Rqc2) dans cette région localisée à l'interface de la 60S avec la 40S. Cependant, étant donné qu'aucun crosslink n'est disponible pour la partie C-terminale de Rqc1, il est impossible de déterminer la conformation adoptée par Rqc1 par rapport à la particule 60S. Un crosslink du N-ter de Rqc2 (K211) avec Rpl16 suggère que cette partie de Rqc2 serait localisée aux alentours du P-stalk. Etant donné que Rpl2 et Rpl23 se situent à proximité de l'hélice 69 et de l'ARNt localisé dans le site P de la 60S (voir **Figure 34**), ces données de crosslink sont en accord avec les structures cryo-EM de Rqc2/NEMF récemment publiées, montrant que l'association de Rqc2/NEMF a lieu au niveau de l'interface avec la 40S, à proximité des ARNt présents dans les sites P et A (Shao et al., 2015; Shen et al., 2015).

Les crosslinks obtenus pour Ltn1 sont tous localisés sur la partie N-terminale de cette E3 ubiquitine ligase, et ciblent l'autre coté de la particule 60S, certains dans des régions relativement proches du tunnel de sortie du peptide naissant (notamment Rpl18 et Rpl35, voir **Figure 34**). Tandis que les crosslinks de Rqc2 sont en adéquation avec le Volume 1 de la reconstitution que nous avons obtenue par cryo-EM, les crosslinks de Ltn1 pourraient correspondre au Volume 2, également localisé sur le dessus du tunnel sortie du polypeptide dans cette reconstitution (**Figures 31** et **32**). De plus, ceci serait en accord avec la structure publiée de Ltn1/Listerin, qui montre des régions d'interaction à la fois avec Rqc2/NEMF proches du P-stalk, mais aussi à proximité du tunnel de sortie du peptide, au niveau des protéines Rpl22 et Rpl31 (Shao et al., 2015). Enfin, un crosslink a été trouvé pour la protéine Ufd1, co-facteur de l'hexamère de Cdc48, avec Rpl21, protéine située à la base de la protubérance centrale. Cependant, la p-value d'identification du dipeptide Ufd1-Rpl21 étant à la limite du seuil imposé par le logiciel XProphet, il est possible que cette interaction ne reflète pas une proximité réelle entre ces protéines.

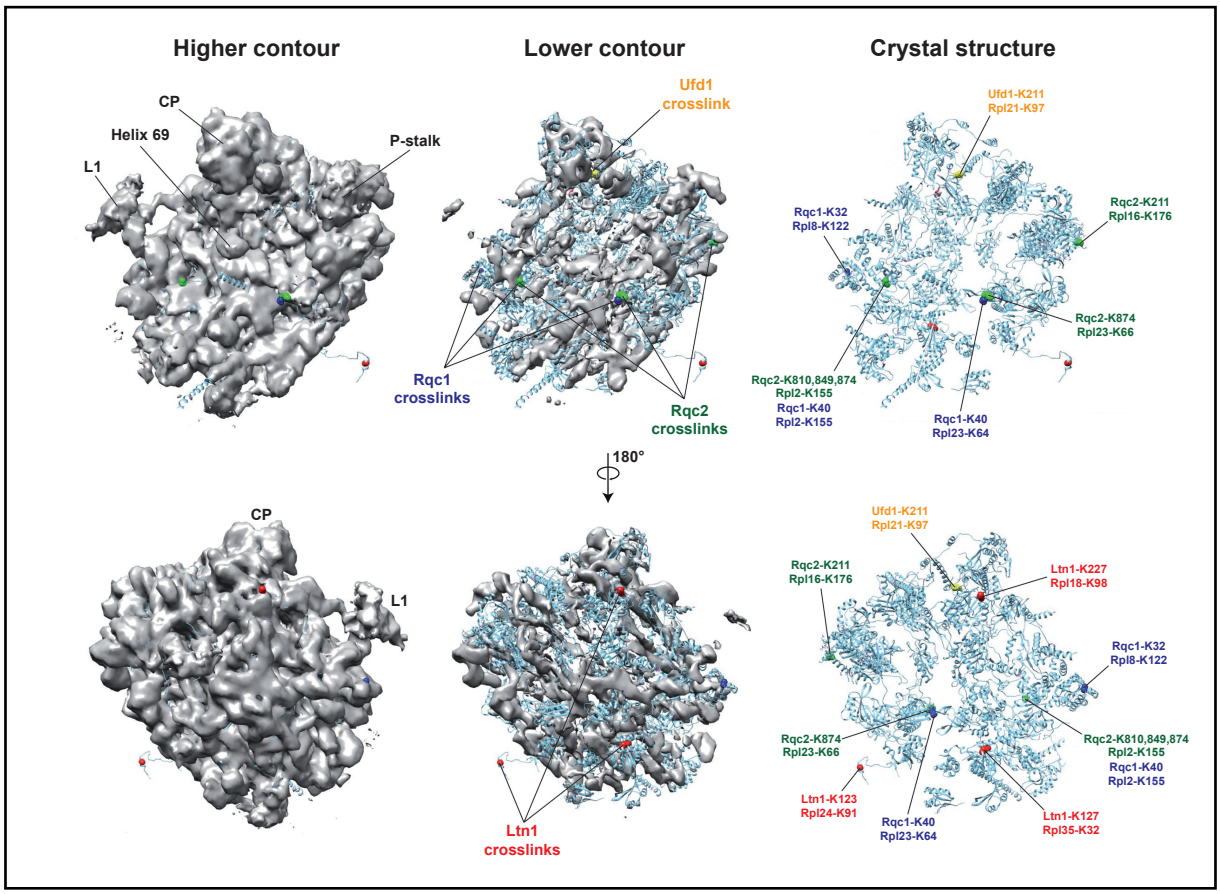


Figure 34. Crosslinks au DSS du RQC positionnés sur la particule 60S

Les volumes obtenus par cryo-EM (en gris) sont représentés avec un contour de niveau élevé (à gauche) ou faible (au milieu). La structure aux rayons X des protéines ribosomiques sur la 60S est représentée sur la droite.

Les crosslinks sont représentés par des points verts pour Rqc2, bleus pour Rqc1, rouges pour Ltn1 et jaunes pour Ufd1. Images réalisées par Christian Schmidt.

La comparaison des dipeptides protéine-protéine pour le complexe RQC-60S avec les données structurales de Rqc2 et Ltn1 sur la 60S par cryo-EM révèle une corrélation entre les positions des crosslinks et la localisation de ces facteurs du RQC sur la 60S. Cependant, étant donné qu'aucune structure n'est disponible pour Rqc1, nos données de crosslinks concernant cette protéine apportent des informations inédites sur la position que Rqc1 pourrait adopter en association avec la 60S et les autres facteurs du RQC. En effet, nos résultats Rqc1 suggèrent que le domaine N-terminal de cette protéine serait situé à proximité de l'hélice 69 et du peptidyl-ARNt dans le site P de la 60S (région entre Rpl2 et Rpl23), une région où se trouvent également les domaines N-ter et C-ter de Rqc2 (Shao et al., 2015). Etant donné la fonction importante du domaine C-terminal de Rqc2 à cet endroit pour l'ajout de CAT tails ou peptide naissant (Shen et al., 2015), et le rôle de Rqc1 dans la

prévention de l'agrégation des protéines aberrantes contenant des CAT tails (résultats de la **Partie 3**), il est possible que cette localisation du domaine N-terminal de Rqc1, à proximité du lieu d'addition des CAT tails, permette à Rqc1 de protéger ces CAT tails nouvellement ajoutées par Rqc2 de l'agrégation protéique, durant l'extraction des peptides aberrants de la 60S et pendant leur escorte au protéasome.

Enfin, il est important de mentionner que ce type d'expérience de crosslinks au DSS nécessite normalement 20 à 30 microgrammes d'échantillon protéique au départ, or nous n'avions que 6 microgrammes disponibles à la suite des tests de crosslink. Il est donc probable qu'une répétition de cette expérience avec une plus grande quantité de complexe RQC-60S purifié au départ permette d'identifier davantage de dipeptides, non seulement entre les facteurs du RQC et des Rpl, mais peut-être aussi entre protéines du complexe RQC, étant donné la proximité du N-ter de Rqc1 avec les domaines N-ter et C-ter de Rqc2, et du domaine M de Rqc2 avec le N-ter de Ltn1 (Shao et al., 2015).

4.3 Crosslinks protéine-ARN de Rqc1 et Rqc2 avec l'ARNr 25S

4.3.1 Description de la méthode de crosslink protéine-ARN aux UV (CRAC)

De manière complémentaire à cette expérience de crosslink protéine-protéine, Gwenaël Badis-Bréard, du laboratoire d'Alain Jacquier, a réalisé des expériences de crosslink protéine-ARN par une méthode appelée CRAC pour UV Crosslinking and High-Throughput Analysis of cDNAs (Granneman et al., 2009), qui permet d'identifier des sites de fixation à l'ARN de protéines pouvant interagir avec l'ARN. Etant donné que Rqc1 et Rqc2 se lient tous deux à la sous-unité 60S, il est possible que ces protéines se lient aux ARN composant la grande sous-unité ribosomique, notamment l'ARNr 25S. Nous avons donc construit des souches Rqc1-CRAC et Rqc2-CRAC, dont l'étiquette en C-terminal est similaire à l'étiquette TAP, sauf que la séquence CBP (Calmodulin Binding Peptide) est remplacée par 6 Histidines ce qui permet une deuxième étape de purification sur colonne de Nickel en conditions dénaturantes. Cette technique utilise une méthode de crosslink aux UV à une longueur d'onde de 254nm, permettant de créer des liaisons covalentes entre des ARN et des protéines situés à proximité les uns des autres. La protéine appât (dans notre cas, Rqc1 ou Rqc2) est ensuite purifiée, puis un traitement ménagé à la RNAse permet de réduire la taille des ARN crosslinkés, cependant les fragments d'ARN à proximité des points

de crosslink sont protégés de la dégradation grâce à la présence de la protéine appât. L'échantillon est alors dénaturé afin de désactiver les RNAses et d'éliminer tous les composants liés non covalemment à l'appât, purifié sur colonne de nickel en conditions dénaturantes, marqué radioactivement au ^{32}P, migré en SDS-PAGE et transféré sur membrane de nitrocellulose, et la région de la membrane correspondant à la protéine appât liée à des fragments d'ARN est détectée grâce à sa radioactivité et découpée sur un gel non transféré migré en parallèle. Enfin, la protéine est dégradée par digestion à la protéinase K, les fragments d'ARN sont réverse transcrits, et l'ADNc est amplifié par PCR, cloné puis séquencé avec un séquenceur Illumina. Afin de déterminer les sites de fixation de la protéine d'intérêt, les reads obtenus sont alignés sur le génome de *Saccharomyces cerevisiae*, et ceux correspondant au bruit de fond sont identifiés grâce à un échantillon contrôle sans crosslink aux UV.

4.3.2 Résultats de crosslinks obtenus pour Rqc1-CRAC et Rqc2-CRAC

Les résultats de CRAC obtenus par Gwenaël Badis-Bréard pour Rqc1 et Rqc2 ont révélé un fragment d'ARN spécifiquement enrichi pour chacune de ces protéines, dont les reads obtenus par séquençage Illumina sont tous deux localisés sur l'ARNr 25S (**Figure 35A**). Ces fragments correspondent donc à des sites de fixation à l'ARNr 25S de Rqc1 et de Rqc2, respectivement. Les résultats de crosslink obtenus pour Rqc1-CRAC sont cependant préliminaires et doivent être répétés, afin d'être comparés avec un contrôle négatif sans crosslink aux UV. Afin de déterminer la localisation de ces sites de fixation à l'ARN de Rqc1 et de Rqc2 sur la particule 60S, les positions des fragments d'ARN sur l'ARNr 25S ont été surlignés (**Figure 35B**) sur la structure du 60S de *Saccharomyces cerevisiae* obtenue par cristallographie aux rayons X (Ben-Shem et al., 2010). On remarque que le site de fixation à l'ARNr de Rqc2 se situe au niveau de l'interface de la 60S avec la 40S, à proximité de l'hélice 69 et du peptidyl-ARNt dans le site P. De plus, ce fragment d'ARNr est localisé à moins de 10 ångströms des sites de crosslink de Rqc1 et de Rqc2 sur la lysine 155 de Rpl2. Par conséquent, ce résultat de CRAC pour Rqc2 est en parfaite adéquation à la fois avec les structures cryo-EM publiées de Rqc2 sur la 60S (Shao et al., 2015; Shen et al., 2015), mais aussi avec nos résultats de crosslinks protéine-protéine au DSS, ce qui confirme que la position de Rqc2 sur la 60S se situe entre Rpl2 et Rpl23 (**Figure 34**).

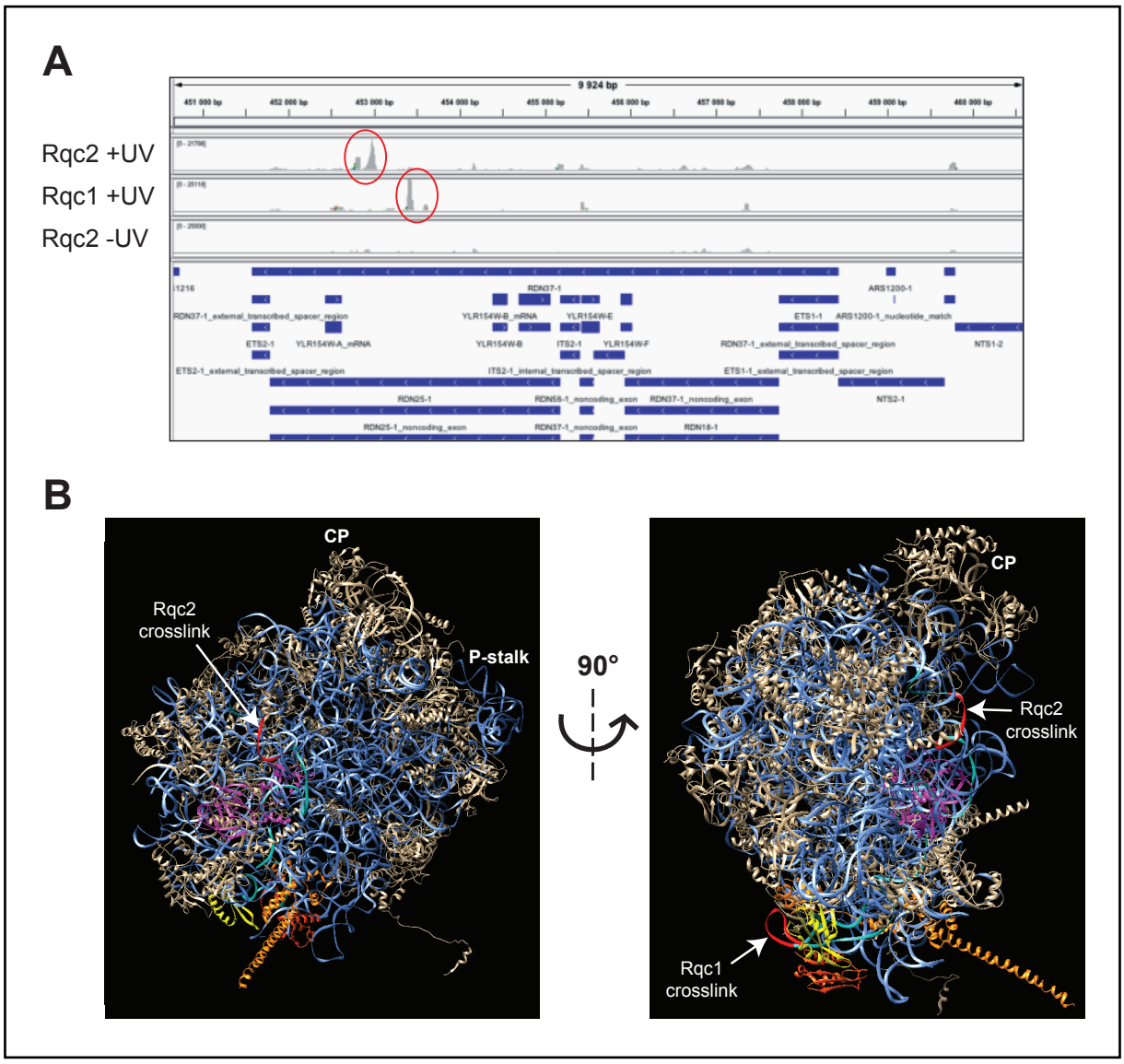


Figure 35. Crosslinks protéine-ARN obtenus par CRAC avec Rqc1 et Rqc2
(**A**) Alignement sur l'ADNr des reads obtenus par séquençage Illumina des ADNc pour Rqc2-CRAC (avec et sans crosslink aux UV) et Rqc1-CRAC (avec UV). (**B**) Positionnement des fragments d'ARNr crosslinkés avec Rqc2-CRAC et Rqc1-CRAC (en rouge) sur la structure du 60S (Ben-Shem et al., 2010). Expériences de CRAC et images réalisées par Gwenaël Badis-Bréard.

Le site de fixation de Rqc1 à l'ARNr 25S se situe sur le côté de la particule 60S, à proximité des segments d'expansion ES3 et ES19 (**Figure 35B**). Cependant, contrairement au crosslink au DSS, nous ne pouvons pas savoir quelle partie de Rqc1 interagit avec ce fragment d'ARN. Par conséquent, même si cette position est assez éloignée des crosslinks protéine-protéine obtenus pour le N-ter de Rqc1 avec Rpl2, Rpl8 et Rpl23, il est possible que cette protéine parcoure la particule 60S de

manière à ce que son extrémité C-terminale se trouve positionnée à proximité des segments ES3 et ES19. De plus, ce fragment d'ARNr étant situé à seulement 20 ångströms du crosslink de Ltn1 avec Rpl35, on pourrait aussi imaginer que le C-terminal de Rqc1 entre en contact avec Ltn1 dans cette région de la 60S, permettant ainsi à Rqc1 de relier physiquement Rqc2 et Ltn1 *via* les interactions de ses domaines N-ter et C-ter, respectivement.

En conclusion, même si notre étude structurale n'a pas permis d'aboutir à des résolutions suffisantes concernant les volumes occupés par les protéines du complexe RQC, nos expériences de crosslink protéine-protéine et ARN-protéine corroborent les résultats des publications révélant par cryo-EM les positions de Rqc2 et de Ltn1 sur la particule 60S. De plus, la structure de Rqc1 demeurant totalement inconnue à ce jour, nos données de crosslink apportent des informations intéressantes quant à la position et la conformation adoptées par Rqc1 sur la particule 60S et par rapport aux autres protéines du complexe RQC.

5 - Validation *in vivo* de l'interaction du complexe SKI avec les ribosomes bloqués

Lors de ma deuxième visite au laboratoire de Roland Beckmann à Munich dans le cadre de notre collaboration sur la structure du complexe RQC, Christian Schmidt et Thomas Becker m'ont parlé d'un autre projet structural qu'ils avaient initié en collaboration avec le laboratoire d'Elena Conti de l'Institut Max Planck pour la Biochimie à Martinsried. Le but de ce projet était de reconstituer la liaison du complexe SKI à des ribosomes bloqués en cours de traduction, à partir de la traduction *in vitro* d'un ARNm aberrant Non-Stop avec des formes recombinantes des protéines Ski2, Ski3 et Ski8 (formant le complexe SKI) précédemment produites dans le laboratoire d'Elena Conti (Halbach et al., 2013). Après incubation des ribosomes bloqués avec un excès de protéines Ski2, Ski3 et Ski8, les complexes SKI-80S ainsi formés ont été concentrés à l'aide d'un coussin de sucrose, puis analysés par cryo-microscopie électronique, ce qui a permis à Christian Schmidt de déterminer la structure et la position occupée par le complexe SKI en association avec les 80S bloqués. Par ailleurs, la littérature ne faisant état que d'interactions du complexe SKI avec Ski7 et l'exosome cytoplasmique (Araki et al., 2001), nous avons

réalisé des Western blots sur fractions de gradient de sucrose pour montrer que les protéines du complexe SKI interagissaient avec des ribosomes *in vivo*. Cependant, ces expériences concernaient l'ensemble des 80S de la cellule : il manquait donc une preuve que cette structure du complexe SKI lié au 80S bloqué correspondait effectivement à un complexe qui pouvait exister naturellement, et non un artefact dû au fort excès des protéines Ski, condition nécessaire pour observer une interaction du complexe SKI avec les ribosomes bloqués suite à un évènement aberrant de traduction *in vitro*. C'est alors qu'ils m'ont demandé de réaliser des purifications d'affinité couplées à un gradient de sucrose en utilisant le rapporteur aberrant TAP-NonStop (voir **Figure 23** de la **Partie 2**), dans des mutants de facteurs du NSD-NGD afin de stabiliser une étape où le complexe SKI est lié au 80S bloqué. Sachant que le complexe SKI est recruté en 3' du ribosome bloqué de manière à recruter l'exosome cytoplasmique pour dégrader le transcrit aberrant du 3' vers le 5', j'ai émis l'hypothèse qu'une délétion des facteurs de recyclage des ribosomes bloqués (notamment Dom34 et Hbs1) pourrait maintenir le ribosome bloqué sous forme 80S, et ainsi empêcher la dégradation exonucléolytique par le complexe SKI-exosome. Par conséquent, il est possible qu'en absence de Dom34 l'interaction du complexe SKI avec les ribosomes bloqués soit stabilisée, et que ce complexe SKI-ribosome bloqué puisse être purifié à l'aide du TAP-NonStop. Une autre possibilité est que l'exosome ne puisse plus être recruté par le complexe SKI en absence de Ski7, d'après les publications suggérant que Ski7 agit comme un adaptateur entre le complexe SKI et l'exosome cytoplasmique chez *Saccharomyces cerevisiae* (Araki et al., 2001; Halbach et al., 2013). Par conséquent, en absence de Ski7, il est possible que le complexe SKI reste associé aux ribosomes bloqués de manière stable, car l'ARNm aberrant Non-Stop est fortement stabilisé en absence de recrutement de l'exosome cytoplasmique.

J'ai donc réalisé des purifications sur gradient de sucrose du TAP-NonStop dans des mutants *dom34*Δ et *ski7*Δ, puis analysé les fractions du gradient par coloration de gel d'acrylamide. En parallèle, un aliquot de l'éluat TEV et des fractions correspondant au 80S ont été analysés par LC-MS/MS par Abdelkader Namane. Les résultats de ces purifications montrent un enrichissement en particules 80S au niveau des profils polysomes (**Figure 36A**) et des colorations de gel au nitrate d'argent (**Figure 36B**), et l'abondance de ces 80S purifiés rapportée à l'absorbance

mesurée dans les fractions légères du gradient semble plus importante dans le cas du mutant *dom34*Δ, ce qui pourrait provenir du fait que Dom34 est essentiel à la dissociation des ribosomes bloqués. En effet, les 80S bloqués n'étant plus dissociés en absence de Dom34, il est logique d'observer une plus forte accumulation de ces 80S en absence de Dom34 qu'en absence de Ski7. On constate également la présence de polysomes purifiés dans ces deux mutants avec le TAP-NonStop, que ce soit au niveau du profil d'absorbance que des colorations de gel.

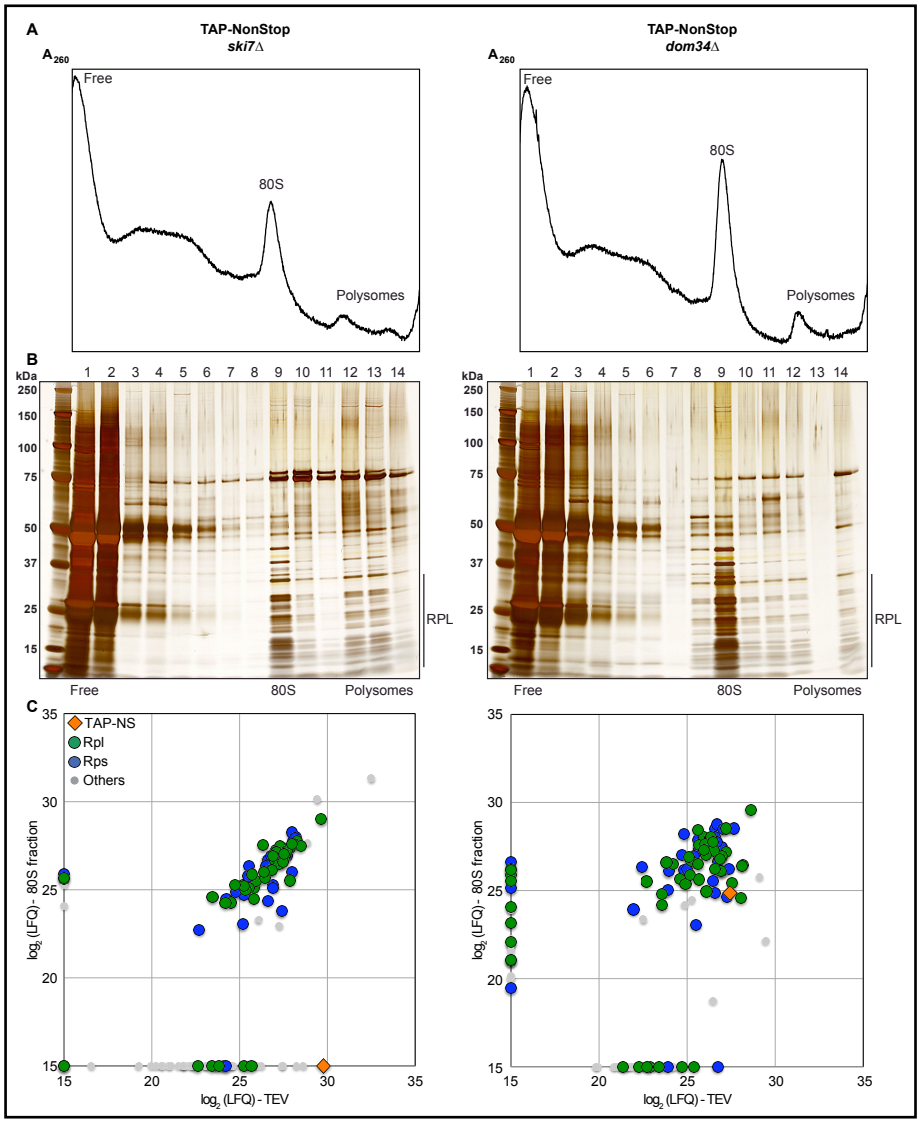


Figure 36. Purifications sur gradients du TAP-NonStop en *ski7*Δ et *dom34*Δ
(**A**) Profils d'absorbance à 260nm des ultracentrifugations d'éluats TEV du TAP-NS. (**B**) Gels NuPAGE colorés au nitrate d'argent des fractions du gradient de sucrose. (**C**) Identifications par LC-MS/MS et quantifications LFQ des protéines présentes dans les fractions 80S face aux contrôles "Éluat TEV" respectifs de chaque mutant.

Cependant, bien que des bandes de haut poids moléculaire qui pourraient correspondre à Ski2 et Ski3 (146kDa et 163kDa respectivement) sont visibles sur les gels au niveau des fractions 80S et des polysomes, aucune protéine correspondant au complexe SKI n'a été detectée en spectrométrie de masse, ni au niveau de l'éluat TEV, ni dans les fractions contenant les particules 80S bloquées (**Figure 36C**). Étant donné que chacun de ces mutants présentent tout de même un enrichissement intéressant en particules 80S bloquées, j'ai ensuite testé si une double délétion de Dom34 et de Ski7 pouvait avoir un effet additif sur l'accumulation de ces ribosomes bloqués après purification avec le TAP-NonStop, afin d'atteindre un enrichissement suffisant qui pourrait permettre d'identifier les protéines du complexe SKI dans les fractions ribosomiques en LC-MS/MS.

J'ai alors purifié le TAP-NonStop en utilisant le double mutant *ski7*Δ*dom34*Δ, ainsi que le double mutant *ski7*Δ*hbs1*Δ, afin d'optimiser les conditions de stabillisation à la fois des ARNm aberrants et des ribosomes bloqués pour essayer de montrer l'existence d'une interaction du complexe SKI avec ces ribosomes bloqués *in vivo*. Les profils d'absorbance de ces deux purifications sur gradient révèlent un fort enrichissement en particules 80S bloquées ainsi qu'en disomes et trisomes, les polysomes plus lourds n'étant pas visibles sur ces gradients de sucrose 10-30% (**Figure 37A**). Les colorations de gel confirment la forte accumulation en protéines ribosomiques dans ces fractions de haute sédimentation (9 à 14), particulièrement pour les fractions 9-10 correspondant aux 80S (**Figure 37B**). De manière intéressante, les bandes de haut poids moléculaire autour de 150kDa co-sédimentant avec ces fractions 80S, qui pourraient correspondre aux protéines Ski2 et Ski3, sont plus intenses dans ces purifications avec des doubles mutants que précédemment observé avec les simples mutants (**Figure 36B**). Nous avons donc à nouveau analysé les fractions 80S par spectrométrie de masse en utilisant un aliquot contrôle "Éluat TEV" avant ultracentrifugation. Les résultats de ces analyses LC-MS/MS ont révélé un enrichissement avec le TAP-NonStop non seulement des Rpl et des Rps, mais aussi des trois protéines composant le complexe SKI (Ski2, Ski3 et Ski8) spécifiquement dans la fraction 80S, et ce pour les deux doubles mutants testés, *ski7*Δ*dom34*Δ et *ski7*Δ*hbs1*Δ (**Figure 37C**). Le fait que ces trois protéines n'aient pas été identifiées dans l'éluat TEV ne veut pas dire qu'elles sont absentes de cet échantillon (ce qui n'est pas le cas puisque l'éluat TEV est en réalité un aliquot

avant séparation sur gradient), mais signifie que Ski2, Ski3 et Ski8 ne sont pas suffisamment abondantes par rapport à l'ensemble des protéines présentes dans cet échantillon, contenant majoritairement des protéines ribosomiques et des contaminants de faible sédimentation tels que la protéase TEV, les chaînes d'anticorps, les kératines ou les protéines très abondantes chez *Saccharomyces cerevisiae*. Par conséquent, c'est bien la séparation des complexes selon leur coefficient de sédimentation qui a permis d'isoler les particules 80S bloquées après leur purification avec le TAP-NonStop, et d'identifier la présence du complexe SKI associé à ces ribosomes.

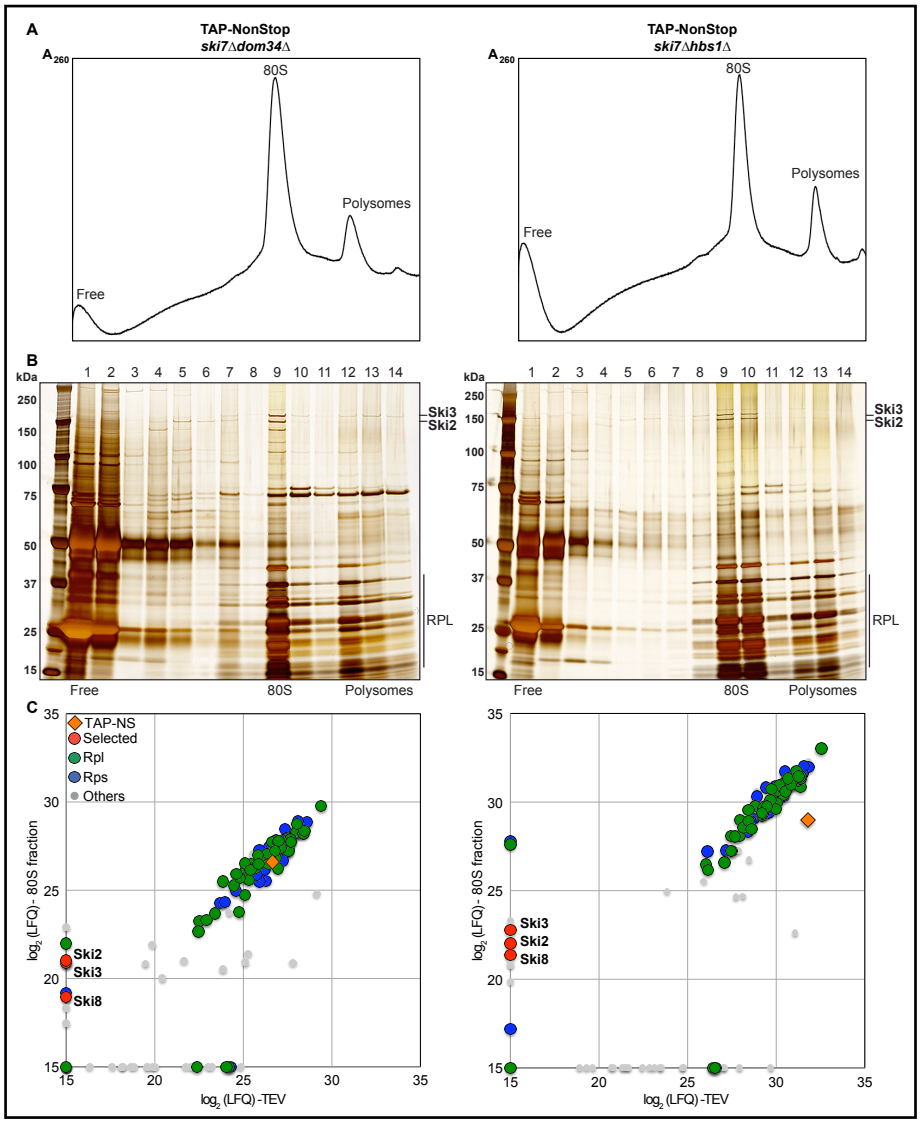


Figure 37. Purifications sur gradient du TAP-NS en *ski7Δdom34Δ* et *ski7Δhbs1Δ*
(**A**) Profils d'absorbance à 260nm des ultracentrifugations d'éluats TEV du TAP-NS. (**B**) Gels NuPAGE colorés au nitrate d'argent des fractions du gradient de sucrose. (**C**) Identifications par LC-MS/MS et quantifications LFQ des protéines présentes dans les fractions 80S face aux contrôles "Éluat TEV" de chaque double mutant.

Le complexe SKI ayant été identifié uniquement dans ces fractions 9-10 par LC-MS/MS, on peut conclure qu'il co-sédimente spécifiquement avec les particules 80S après purification avec le TAP-NonStop, ce qui prouve l'existence de cette interaction entre le complexe SKI et des ribosomes bloqués suite à la traduction d'un ARN messager aberrant Non-Stop *in vivo*. Cependant, ces résultats apportent d'autres informations importantes concernant les mécanismes de contrôle qualité NSD et NGD : en effet, ils montrent qu'il existe un effet additif entre la délétion d'un des facteurs de recyclage des ribosomes bloqués (Dom34 ou Hbs1) et du facteur Ski7, étant donné que la quantité de particules 80S bloquées purifiées est plus importante dans ces doubles mutants que dans les simples mutants. De plus, ils révèlent que le complexe SKI peut être recruté sur ces ribosomes bloqués indépendamment de la présence de l'hétérodimère Dom34-Hbs1, et en combinaison avec les données obtenues avec les purifications du TAP-NonStop en absence de Ski2 (**Figure 23** de la **Partie 2**), on peut conclure que les recrutements des complexes SKI et Dom34-Hbs1 sur les ribosomes bloqués sont des évènements ayant lieu de manière indépendante l'un de l'autre. Enfin, ces résultats sont en accord avec l'hypothèse que Ski7 serait recruté après le complexe SKI pour permettre le recrutement de l'exosome de manière efficace (Araki et al., 2001; Halbach et al., 2013), et non que Ski7 reconnaîtrait le site A vide du ribosome bloqué pour permettre le recrutement du complexe SKI, comme précédemment supposé. L'ensemble du travail structural effectué *in vitro* par Christian Schmidt sur la cryo-microscopie électronique du complexe SKI-80S à partir des protéines Ski recombinantes produites par le laboratoire d'Elena Conti, combiné aux purifications sur gradient confirmant l'existence de cette interaction *in vivo* (**Figures 36** et **37**), font à présent l'objet d'un manuscrit dont Christian Schmidt est premier auteur et dont je serai co-auteur, qui va être prochainement soumis pour publication au journal *Nature* (Schmidt C. *et al.*, 2015).

DISCUSSION

ET

PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

1 - Cibles naturelles du NSD-NGD et signaux de reconnaissance

Depuis la découverte des mécanismes de contrôle qualité des transcrits conduisant à un arrêt traductionnel (Frischmeyer et al., 2002; Doma and Parker, 2006), de nombreuses études ont révélé plusieurs processus moléculaires permettant notamment l'arrêt des ribosomes par Asc1 et Hel2, la dissociation de ces ribosomes bloqués par les facteurs Dom34, Hbs1 et Rli1, la dégradation des transcrits aberrants par l'exosome cytoplasmique avec le complexe SKI et Ski7, la reconnaissance et la polyubiquitinylation des peptides naissants aberrants par le complexe RQC et enfin la dégradation de ces peptides par le protéasome.

Néanmoins, de nombreuses questions demeurent encore aujourd'hui sans réponse : par exemple, une des problématiques de premier plan concerne les substrats naturels du NSD et du NGD. En effet, l'étude de ces mécanismes ayant systématiquement fait intervenir des rapporteurs aberrants, peu de données sont disponibles concernant les cibles naturelles de ces processsus de contrôle qualité des ARN et des peptides aberrants. Est-il possible que certains ARN messagers soient des substrats préférentiels pour les mécanismes de contrôle qualité des ARN? On peut supposer que des mutations affectant les codons STOP (provenant d'erreurs lors de la transcription notamment) puissent générer des transcrits "Non-Stop", cependant la grande quantité de codons STOP en phase présents dans les 3'UTR des gènes suggère que de telles mutations n'augmenteraient pas la quantité de substrats du NSD de manière significative. Plusieurs études ont tenté d'identifier des cibles préférentielles du NGD et du NSD, notamment par ribosome profiling couplé au séquençage massif des ARN de souches mutantes pour le complexe SKI et pour les facteurs Dom34 et Hbs1 en comparaison avec une souche sauvage, cependant les résultats n'ont pas révélé d'ARN messagers particulièrement stabilisés dans ces mutants de facteurs de contrôle qualité des ARN. En effet, les séquences connues pour provoquer un arrêt traductionnel, telles que les polyprolines, ne présentent pas d'accumulation de ribosomes en absence de Dom34, néanmoins un enrichissement de ribosomes a été observé au niveau des 3'UTR dans le mutant

*dom34*Δ, suggérant un rôle pour Dom34 dans le recyclage de ribosomes bloqués sur des régions d'ARN non codantes (Guydosh and Green, 2014).

L'absence de cibles préférentielles du NSD-NGD au niveau des séquences codantes suggère la possibilité que ces systèmes de contrôle qualité éliminent des ARN messagers aberrants apparaissant de manière stochastique dans la cellule, à la suite de défauts de maturation pouvant atteindre n'importe quel type de transcrit, sans qu'il n'existe de spécificité liée au gène à partir duquel ils sont synthétisés. Un exemple de défaut de maturation pouvant aboutir à l'accumulation de transcrits aberrants "non-stop" est l'étape de clivage du transcrit précédent sa polyadénylation, pour laquelle il a été montré que des sites cryptiques de clivage localisés en amont du codon STOP pouvaient générer des transcrits tronqués et polyadénylés qui seront exportés vers le cytoplasme et traduits, et par conséquent devenir des substrats du Non-Stop mRNA Decay (Ozsolak et al., 2010). De plus, certains ARN messagers peuvent également subir des dégradations partielles et ainsi générer des transcrits aberrants non-stop non-poly(A), ou encore être la cible de modifications chimiques de l'ARN (notamment en cas de stress oxydatif) pouvant provoquer un blocage des ribosomes lors de leur traduction et ainsi devenir des substrats du NGD. Or, l'ensemble de ces évènements affectant l'intégrité des ARNm (clivage avant polyadénylation, dégradation partielle ou modification chimique) ayant lieu de manière aléatoire, et non de manière préférentielle sur un type de transcrit, cela pourrait expliquer l'absence d'enrichissement d'ARNm spécifiques dans des mutants du complexe SKI ou de Dom34-Hbs1, et ainsi favoriser l'hypothèse de la stochasticité des substrats naturels du NSD et du NGD.

Une autre question intéressante concerne la distinction entre ARN messagers fonctionnels et ARNm aberrants, pour laquelle l'arrêt traductionnel semble constituer une étape déterminante. En effet, ce blocage du ribosome, qui nécessite les activités de Asc1 et de Hel2, est essentiel pour la détection des transcrits aberrants "no-go" et pour le déclenchement du NGD. Pourtant, il existe de nombreux exemples de pause ou de ralentissement lors de l'élongation de la traduction, permettant soit la relocalisation du peptide en cours de synthèse vers une organelle spécifique telle que le réticulum endoplasmique grâce au complexe SRP (Pechmann et al., 2014), soit le repliement d'un domaine spécifique grâce à la traduction d'une séquence peptidique ralentissant l'avancée du ribosome codée en aval de ce domaine (Kramer

et al., 2009). Quels paramètres différencient un ralentissement programmé d'un ralentissement causé par un évènement aberrant de traduction? La protéine Asc1/RACK1, liée aux sous-unités 40S notamment lors de l'élongation de la traduction, constitue le premier signal de détection des ribosomes bloqués permettant la mise en place du NGD (Kuroha et al., 2010). Il est donc possible que Asc1/RACK1 se lie aux 40S en cours de traduction afin de vérifier l'avancée des ribosomes, et pourrait ainsi détecter les ralentissements non programmés de manière à déclencher le recrutement de Hel2, ce qui va permettre le blocage de ces ribosomes ainsi que la reconnaissance et l'élimination du transcrit aberrant no-go. Une étude visant à déterminer quelle activité de Asc1 conduit au blocage du ribosome permettrait de mieux comprendre les causes de cet arrêt traductionnel et les différences mécanistiques entre arrêt de traduction programmé et évènement aberrant de traduction. On peut aussi supposer qu'il existe une compétition cinétique au niveau du recrutement dans le site A de la 60S entre l'ARNt correspondant et les facteurs Dom34-Hbs1, qui pourrait expliquer le déclenchement du NGD dans le cas d'un ralentissement provoqué par la présence d'une séquence de codons rares (Tsuboi et al., 2012). En effet, si le site A reste inoccupé pendant une durée trop longue car la concentration cellulaire de l'ARNt correspondant est faible, cela pourrait favoriser sa reconnaissance par Dom34-Hbs1 et ainsi initier le processus de No-Go mRNA Decay.

2 - Clivage endonucléolytique et dégradation des ARNm aberrants

Parallèlement à ces problématiques concernant les substrats naturels du NSD-NGD et les éléments déterminants pour l'arrêt traductionnel, certaines étapes de ce système de contrôle qualité restent encore indéterminées : notamment, alors qu'il a été montré que le transcrit aberrant subit un clivage endonucléolytique qui permet la dégradation des fragments d'ARNm clivés respectivement par Xrn1 et l'exosome, l'enzyme responsable de ce clivage demeure inconnue à ce jour. Plusieurs candidats ont été testés, notamment Rrp44/Dis3, facteur de l'exosome cytoplasmique possédant une activité endonucléolytique, mais les résultats montrent que le clivage endonucléolytique du transcrit a toujours lieu en absence de l'activité endonucléase de Rrp44/Dis3 (Schaeffer and Van Hoof, 2011).

La position de ce clivage endonucléolytique par rapport au ribosome bloqué sur l'ARN messager fait également l'objet de théories divergentes. Des expériences d'extension d'amorce sur des fragments 3' de clivage endonucléolytique de plusieurs substrats du NGD (transcrits portant des séquences K_{12}, codons rares et tige-boucle) ont suggéré que le clivage endonucléolytique aurait lieu en amont du ribosome bloqué (Tsuboi et al., 2012). Cette étude a ainsi proposé le modèle suivant : l'arrêt traductionnel sur un transcrit no-go ou non-stop poly(A)$^+$ induit un clivage endonucléolytique stimulé par Dom34 en amont du ribosome bloqué, transformant le fragment d'ARNm en amont en substrat aberrant non-stop non-poly(A). La traduction de ce fragment 5' par un autre ribosome, situé en amont du premier ribosome, provoque à nouveau un arrêt traductionnel, mais cette fois sur l'extrémité 3'OH du transcrit tronqué et donc en absence de codon dans le site A du ribosome, ce qui permet le recrutement du complexe SKI et de l'exosome cytoplasmique pour dégrader le transcrit du 3' vers le 5'. En parallèle, le fragment aval du clivage endonucléolytique serait reconnu et dégradé par Xrn1. Cependant, plusieurs éléments vont à l'encontre de ce modèle. Tout d'abord, bien que les expériences d'extensions d'amorce révèlent des clivages endonucléotiques en amont de la séquence bloquante pour certains substrats du NGD, on observe également des sites de clivage en aval, notamment pour la séquence K_{12}, par conséquent le lieu de clivage endonucléolytique semble dépendre du rapporteur aberrant utilisé (Tsuboi et al., 2012). Ensuite, ce modèle n'explique pas comment le premier ribosome bloqué, qui serait donc situé à l'extrémité 5' du fragment aval d'ARNm issu du clivage endonucléolytique, est dissocié pour permettre à Xrn1 de procéder à la dégradation du 5' vers le 3' de ce fragment. On pourrait imaginer que Dom34 est recruté à la fois sur le ribosome arrêté sur la séquence bloquante et sur le ribosome bloqué sur l'extrémité 3'OH du fragment amont d'ARNm, or leurs résultats montrent que l'absence de Dom34 ne stabilise que le fragment amont du clivage, et non le fragment aval, ce qui exclut cette possibilité. Enfin, ce modèle suppose que la dégradation de la partie en amont d'un ARNm aberrant non-stop se déroule de manière identique que ce transcrit porte une queue poly(A) ou non, puisque le clivage endonucléolytique convertit le transcrit non-stop polyadénylé en transcrit non-stop non-poly(A). Or, il a été montré que Ski7 était essentiel pour la dégradation des transcrits non-stop polyadénylés par l'exosome, alors que seule la partie N-terminale de Ski7 est nécessaire à la dégradation des transcrits non-stop sans queue poly(A)

(Meaux and Hoof, 2006). Par conséquent, il existe effectivement une différence mécanistique menant au recrutement de l'exosome, et donc à la dégradation du 3' vers le 5', entre ces deux types de transcrits aberrants.

Un autre modèle peut être envisagé (voir **Figure 38**), en accord avec les résultats décrits ci-dessus : le clivage d'un transcrit aberrant no-go ou non-stop poly(A)$^+$ aurait lieu en aval du ribosome bloqué, donnant naissance aux fragments d'ARNm 3' visibles en aval de la séquence bloquante K_{12} (Tsuboi et al., 2012), et les sites de clivage endonucléolytique visibles en amont de cette séquence pourraient provenir d'un autre clivage ayant lieu en aval d'un ribosome situé en amont, ce qui expliquerait les espacements de 30 nucléotides entre ces sites correspondant aux parties protégées par chaque ribosome (Ingolia et al., 2009). Le fragment aval de ce clivage, étant dénué de ribosomes, est rapidement dégradé par Xrn1 (Doma and Parker, 2006). En parallèle, le ribosome bloqué, toujours associé au fragment amont du clivage endonucléolytique, est reconnu par Dom34-Hbs1 (puis Rli1) et par le complexe SKI, ce qui correspond aux intermédiaires de dégradation du TAP-NonStop caractérisés dans les **Figures 24** et **37** de cette thèse. La dissociation du ribosome bloqué, puis le recrutement de Ski7 et de l'exosome cytoplasmique, permet alors la dégradation de ce fragment amont du transcrit aberrant. La différence de nécessité du domaine C-terminal de Ski7 pourrait provenir de la présence ou de l'absence d'un codon dans le site A ainsi que d'un fragment résiduel de queue poly(A). Il est possible que le domaine C-terminal de Ski7, similaire au domaine GTP-binding de EF1α (Benard et al., 1999), interagisse avec un composant permettant de raccourcir ce fragment résiduel de queue poly(A) (comme proposé dans Araki et al., 2001, voir **Figure 38**), alors que dans le cas d'un transcrit sans poly(A), l'extrémité 3'OH est située entre les sites P et A de la 60S et est donc accessible pour le complexe SKI, positionné en aval du ribosome bloqué. La publication de la structure du complexe SKI associé aux 80S bloqués, ainsi que la résolution de la structure de Ski7 en association avec le complexe SKI et l'exosome, et enfin la détermination de l'endonucléase impliquée dans ce mécanisme, devraient permettre de mieux comprendre l'organisation de ces évènements de dégradation des transcrits aberrants.

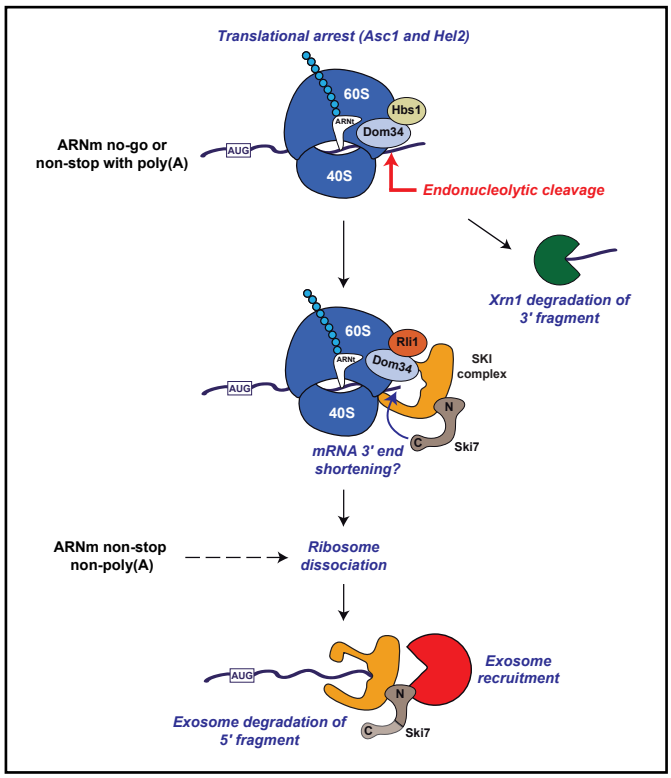


Figure 38. Modèle du mécanisme de dégradation des ARNm Non-Stop et No-Go

3 - Hydrolyse du peptidyl-ARNt et extraction du peptide de la 60S

Une autre problématique majeure restant à ce jour sans réponse concerne l'hydrolyse de la liaison peptidyl-ARNt situé dans le site P de la 60S bloquée, conduisant à l'extraction du peptide naissant aberrant du tunnel de sortie pour qu'il soit dégradé par le protéasome. En effet, Dom34 ne possédant pas de motif GGQ (contrairement à eRF1), la dissociation des ribosomes bloqués par Dom34, Hbs1 et Rli1 ne permet pas l'hydrolyse du peptidyl-ARNt permettant la libération du peptide naissant aberrant (Graille et al., 2008). Plusieurs peptidyl-ARNt hydrolases (PTH) ont été testées, notamment les PTH mitochondriales Pth1 et Pth2, mais la forme hydrolysée du peptide rapporteur aberrant était encore visible pour l'ensemble des mutants de PTH testés (Tsuboi et al., 2012). Par ailleurs, des études ont montré que la forme peptidyl-ARNt des protéines aberrantes "Non-Stop" est toujours visible dans la fraction 60S d'un gradient de polysomes (Tsuboi et al., 2012; Defenouillère et al., 2013; Verma et al., 2013), suggérant que cette hydrolyse a lieu après dissociation du ribosome bloqué, contrairement à la terminaison canonique de la traduction. De plus, lors du recrutement du complexe RQC sur la 60S, le peptide naissant est toujours lié covalemment à un ARNt dans le site P : c'est ce qui va permettre la reprise de

l'élongation de la traduction par le recrutement d'ARNt alanine et thréonine dans le site A par Rqc2 et ainsi l'addition de CAT tails en C-terminal du peptide aberrant. Etant donné que le complexe RQC est toujours lié au peptide aberrant après son extraction de la 60S (Defenouillère *et al.*, 2015, soumis pour publication), on peut supposer que le complexe RQC est effectivement présent au moment de la disruption de la liaison covalente entre l'ARNt dans le site P et le peptide naissant.

Est-il possible que le complexe RQC soit impliqué dans cette hydrolyse du peptidyl-ARNt? La reprise de l'activité du centre peptidyl-transférase de la 60S lors de l'ajout de CAT tails par Rqc2, couplée à l'activité ATPase de l'hexamère de Cdc48, serait-elle suffisante pour rompre cette liaison covalente? Lors du transfert du polypeptide de l'ARNt présent dans le site P vers l'aminoacyl-ARNt recruté dans le site A, il existe un court moment durant lequel ce polypeptide n'est lié à aucun des deux ARNt. Si à ce moment précis, l'hexamère de Cdc48 est déjà positionné (grâce à la chaine de polyubiquitine et à Rqc1) et convertit de l'ATP en énergie mécanique, il est possible que cette coordination entre les activités respectives des facteurs du RQC suffise à extraire le peptide naissant même en absence d'une peptidyl-ARN hydrolase (voir **Figure 39**). Par ailleurs, alors que la présence d'une polylysine en C-terminal du peptide naissant pourrait inhiber son extraction mécanique à cause d'interactions électrostatiques avec l'ARNr du tunnel de sortie (Lu and Deutsch, 2008), l'apposition d'acides aminés neutres tels que les alanines et les thréonines composant les CAT tails permettrait de faciliter cette extraction par l'hexamère de Cdc48. L'ajout de CAT tails ne servirait donc pas seulement à déclencher la réponse Hsf1 au stress traductionnel (Shen et al., 2015), mais aussi à favoriser l'extraction des peptides aberrants de la 60S bloquée pour qu'ils soient rapidement dégradés.

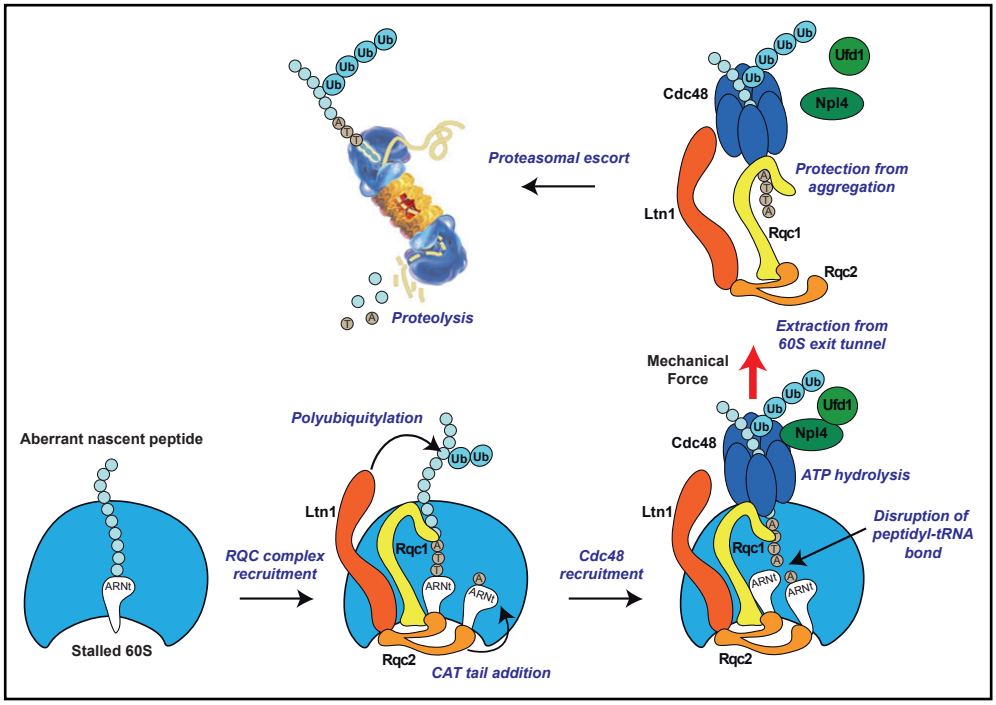


Figure 39. Modèle d'extraction du peptide naissant par le complexe RQC

Enfin, la position de l'hexamère de Cdc48 sur la particule 60S reste encore indéterminée. En effet, s'il est possible que cet hexamère soit recruté à proximité du tunnel de sortie du peptide naissant, il pourrait également être recruté au niveau de l'interface avec la 40S, à proximité de Rqc2 et du domaine N-terminal de Rqc1, permettant alors une extraction du peptide naissant par le "dessous" de la 60S. Cependant, étant donné que Cdc48 nécessite une chaine de polyubiquitine pour interagir avec le substrat, et que la polyubiquitinylation par Ltn1 a lieu du côté opposé, à proximité de l'embouchure du tunnel de sortie, il est peu probable que Cdc48 soit recruté au niveau de Rqc2 mais plutôt à proximité du domaine RING de Ltn1 (Shao et al., 2015). De plus, le tunnel de sortie de la 60S étant trop étroit pour permettre le passage d'une structure plus large qu'une hélice α, il est théoriquement impossible qu'un peptide naissant lié à une chaîne de polyubiquitine puisse traverser le tunnel de sortie et être extrait du côté de l'interface avec la 40S.

4 - Rôle de Rqc1 dans la prévention de l'agrégation protéique

Alors que nous connaissons à présent le rôle de chacun des facteurs Ltn1, Rqc2 et Cdc48, ainsi que la structure de Rqc2 et Ltn1 sur les particules 60S

bloquées, la fonction et la structure de Rqc1 restent encore indéterminées. Notre étude du rôle de Rqc1 a cependant révélé que ce facteur est essentiel au recrutement de Cdc48 et qu'il prévient l'agrégation des protéines aberrantes (voir **Figure 39**), un phénomène résultant de l'ajout de CAT tails par Rqc2. Par ailleurs, nos données de crosslink protéine-protéine suggèrent que le domaine N-terminal de Rqc1 est positionné à proximité de la région de la 60S où se trouve Rqc2, au niveau de l'ARNt situé dans le site P. Cette position de son extrémité N-terminale pourrait permettre à Rqc1 d'interagir avec Rqc2 au moment de l'ajout des CAT tails et d'ainsi empêcher ces extensions C-terminales de provoquer l'agrégation des protéines aberrantes. Par ailleurs, l'importance de Rqc1 pour le recrutement de l'hexamère de Cdc48 laisse imaginer qu'une partie de Rqc1 pourrait être positionnée à proximité du tunnel de sortie du peptide naissant, lieu où l'on suppose que Cdc48 est recruté (voir partie précédente) afin de permettre son recrutement. Enfin, alors que la fusion Rqc1-TAP est fonctionnelle pour la liaison à la 60S bloquée et le recrutement de Cdc48 (Defenouillère et al., 2013), elle n'est pas fonctionnelle pour la prévention de l'agrégation causée par l'ajout de CAT tails (Defenouillère *et al.*, 2015, soumis pour publication), ce qui suggère que le domaine C-terminal de Rqc1 pourrait avoir un rôle important dans la protection des CAT tails contre l'agrégation. Il est donc possible qu'au moment de l'extraction du peptide naissant de la 60S, Rqc1 interagisse avec l'extrémité C-terminale de ce peptide (constituée d'alanines et de thréonines) afin de prévenir leur agrégation pendant l'escorte au protéasome.

Parallèlement, étant donné que les CAT tails sont essentielles pour la mise en place de la réponse Hsf1 (Shen et al., 2015), il est possible que l'apparition d'agrégats de protéines portant des CAT tails soit à l'origine du déclenchement de cette réponse Hsf1 au stress traductionnel. Par conséquent, Rqc1, en prévenant l'agrégation des protéines portant des CAT tails, pourrait agir comme un inhibiteur de la réponse Hsf1 lorsque la quantité de protéines aberrantes est faible. Il a notamment été montré que la réponse Hsf1 était naturellement induite chez le mutant *rqc1*Δ (Brandman et al., 2012), ce qui supporte la théorie que Rqc1 est un inhibiteur de la réponse Hsf1 qui pourrait agir par inhibition du signal de stress porté par les CAT tails. Cependant, Rqc1 étant autorégulé par sa propre séquence polybasique et ainsi maintenu à un niveau cellulaire faible (Ghaemmaghami et al., 2003), il est possible que lorsque la quantité de protéines aberrantes devient trop importante, Rqc1 soit

rapidement titré, ce qui permettrait de déclencher la réponse Hsf1 au stress traductionnel et donc l'expression de facteurs spéficiques tels que des chaperonnes afin de limiter l'accumulation cellulaire d'agrégats protéiques. La résolution de la structure de Rqc1 sur la particule 60S bloquée pourrait donner des informations importantes concernant son mécanisme d'interaction avec les autres facteurs du complexe RQC ainsi qu'avec les protéines aberrantes. De plus, une étude appronfondie des mécanismes d'agrégation protéique en absence de Rqc1 et en présence du mutant $Rqc2_{aaa}$ (fonctionnel pour le contrôle qualité des protéines mais pas pour l'addition de CAT tails) permettrait de déterminer le rôle des CAT tails dans ce processus d'agrégation, et la relation avec la mise en place de la réponse Hsf1.

5 - Mécanisme d'action des facteurs de contrôle qualité identifiés

Au-delà du mécanisme d'action du complexe RQC dans le contrôle qualité des peptides aberrants, nous avons également découvert plusieurs facteurs de contrôle qualité, notamment Tom1 et Dsk2, capables de participer à la dégradation de ces protéines lorsque certains composants du complexe RQC sont déficients (Defenouillère *et al.*, 2015, soumis pour publication). Alors que le fonctionnement de Dsk2 pour l'adressage des protéines polyubiquitinylées au protéasome a précédemment été décrit, que ce soit au niveau de substrats solubles (Funakoshi et al., 2002) ou au niveau de l'agrésome (Wang et al., 2009), le mécanisme moléculaire permettant à Tom1 d'interagir avec le complexe RQC libre pour limiter l'accumulation et l'agrégation des protéines aberrantes reste indéterminé. Est-il possible que Tom1 agisse de manière similaire à Dsk2 par reconnaissance des chaines de polyubiquitine et par interaction directe avec le protéasome? En effet, nos données sur l'importance du domaine RING de Ltn1 pour le recrutement de Tom1 sur le complexe RQC et les études de son orthologue mammifère Huwe1 montrant que cette E3 ubiquitine ligase contient un domaine UBA (Ubiquitin-associated) (Chen et al., 2005) et qu'elle est enrichie lors de purifications du protéasome (Besche et al., 2009) supportent l'hypothèse que Tom1/Huwe1 pourrait agir comme un adaptateur entre des subtrats polyubiquitinylés et le protéasome (voir **Figure 40**). Bien que la conservation des séquences peptidiques entre Tom1 et son orthologue Huwe1 soit relativement faible au niveau de la région correspondant au domaine UBA, il existe

une forte divergence de séquences dans l'ensemble des domaines UBA eucaryotes (Ohno et al., 2005) ; il est donc possible que le domaine UBA de Tom1 soit effectivement fonctionnel. De plus, il a été montré que les domaines UBA possèdent un motif M-G-F/Y particulièrement conservé, et que la Méthionine présente dans ce motif est le seul amino-acide essentiel à l'interaction avec les polyubiquitines (Swanson et al., 2006). Etant donné que cette Méthionine est conservée dans la séquence peptidique de Tom1 (en position 1176), il est possible que Tom1 puisse interagir avec des protéines polyubiquitinylées *via* ce potentiel domaine UBA (**Figure 40**). La caractérisation biochimique d'un mutant *tom1-M1176A* pourrait déterminer la capacité de ce mutant à interagir avec le complexe RQC libre, et s'il cause une augmentation de l'agrégation protéique en abense de Rqc1, comme le mutant *rqc1*Δ*tom1*Δ. En parallèle, une inhibition du protéasome ou l'utilisation d'un mutant du protéasome déficient pour la dégradation des substrats pourrait permettre de stabiliser une étape où Tom1 serait lié au protéasome, comme observé pour son orthologue Huwe1.

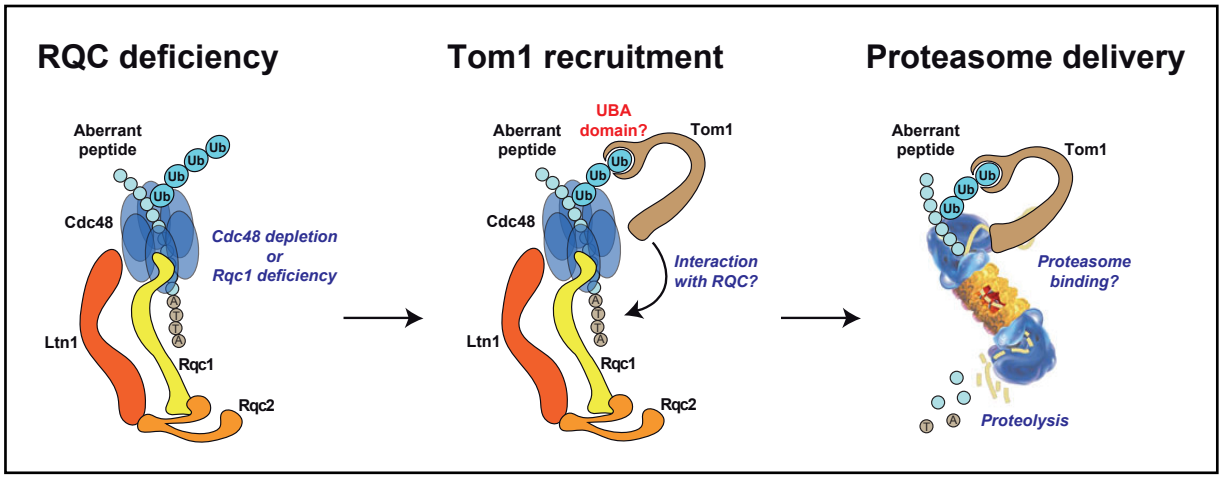


Figure 40. Modèle d'adressage au protéasome des peptides aberrants dépendant de Tom1 lorsque Rqc1 ou Cdc48 sont déficients

Par ailleurs, il est intéressant de constater que plusieurs chaperonnes (Ssa1/2 et Hsp82) et co-chaperonnes (Sis1 et Sgt2) sont recrutées sur les agrégats de protéines aberrantes en absence de Rqc1. Certaines d'entre elles pourraient avoir un rôle important pour le repliement des protéines dénaturées, notamment au niveau de l'agrésome (Wang et al., 2009), cependant dans le cas d'une accumulation de protéines aberrantes "non-stop" ou "no-go", qui sont généralement tronquées ou allongées de par la traduction du 3'UTR et donc souvent non fonctionnelles, on peut

se poser la question de la pertinence d'une activité de repliement de ce type de protéines défectueuses. Une autre possibilité est que ces chaperonnes soient recrutées soit pour limiter l'expansion des agrégats protéiques, soit pour faciliter le recrutement du protéasome, soit comme il a été montré dans le cas de Sis1, pour permettre l'import vers le noyau de protéines défectueuses pour qu'elles soient dégradées par le protéasome nucléaire (Park et al., 2013). De manière à mieux comprendre le rôle de ces chaperonnes et co-chaperonnes dans la prévention de l'agrégation protéique ou dans l'élimination des protéines aberrantes, nous sommes actuellement en train de tester l'effet d'une déplétion de certains de ces facteurs sur l'accumulation et l'agrégation de rapporteurs aberrants "non-stop". Enfin, il serait intéressant de déterminer si ces chaperonnes pourraient avoir un rôle dans la mise en place de la réponse Hsf1, d'autant plus que cette réponse au stress est connue pour activer l'expression de certains facteurs dont Hsp82. Etant donné que la réponse Hsf1 est active en absence de Rqc1 (Brandman et al., 2012), et que les agrégats s'accumulant en son absence sont reconnus par ces chaperonnes (Defenouillère *et al.*, 2015, soumis pour publication), on pourrait en effet imaginer un lien fonctionnel entre la présence d'agrégats, le recrutement de chaperonnes et la réponse Hsf1 au stress traductionnel.

CONCLUSIONS

Mes travaux de thèse ont permis de découvrir un nouveau complexe de contrôle qualité de la traduction, le complexe RQC, associé aux sous-unités 60S bloquées et composé des protéines Rqc1, Rqc2, Ltn1 et Cdc48. Ce complexe est impliqué dans la polyubiquitinylation et l'escorte des peptides naissants aberrants jusqu'au protéasome pour qu'ils soient dégradés, et devient particulièrement essentiel en cas de stress traductionnel pour éliminer les protéines défectueuses ainsi que pour déclencher la réponse Hsf1 au stress.

Notre étude fonctionnelle du facteur Rqc1 a permis de révéler son rôle dans le recrutement de Cdc48 sur les 60S bloquées et dans la prévention de l'agrégation des protéines aberrantes, phénomène induit par l'addition de CAT tails aux peptides naissants par Rqc2. Etant donné l'importance des CAT tails pour la mise en place de la réponse Hsf1, ces résultats suggèrent que Rqc1 pourrait être un inhibiteur de la réponse Hsf1 qui permettrait son déclenchement spécifiquement en cas de stress traductionnel. J'ai également identifié plusieurs autres facteurs de contrôle qualité, dont Tom1, Dsk2 et des chaperonnes, qui participent à la prévention de l'agrégation protéique et donc au maintien de l'homéostasie des protéines, notamment lorsque Rqc1 est déficient.

En parallèle, une étude structurale grâce à des techniques de cryo-microscopie électronique et de crosslinks nous a permis de mieux comprendre la position de certains facteurs du complexe RQC sur la particule 60S, notamment les positions de Rqc2 et du N-ter de Rqc1 au niveau de l'interface avec la 40S.

L'ensemble de ce travail a contribué à la caractérisation des mécanismes de contrôle qualité des produits de l'expression génétique chez les eucaryotes, qui assurent le maintien de l'homéostasie du transcriptome et du protéome. Parallèlement, l'étude des processus cellulaires conduisant à la formation d'agrégats protéiques cellulaires pourrait permettre de mieux comprendre l'apparition de certaines maladies neurodégénératives.

MATÉRIELS

ET

MÉTHODES

MATERIELS ET METHODES

Construction des souches de levure et tests en goutte

Les souches de levure utilisées dans cette étude ont été construites par transformation de produits de PCR à haute efficacité à partir des fonds génétiques BY4741 et BY4742 (Brachmann et al., 1998) et sont listées en **Annexe 2**. Les souches Rqc1-CRAC et Rqc2-CRAC ont été construites à partir des souches Rqc1-TAP et Rqc2-TAP respectivement, par transformation d'une séquence "CLAP" (CBP-6His-TEV-Protéine A) à la place de l'étiquette TAP en C-terminal. Pour les tests en goutte, des dilutions en série ($1/10^{ème}$) de cellules resuspendues dans de l'eau stérile à DO_{600}=0,5 ont été réalisées, puis 5µL de chaque dilution ont été déposées sur des boîtes contenant du milieu riche (YPD) gélosé avec et sans Hygromycine B (40 $\mu g.mL^{-1}$) et incubées pendant 48 heures à 30°C ou 72 heures à 37°C.

Construction des plasmides

Une liste des plasmides utilisés dans cette étude est présentée en **Annexe 3**. Les plasmides TAP-Stop et TAP-Non-Stop ont été construits à partir de pAV183 et pAV184 respectivement (Hoof et al., 2002), par recombinaison homologue chez la levure. Les plasmides pAV183 et pAV184 ont été linéarisés avec *Xba*I et *Bam*HI, et transformés dans la levure avec la séquence de l'étiquette TAP amplifiée par PCR à partir de pBS1761 (Puig et al., 2001) avec les oligos JM028 et JM029. Le plasmide GFP-NonStop a été construit par recombinaison à partir du plasmide TAP-NonStop linéarisé avec *Bgl*II et *Bam*HI et d'une séquence GFP amplifiée par PCR avec QD141 et QD142.

JM028 :

5'- GGAGAAAAAACCCCGGATCATAATCGGCCGCTCTAGAATGGCAGGCCTTGCGCAACACG -3'

JM029 :

5'- GATAAGAAAGCAACACCTGGCAATTCCTTACCGGATCCTAGGGCGAATTGGGTACCGGG -3'

QD141 :

5'-TCAAGGAGAAAAAACCCCGGATCAtAATCGGCCGCTCTAGAatgagtaaaggagaagaacttttcactgg -3'

QD142 :

5'-TTTTTTCGGATAAGAAAGCAACACCTGGCAATTCCTTACCGGATCCtttgtatagttcatccatgccatg -3'

Extraction des protéines et Western Blots

Les cellules de levure ont été cultivées à 30°C en milieu riche ou synthétique galactose-uracile jusqu'à DO_{600}=0,6, rincées dans de l'eau froide, puis 6 unités de DO_{600} ont été lysées au TCA 20% avec des billes de verre dans un MagNA Lyser (Roche) 3 fois 30 secondes à 4800rpm à 4°C. Après élimination des billes de verre, précipitation des protéines 10 minutes à 4°C puis centrifugation à 14000rpm pendant 15 minutes à 4°C, les surnageants ont été éliminés et les culots protéiques ont été resuspendus dans 100µL de tampon de dépôt (100mM Tris-HCl pH6.8, 20% glycerol, 0,02% bromophenol blue, 8% SDS, 100mM DTT). Ces échantillons ont été bouillis 5 minutes à 100°C, puis 5 à 12µL ont été déposés sur mini-gel d'acrylamide 10% (système Biorad Mini-PROTEAN) et migrés à 120V pendant environ 1 heure. Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose a été effectué avec un système de transfert semi-sec (Biorad, TransBlot SD) à 10V pendant 1 heure 30. La membrane a été colorée au Rouge Ponceau, rincé dans du PBS + Tween 1%, puis bloquée avec du lait écrémé à 4% dans du PBS + Tween 1% pendant 40 minutes. L'incubation avec un anticorps primaire a été effectuée pendant 3 heures à température ambiante ou sur la nuit à 4°C avec agitation (les anticorps utilisés dans cette étude avec leurs dilutions respectives sont listés en **Annexe 4**). Après trois lavages de 10 minutes au PBS + Tween 1%, les anticorps déjà couplés à la peroxidase ont été révélés par chemiluminescence (ECL Immobilon, Millipore), ou une incubation avec un anticorps secondaire (dilution 1/10000ème pour les anticorps secondaires anti-Souris et anti-Lapin) a été réalisée pendant 3 heures à température ambiante avec révélation. La membrane a été exposée à des films Amersham Hyperfilms ECL (GE Healthcare) pendant des durées d'exposition variables avant développement.

Purifications d'affinité

Les cellules exprimant des fusions TAP en C-terminal (Rigaut et al., 1999) ont été cultivées dans 2 litres de milieu riche (YPD) jusqu'à une DO_{600} égale à 1. Ces cultures ont été centrifugées à 4°C, les cellules ont été rincées dans de l'eau froide et congelées à sec à -80°C. Les culots de cellules ont été uniformisés en fonction de leur masse (environ 4 grammes), resuspendus dans 20mL de tampon de lyse (20mM HepesK pH7.4, 100mM KOAc, 10mM $MgCl_2$, inhibiteurs de protéases sans EDTA, Roche) et lysées avec une presse de French (deux fois à 1200 psi). Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 15000g pendant 20 minutes à 4°C. Aux surnageants ont été ajoutés 0,5% de Triton X100, 1/2500ème d'antimousse 204 (Sigma-Aldrich), et 50µL de billes magnétiques couplées à des IgG, et la liaison de la protéine de fusion aux anticorps a été effectuée à 4°C sur roue pendant 40 minutes (Oeffinger et al., 2007). Les billes ont été collectées sur un aimant pour éliminer le tampon de lyse, puis lavées 3 fois dans du tampon de lavage (20mM HepesK pH7.4, 100mM KOAc, 10mM $MgCl_2$, 1mM DTT) avec détergent (Triton X100 0,5%) et 3 fois dans du tampon de lyse sans détergent. L'élution a été réalisée dans 400µL de tampon de lavage sans détergent avec 10µL de protéase AcTEV (Life Technologies) pendant 1h45 à 17°C. Les billes ont été éliminées avec un aimant et les protéines éluées ont été précipitées au méthanol/chloforme (Wessel and Flügge, 1984). Un cinquième des protéines précipitées a été resuspendu dans du tampon de dépôt sur gel d'acrylamide (100mM Tris-HCl pH6.8, 20% glycerol, 0,02% bromophenol blue, 8% SDS, 100mM DTT), migré sur un gel NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris (Life Technologies) puis analysé par coloration au nitrate d'argent avec de l'éthanol (Yan et al., 2000). Le reste des échantillons a été analysé par spectrométrie de masse.

Purifications d'affinité couplées aux gradients de sucrose

Pour les purifications de Rqc1-TAP, les cellules cultivées dans 4 litres de milieu riche ont été déplétées de *CDC48* pendant 13 heures 30 avec 10µg.mL^{-1} de doxycyline et récoltées à DO_{600}=1. Ces cellules ont été lavées dans de l'eau froide puis congelées à -80°C et lysées avec une presse de French (deux fois à 1200psi) dans du tampon de lyse (50mM Tris HCl, 100mM NaCl, 5mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 1mM PMSF et inhibiteurs de protéases sans EDTA, Roche). Les lysats ont été clarifiés par centrifugation à 15000g pendant 20 minutes à 4°C et incubés pendant 45 minutes

avec 50µL de billes magnétiques couplées aux IgG, 1/2500ème d'antimousse 208 et 0,075% IGEPAL. Les billes ont été lavées deux fois dans du tampon de lyse avec 0,075% IGEPAL, et deux fois sans détergent. L'élution a été réalisée dans du tampon de lyse sans détergent avec 12µL de protéase AcTEV pendant 1 heures 45 à 17°C. Les éluats ont été chargés sur des gradients de sucrose 10-30% puis ultracentrifugés à 27000g pendant 15 heures à 4°C. Les fractions de gradient ont été collectées et les protéines ont été précipitées au méthanol/chloroforme. Un tiers de chaque fraction a été resuspendu dans du tampon de dépôt sur gel d'acrylamide pour une migration SDS-PAGE sur gel NuPAGE 4-12% et coloration au nitrate d'argent, et les deux autres tiers ont été analysés par spectrométrie de masse. Les mêmes conditions ont été utilisées pour les purifications sur gradient du TAP-Stop et du TAP-NonStop, sauf que les cellules ont été cultivées en milieu synthétique galactose - uracile, traitées avec 50µg.mL^{-1} de cycloheximide puis cassées aux billes de verre 4 fois 30 secondes à 3000rpm dans un MagNA Lyser (Roche), et l'ultracentrifugation a été effectuée à 39000g pendant 2 heures 45 à 4°C.

Extraction de polysomes et gradients de sucrose

120 unités de DO_{600} de cellules en culture en phase exponentielle (milieu riche ou galactose - uracile) ont été traitées avec 50µg.mL^{-1} de cycloheximide pendant 5 minutes et cassées avec des billes de verre avec un MagNA Lyser (Roche), trois fois pendant 60 secondes à 3000rpm dans du tampon de cassage (20mM Tris HCl pH7.4, 50mM KCl, 5mM $MgCl_2$, 50µg.mL^{-1} cycloheximide, 10mM *N*-ethylmaleimide et inhibiteurs de protéases sans EDTA de Roche). Pour l'inhibition du protéasome, des cellules délétées du gène *ERG6* ont été traitées pendant 2 heures avec 100µM MG132 avant la lyse aux billes de verre. Sept unités de DO_{260} des lysats cellulaires clarifiés ont été déposés sur des gradients de sucrose 10-50% (20mM Tris HCl pH7.4, 50mM NH_4Cl, 5mM $MgCl_2$, 1mM DTT, sucrose et inhibiteurs de protéases sans EDTA de Roche) et ultracentrifugées à 39000g pendant 2 heures 45 à 4°C. Les fractions de gradient collectées ont été précipitées au TCA 10%, resuspendues dans 40µL de tampon de dépôt, et 10µL ont été déposés sur gel d'acrylamide 10%. Les procédures de SDS-PAGE et de Western blot sont les mêmes que celles détaillées précédemment.

Gradients de sucrose préparatifs pour la caractérisation des agrégats

Les extraits de polysomes ont été préparés et déposés sur un gradient de sucrose 10-50% comme décrit ci-dessus. Les fractions contenant les agrégats ont été mélangées et précipitées au méthanol/chloroforme. Les culots de protéines ont été resuspendus dans du tampon de dépôt puis migrés en SDS-PAGE sur un gel d'acrylamide contenant un gel de concentration de 3mm d'épaisseur qui a été coupé après électrophorèse et traité pour l'analyse par LC-MS/MS (voir ci-dessous).

Spectrométrie de masse et analyse des données MS

Ces protocoles ont été réalisés par Abdelkader Namane. Pour la préparation des échantillons issus de gels de concentration, chaque piste a été excisée, coupée en petits cubes et digérée à la trypsine après réduction et alkylation comme décrit dans (Shevchenko et al., 2006). Tous les échantillons protéiques ont ensuite été traités avec les endoprotéases Lysine-C et trypsine (Promega), et les peptides obtenus ont été déssalés avec des cones OMIX C18 (Agilent Technologies) et analysés sur un instrument LTQ-Orbitrap velos (Thermo Fisher Scientific) connecté à un système de nano HPLC Ultimate 3000 (Dionex). Les données MS brutes en provenance du LTQ-Orbitrap ont été analysées avec le logiciel MaxQuant (Cox and Mann, 2008) version 1.3.0.5 qui utilise le moteur de recherche Andromeda (Cox et al., 2011). Seules les protéines identifiées avec un minimum de deux peptides ont été sélectionnées pour les analyses quantitatives. L'analyse des abondances relatives de ces protéines a été réalisée avec le module Perseus version 1.30.4 du package MaxQuant, puis les valeurs de LFQ (label-free quantification) du fichier de sortie "proteinGroups.txt" de MaxQuant ont été analysées plus en détail. 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 le test statistique t de Student et les résultats ont été présentés sous forme de Volcano plots (Hubner and Mann, 2011).

Extraction des ARN totaux et Northern Blots

Les ARN totaux on été extraits avec un protocole d'extraction au phénol chaud à partir de cellules de levure en phase de croissance exponentielle (DO_{600}=0,6). Deux microgrammes d'ARN totaux ont été séparés sur gel d'agarose 1%, puis transférés sur une membrane Hybond N^+ et sondés avec des oligonucléotides marqués en 5' au ^{32}P et spécifiques à l'ARNm de la protéine A ou de l'ARN Scr1. Après exposition sur écran, les membranes ont été analysées avec un Phospho-Imager.
Sonde pour rapporteur protéine A : 5'- TCTACTTTCGGCGCCTGAGCATCATTT -3'
Sonde pour Scr1 : 5'- GTCTAGCCGCGAGGAAGG -3'

Expériences de taux de dégradation des ARNm

Les cellules de levure ont été transformées avec le plasmide pAV184 portant le gène rapporteur Protéine A Non-Stop, puis cultivées à 30°C en milieu liquide synthétique en présence de galactose 2% et sans Uracile. Afin d'éteindre l'expression du gène rapporteur qui est sous le contrôle d'un promoteur *GAL1*, les cellules ont été transférées dans du milieu contenant du glucose à t=0. Des aliquots de ces cultures ont été prélevés à chaque temps indiqué en minutes. Les extraits d'ARN totaux ont été extraits et analysés par Northern blot comme détaillé ci-dessus.

Cribles GIM (Genetic Interaction Mapping)

Les cribles génétiques GIM ont été réalisés comme précédemment (Decourty *et al.*, 2008) avec deux exceptions : les 979 souches DAmP barre-codées ont été ajoutées à la collection de mutants de délétion et un nouveau système pour les cultures des ensembles de souches haploïdes doubles mutantes finaux a été utilisés. Les cultures ont été faites à turbidité constante à 30°C grâce à un système de turbidostats. Ce mécanisme utilise une injection d'air stérile dans des fioles de 10mL pour assurer l'homogénéité des cultures et permet des vitesses de croissance similaires à celles obtenues pour des cultures liquides en erlenmeyers. La population de référence provient soit d'un crible réalisé en parallèle avec un mutant de délétion du gène *YEL068C*, ou bien consiste d'un mélange d'au moins 10 populations doubles

mutantes obtenues avec d'autres mutants de délétion d'intérêt. L'analyse des données de puces à ADN à été faite avec R pour réaliser une normalisation de type Lowess avec marray (Analyse exploratoire pour les données de microarray à deux couleurs, package R version 1.34.0, par Yee Hwa Yang, Agnès Paquet et Sandrine Dudoit, 2009), indépendamment des sets de ratios mesurés pour les code-barres en 5' ou en 3' de la cassette KANMX. Les résultats ont été corrigés des biais systématiques par pondération de chaque valeur de ratio. Une description détaillée de la méthode de pondération est disponible dans l'article Defenouillère *et al.*, 2013. Pour les cribles GIM réalisés à 37°C (voir **Annexe 1**), les haploïdes doubles mutants ont été cultivés en erlenmeyers (et non en turbidostats) en absence d'antibiotiques à 37°C pendant environ 14 générations.

Microscopie de fluorescence

Les expériences de microscopie de fluorescence ont été effectuées sur des cellules transformées avec le plasmide GFP-NonStop et cultivées sur boîtes avec du milieu synthétique galactose - uracile puis resuspendues dans de l'eau stérile. L'ADN a été coloré avec du Hoechst 33352 (5 $\mu g.mL^{-1}$) pendant 5 minutes, puis les cellules ont été lavées 2 fois et resuspendues dans de l'eau stérile. 5µL de ces resuspensions 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 (GFP, Leica) pendant 2000 millisecondes et du Hoechst 33352 (A, Leica) pour 30 millisecondes. Les images ont été acquises avec une caméra CCD refroidie ORCAII-ER contrôlée par le logiciel Openlab (version 3.5, Improvision) et traitées avec lo logiciel Adobe Photoshop CS3 (verison 10, Adobe).

BIBLIOGRAPHIE

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.

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, C.B.F., Becker, T., Blau, M., Anand, M., Halic, M., Balar, B., Mielke, T., Boesen, T., Pedersen, J.S., Spahn, C.M.T., et al. (2006). Structure of eEF3 and the mechanism of transfer RNA release from the E-site. Nature *443*, 663–668.

Anderson, J.S.J., and Parker, R. (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. The EMBO Journal *17*, 1497–1506.

Anger, A.M., Armache, J.-P., Berninghausen, O., Habeck, M., Subklewe, M., Wilson, D.N., and Beckmann, R. (2013). Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. Nature *497*, 80–85.

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. The EMBO Journal *20*, 4684–4693.

Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W., and Langer, T. (1996). The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. Cell *85*, 875–885.

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 Evolutionary Biology *8*, 290.

Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. Science *234*, 179–186.

Bartel, B., Wünning, I., and Varshavsky, A. (1990). The recognition component of the N-end rule pathway. EMBO J. *9*, 3179–3189.

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.

Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A., and Hampton, R.Y. (2001). Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. Nat. Cell Biol. *3*, 24–29.

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.

Ben-Aroya, S., Coombes, C., Kwok, T., O'Donnell, K.A., Boeke, J.D., and Hieter, P. (2008). Toward a comprehensive temperature-sensitive mutant repository of the essential genes of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell *30*, 248–258.

Ben-Shem, A., Jenner, L., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2010). Crystal structure of the eukaryotic ribosome. Science *330*, 1203–1209.

Benard, L., Carroll, K., Valle, R.C., Masison, D.C., and Wickner, R.B. (1999). The ski7 antiviral protein is an EF1-alpha 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.

Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. PLoS Biol. *4*, e423.

Besche, H.C., Haas, W., Gygi, S.P., and Goldberg, A.L. (2009). Isolation of mammalian 26S proteasomes and p97/VCP complexes using the ubiquitin-like domain from HHR23B reveals novel proteasome-associated proteins. Biochemistry *48*, 2538–2549.

Biederer, T., Volkwein, C., and Sommer, T. (1997). Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. Science *278*, 1806–1809.

Biggins, S., Ivanovska, I., and Rose, M.D. (1996). Yeast ubiquitin-like genes are involved in duplication of the microtubule organizing center. J. Cell Biol. *133*, 1331–1346.

Blanchet, S., Cornu, D., Argentini, M., and Namy, O. (2014). New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. *42*, 10061–10072.

Bota, D.A., and Davies, K.J.A. (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. Nat. Cell Biol. *4*, 674–680.

Bousquet-Antonelli, C., Presutti, C., and Tollervey, D. (2000). Identification of a regulated pathway for nuclear pre-mRNA turnover. Cell *102*, 765–775.

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 *14*, 115–132.

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.

Brengues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of Eukaryotic mRNAs Between Polysomes and Cytoplasmic Processing Bodies. Science *310*, 486–489.

Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R.Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M.C., Hendil, K.B., Tanaka, K., Dyson, J., and Rivett, J. (2000). Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. Biochem. J. *346 Pt 1*, 155–161.

Brown, A.J.P. (1989). Messenger RNA stability in yeast. Yeast *5*, 239–257.

Brown, C.E., Tarun, S.Z., Boeck, R., and Sachs, A.B. (1996). PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. *16*, 5744–5753.

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 *6*, 449–457.

Butler, J.S., and Mitchell, P. (2010). Rrp6, Rrp47 and cofactors of the nuclear exosome. Adv. Exp. Med. Biol. *702*, 91–104.

Carvalho, P., Goder, V., and Rapoport, T.A. (2006). Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. Cell *126*, 361–373.

Celik, A., Kervestin, S., and Jacobson, A. NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. Biochimie.

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. Molecular 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.

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, D., Kon, N., Li, M., Zhang, W., Qin, J., and Gu, W. (2005). ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. Cell *121*, 1071–1083.

Chen, J.Z., and Grigorieff, N. (2007). SIGNATURE: a single-particle selection system for molecular electron microscopy. J. Struct. Biol. *157*, 168–173.

Chen, L., Romero, L., Chuang, S.-M., Tournier, V., Joshi, K.K., Lee, J.A., Kovvali, G., and Madura, K. (2011). Sts1 Plays a Key Role in Targeting Proteasomes to the Nucleus. J. Biol. Chem. *286*, 3104–3118.

Chen, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S., and Hochstrasser, M. (1993). Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. Cell *74*, 357–369.

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.

Cho, H., Han, S., Choe, J., Park, S.G., Choi, S.S., and Kim, Y.K. (2013). SMG5–PNRC2 is functionally dominant compared with SMG5–SMG7 in mammalian nonsense-mediated mRNA decay. Nucl. Acids Res. *41*, 1319–1328.

Cho, H., Kim, K.M., and Kim, Y.K. (2009). Human Proline-Rich Nuclear Receptor Coregulatory Protein 2 Mediates an Interaction between mRNA Surveillance Machinery and Decapping Complex. Molecular Cell *33*, 75–86.

Chu, J., Hong, N.A., Masuda, C.A., Jenkins, B.V., Nelms, K.A., Goodnow, C.C., Glynne, 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. PNAS *106*, 2097–2103.

Ciehanover, A., Hod, Y., and Hershko, A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *81*, 1100–1105.

Cleary, J.D., and Ranum, L.P.W. (2013). Repeat-associated non-ATG (RAN) translation in neurological disease. Hum. Mol. Genet. *22*, R45–R51.

Cole, S.E., LaRiviere, F.J., Merrikh, C.N., and Moore, M.J. (2009). A convergence of rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay. Mol. Cell *34*, 440–450.

Coller, J., and Parker, R. (2004). EUKARYOTIC mRNA DECAPPING. Annual Review of Biochemistry *73*, 861–890.

Comyn, S.A., Chan, G.T., and Mayor, T. (2014). False start: cotranslational protein ubiquitination and cytosolic protein quality control. J Proteomics *100*, 92–101.

Cooper, H.L., Berger, S.L., and Braverman, R. (1976). Free ribosomes in physiologically nondividing cells. Human peripheral lymphocytes. J. Biol. Chem. *251*, 4891–4900.

Cougot, N., Van Dijk, E., Babajko, S., and Séraphin, B. (2004). “Cap-tabolism”. Trends Biochem. Sci. *29*, 436–444.

Cox, J., Hein, M.Y., Luber, 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 *13*, 2513–2526.

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 Biotech *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.

Cox, J.S., and Walter, P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. Cell *87*, 391–404.

Danev, R., and Nagayama, K. (2001). Transmission electron microscopy with Zernike phase plate. Ultramicroscopy *88*, 243–252.

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.

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 Reports *6*, 593–598.

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.

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.

Deshaies, R.J. (2014). Proteotoxic crisis, the ubiquitin-proteasome system, and cancer therapy. BMC Biol. *12*, 94.

Dever, T.E., and Green, R. (2012). The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. Cold Spring Harb Perspect Biol *4*, a013706.

Dilda, P.J., Ramsay, E.E., Corti, A., Pompella, A., and Hogg, P.J. (2008). Metabolism of the tumor angiogenesis inhibitor 4-(N-(S-Glutathionylacetyl)amino)phenylarsonous acid. J. Biol. Chem. *283*, 35428–35434.

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.

Doma, M.K., and Parker, R. (2006). Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. Nature *440*, 561–564.

Duncan, C.D.S., and Mata, J. (2011). Widespread Cotranslational Formation of Protein Complexes. PLoS Genet *7*, e1002398.

Duncan, K., Umen, J.G., and Guthrie, C. (2000). A putative ubiquitin ligase required for efficient mRNA export differentially affects hnRNP transport. Curr. Biol. *10*, 687–696.

Dunckley, T., and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in Saccharomyces cerevisiae and contains a functional MutT motif. The EMBO Journal *18*, 5411–5422.

Dunn, C.D., Tamura, Y., Sesaki, H., and Jensen, R.E. (2008). Mgr3p and Mgr1p are adaptors for the mitochondrial i-AAA protease complex. Mol. Biol. Cell *19*, 5387–5397.

Duttler, S., Pechmann, S., and Frydman, J. (2013). Principles of cotranslational ubiquitination and quality control at the ribosome. Mol. Cell *50*, 379–393.

Dykxhoorn, D. (2004). P-bodies and RNAi: The missing link? J RNAi Gene Silencing *2*, 105–106.

Eberle, A.B., Lykke-Andersen, S., Mühlemann, O., and Jensen, T.H. (2009). SMG6 promotes endonucleolytic cleavage of nonsense mRNA in human cells. Nat Struct Mol Biol *16*, 49–55.

Eisele, F., Schäfer, A., and Wolf, D.H. (2010). Ubiquitylation in the ERAD Pathway. Subcell. Biochem. *54*, 136–148.

Van den Elzen, A.M.G., Henri, J., Lazar, N., Gas, M.E., Durand, D., Lacroute, F., Nicaise, M., Van Tilbeurgh, H., Séraphin, B., and Graille, M. (2010). Dissection of Dom34–Hbs1 reveals independent functions in two RNA quality control pathways. Nat Struct Mol Biol *17*, 1446–1452.

Elzen, A.M.G. van den, Schuller, A., Green, R., and Séraphin, B. (2014). Dom34-Hbs1 mediated dissociation of inactive 80S ribosomes promotes restart of translation after stress. The EMBO Journal *33*, 265–276.

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.

Fang, N.N., Ng, A.H.M., Measday, V., and Mayor, T. (2011). Hul5 HECT ubiquitin ligase plays a major role in the ubiquitylation and turnover of cytosolic misfolded proteins. Nat. Cell Biol. *13*, 1344–1352.

Finger, A., Knop, M., and Wolf, D.H. (1993). Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. European Journal of Biochemistry *218*, 565–574.

Finley, D. (2009). Recognition and Processing of Ubiquitin-Protein Conjugates by the Proteasome. Annual Review of Biochemistry *78*, 477–513.

Frank, J., and Agrawal, R.K. (2000). A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation. Nature *406*, 318–322.

Frank, J., Radermacher, M., Penczek, P., Zhu, J., Li, Y., Ladjadj, M., and Leith, A. (1996). SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. J. Struct. Biol. *116*, 190–199.

Frischmeyer, P.A., Hoof, A. van, O'Donnell, K., Guerrerio, 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 *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 *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 *5*, 1014–1020.

Fujii, K., Kitabatake, M., Sakata, T., Miyata, A., and Ohno, M. (2009). A role for ubiquitin in the clearance of nonfunctional rRNAs. Genes Dev. *23*, 963–974.

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.

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.

Furth, N., Gertman, O., Shiber, A., Alfassy, O.S., Cohen, I., Rosenberg, M.M., Doron, N.K., Friedler, A., and Ravid, T. (2011). Exposure of bipartite hydrophobic signal triggers nuclear quality control of Ndc10 at the endoplasmic reticulum/nuclear envelope. Mol. Biol. Cell *22*, 4726–4739.

Gallagher, P.S., Clowes Candadai, S.V., and Gardner, R.G. (2014). The requirement for Cdc48/p97 in nuclear protein quality control degradation depends on the substrate and correlates with substrate insolubility. J. Cell. Sci. *127*, 1980–1991.

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.

Gardner, R.G., Nelson, Z.W., and Gottschling, D.E. (2005). Degradation-mediated protein quality control in the nucleus. Cell *120*, 803–815.

Gardner, R.G., Swarbrick, G.M., Bays, N.W., Cronin, S.R., Wilhovsky, S., Seelig, L., Kim, C., and Hampton, R.Y. (2000). Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. J. Cell Biol. *151*, 69–82.

Gatfield, D., and Izaurralde, E. (2004). Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in Drosophila. Nature *429*, 575–578.

Gautschi, M., Mun, A., Ross, S., and Rospert, S. (2002). A functional chaperone triad on the yeast

ribosome. PNAS *99*, 4209–4214.

Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Schell, T., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2003). Y14 and hUpf3b Form an NMD-Activating Complex. Molecular Cell *11*, 939–949.

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.

Giglione, C., Fieulaine, S., and Meinnel, T. (2014). N-terminal protein modifications: Bringing back into play the ribosome. Biochimie.

Goebl, M.G., Yochem, J., Jentsch, S., McGrath, J.P., Varshavsky, A., and Byers, B. (1988). The yeast cell cycle gene CDC34 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. Science *241*, 1331–1335.

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.

Graille, M., and Séraphin, B. (2012). Surveillance pathways rescuing eukaryotic ribosomes lost in translation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 727–735.

Granneman, S., Kudla, G., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2009). Identification of protein binding sites on U3 snoRNA and pre-rRNA by UV cross-linking and high-throughput analysis of cDNAs. PNAS *106*, 9613–9618.

Gregio, A.P.B., Cano, V.P.S., Avaca, J.S., Valentini, S.R., and Zanelli, C.F. (2009). eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. *380*, 785–790.

Guydosh, N.R., and Green, R. (2014). Dom34 rescues ribosomes in 3' untranslated regions. Cell *156*, 950–962.

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.

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 *18*, 124–134.

Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature *381*, 571–580.

Hashimoto, H., Kikuchi, Y., Nogi, Y., and Fukasawa, T. (1983). Regulation of expression of the galactose gene cluster in Saccharomyces cerevisiae. Isolation and characterization of the regulatory gene GAL4. Mol. Gen. Genet. *191*, 31–38.

Hayes, C.S., and Sauer, R.T. (2003). Cleavage of the A site mRNA codon during ribosome pausing provides a mechanism for translational quality control. Mol. Cell *12*, 903–911.

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., Li, X., Spatrick, P., Casillo, R., Dong, S., and Jacobson, A. (2003). Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. Mol. Cell *12*, 1439–1452.

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. PNAS *90*, 7034–7038.

Heck, J.W., Cheung, S.K., and Hampton, R.Y. (2010). Cytoplasmic protein quality control degradation mediated by parallel actions of the E3 ubiquitin ligases Ubr1 and San1. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 1106–1111.

Hentze, M.W., and Izaurralde, E. (2013). Making sense of nonsense. Nat Struct Mol Biol *20*, 651–653.

Heo, J.-M., Livnat-Levanon, N., Taylor, E.B., Jones, K.T., Dephoure, N., Ring, J., Xie, J., Brodsky, J.L., Madeo, F., Gygi, S.P., et al. (2010). A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. Mol. Cell *40*, 465–480.

Hershko, A., and Heller, H. (1985). Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates. Biochem. Biophys. Res. Commun. *128*, 1079–1086.

Hershko, A., Heller, H., Elias, S., and Ciechanover, A. (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. J. Biol. Chem. *258*, 8206–8214.

Hideshima, T., Bradner, J.E., Wong, J., Chauhan, D., Richardson, P., Schreiber, S.L., and Anderson, K.C. (2005). Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 8567–8572.

Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R., and Jensen, T.H. (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. Nature *413*, 538–542.

Hirokawa, G., Inokuchi, H., Kaji, H., Igarashi, K., and Kaji, A. (2004). In vivo effect of inactivation of ribosome recycling factor - fate of ribosomes after unscheduled translation downstream of open reading frame. Mol. Microbiol. *54*, 1011–1021.

Hogg, J.R., and Goff, S.P. (2010). Upf1 senses 3′UTR length to potentiate mRNA decay. Cell *143*, 379–389.

Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2004). Nonsense-mediated decay approaches the clinic. Nat Genet *36*, 801–808.

Holmes, W.M., Klaips, C.L., and Serio, T.R. (2014). Defining the limits: Protein aggregation and toxicity in vivo. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology *49*, 294–303.

Hoof, A. van, Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C., and Parker, R. (2002). Exosome-Mediated Recognition and Degradation of mRNAs Lacking a Termination Codon. Science *295*, 2262–2264.

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.

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.

Hubner, N.C., and Mann, M. (2011). Extracting gene function from protein-protein interactions using Quantitative BAC InteraCtomics (QUBIC). Methods *53*, 453–459.

Huntzinger, E., Kashima, I., Fauser, M., Saulière, J., and Izaurralde, E. (2008). SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan. RNA *14*, 2609–2617.

Hwang, C.-S., Shemorry, A., and Varshavsky, A. (2010). N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. Science *327*, 973–977.

Inada, T., and Aiba, H. (2005). Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. EMBO J. *24*, 1584–1595.

Ingolia, N.T., Brar, G.A., Stern-Ginossar, N., Harris, M.S., Talhouarne, G.J.S., Jackson, S.E., Wills, M.R., and Weissman, J.S. (2014). Ribosome Profiling Reveals Pervasive Translation Outside of Annotated Protein-Coding Genes. Cell Reports *8*, 1365–1379.

Ingolia, N.T., Ghaemmaghami, S., Newman, J.R.S., and Weissman, J.S. (2009). Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. Science *324*, 218–223.

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., Nagai, H., Endo, T., and Nishikawa, S. (2012). Yos9p and Hrd1p mediate ER retention of misfolded proteins for ER-associated degradation. Mol. Biol. Cell *23*, 1283–1293.

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.

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.

Jentsch, S., McGrath, J.P., and Varshavsky, A. (1987). The yeast DNA repair gene RAD6 encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. Nature *329*, 131–134.

Jimeno-González, S., Haaning, L.L., Malagon, F., and Jensen, T.H. (2010). The yeast 5'-3' exonuclease Rat1p functions during transcription elongation by RNA polymerase II. Mol. Cell *37*, 580–587.

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

Jonas, S., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2013). An unusual arrangement of two 14-3-3-like domains in the SMG5–SMG7 heterodimer is required for efficient nonsense-mediated mRNA decay. Genes Dev. *27*, 211–225.

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

Karzai, A.W., Susskind, M.M., and Sauer, R.T. (1999). SmpB, a unique RNA-binding protein essential for the peptide-tagging activity of SsrA (tmRNA). EMBO J. *18*, 3793–3799.

Kaser, M., Kambacheld, M., Kisters-Woike, B., and Langer, T. (2003). Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. J. Biol. Chem. *278*, 46414–46423.

Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1–Upf1–eRF1–eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. Genes Dev. *20*, 355–367.

Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., and Yao, T.P. (2003). The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. Cell *115*, 727–738.

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.

Keiler, K.C. (2008). Biology of trans-Translation. Annual Review of Microbiology *62*, 133–151.

Keiler, K.C., Waller, P.R., and Sauer, R.T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. Science *271*, 990–993.

Kemper, W.M., Berry, K.W., and Merrick, W.C. (1976). Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. J. Biol. Chem. *251*, 5551–5557.

Kervestin, S., Li, C., Buckingham, R., and Jacobson, A. (2012). Testing the faux-UTR model for NMD: Analysis of Upf1p and Pab1p competition for binding to eRF3/Sup35p. Biochimie *94*, 1560–1571.

Kimonis, V.E., Fulchiero, E., Vesa, J., and Watts, G. (2008). VCP disease associated with myopathy, Paget disease of bone and frontotemporal dementia: review of a unique disorder. Biochim. Biophys. Acta *1782*, 744–748.

Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N. (2011). Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. Science *334*, 941–948.

Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., and Wolf, D.H. (1996). Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. EMBO J. *15*, 753–763.

Kohno, K. (2010). Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. J Biochem *147*, 27–33.

Komander, D., Clague, M.J., and Urbé, S. (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 550–563.

Kozak, M. (1980). Role of ATP in binding and migration of 40S ribosomal subunits. Cell *22*, 459–

467.

Kramer, G., Boehringer, D., Ban, N., and Bukau, B. (2009). The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins. Nat Struct Mol Biol *16*, 589–597.

Kriegenburg, F., Jakopec, V., Poulsen, E.G., Nielsen, S.V., Roguev, A., Krogan, N., Gordon, C., Fleig, U., and Hartmann-Petersen, R. (2014). A chaperone-assisted degradation pathway targets kinetochore proteins to ensure genome stability. PLoS Genet. *10*, e1004140.

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.

Kulkarni, M., Ozgur, S., and Stoecklin, G. (2010). On track with P-bodies. Biochemical Society Transactions *38*, 242.

Kurata, S., Nielsen, K.H., Mitchell, S.F., Lorsch, J.R., Kaji, A., and Kaji, H. (2010). Ribosome recycling step in yeast cytoplasmic protein synthesis is catalyzed by eEF3 and ATP. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 10854–10859.

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 Reports *11*, 956–961.

LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., and Tollervey, D. (2005). RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. Cell *121*, 713–724.

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.

Latterich, M., Fröhlich, K.U., and Schekman, R. (1995). Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. Cell *82*, 885–893.

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.

Leitner, A., Walzthoeni, T., and Aebersold, R. (2014). Lysine-specific chemical cross-linking of protein complexes and identification of cross-linking sites using LC-MS/MS and the xQuest/xProphet software pipeline. Nat Protoc *9*, 120–137.

Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L.E. (2003). Nonsense-Mediated mRNA Decay in Mammalian Cells Involves Decapping, Deadenylating, and Exonucleolytic Activities. Molecular Cell *12*, 675–687.

Leonhard, K., Stiegler, A., Neupert, W., and Langer, T. (1999). Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. Nature *398*, 348–351.

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.

Li, G.-W., Burkhardt, D., Gross, C., and Weissman, J.S. (2014). Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources. Cell *157*, 624–635.

Li, Z., Wu, J., and DeLeo, C.J. (2006). RNA damage and surveillance under oxidative stress. IUBMB Life *58*, 581–588.

Libri, D., Dower, K., Boulay, J., Thomsen, R., Rosbash, M., and Jensen, T.H. (2002). Interactions between mRNA export commitment, 3'-end quality control, and nuclear degradation. Mol. Cell. Biol. *22*, 8254–8266.

Liu, B., Han, Y., and Qian, S.-B. (2013). Cotranslational response to proteotoxic stress by elongation pausing of ribosomes. Mol. Cell *49*, 453–463.

Loh, B., Jonas, S., and Izaurralde, E. (2013). The SMG5–SMG7 heterodimer directly recruits the CCR4–NOT deadenylase complex to mRNAs containing nonsense codons via interaction with POP2. Genes Dev. *27*, 2125–2138.

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. Journal of Molecular Biology *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.

Luce, K., Weil, A.C., and Osiewacz, H.D. (2010). Mitochondrial protein quality control systems in aging and disease. Adv. Exp. Med. Biol. *694*, 108–125.

Lykke-Andersen, J. (2002). Identification of a Human Decapping Complex Associated with hUpf Proteins in Nonsense-Mediated Decay. Mol. Cell. Biol. *22*, 8114–8121.

Lykke-Andersen, S., Chen, Y., Ardal, B.R., Lilje, B., Waage, J., Sandelin, A., and Jensen, T.H. (2014). Human nonsense-mediated RNA decay initiates widely by endonucleolysis and targets snoRNA host genes. Genes Dev. *28*, 2498–2517.

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.

Magnaghi, P., D'Alessio, R., Valsasina, B., Avanzi, N., Rizzi, S., Asa, D., Gasparri, F., Cozzi, L., Cucchi, U., Orrenius, C., et al. (2013). Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. Nat. Chem. Biol. *9*, 548–556.

Manning-Krieg, U.C., Scherer, P.E., and Schatz, G. (1991). Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix. EMBO J. *10*, 3273–3280.

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 *19*, 1–12.

Matyskiela, M.E., Lander, G.C., and Martin, A. (2013). Conformational switching of the 26S proteasome enables substrate degradation. Nat Struct Mol Biol *20*, 781–788.

McAlister, L., Strausberg, S., Kulaga, A., and Finkelstein, D.B. (1979). Altered patterns of protein synthesis induced by heat shock of yeast. Curr. Genet. *1*, 63–74.

McCracken, A.A., and Brodsky, J.L. (1996). Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. J. Cell Biol. *132*, 291–298.

Meaux, S., and Hoof, A.V. (2006). Yeast transcripts cleaved by an internal ribozyme provide new insight into the role of the cap and poly(A) tail in translation and mRNA decay. RNA *12*, 1323–1337.

Mendell, J.T., Sharifi, N.A., Meyers, J.L., Martinez-Murillo, F., and Dietz, H.C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. Nat. Genet. *36*, 1073–1078.

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.

Meyer, H., and Weihl, C.C. (2014). The VCP/p97 system at a glance: connecting cellular function to disease pathogenesis. J. Cell. Sci. *127*, 3877–3883.

Meyer, H.H., Wang, Y., and Warren, G. (2002). Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4. EMBO J. *21*, 5645–5652.

Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3′→5′ Exoribonucleases. Cell *91*, 457–466.

Mitchell, P., and Tollervey, D. (2003). An NMD Pathway in Yeast Involving Accelerated Deadenylation and Exosome-Mediated 3′→5′ Degradation. Molecular Cell *11*, 1405–1413.

Mitrovich, Q.M., and Anderson, P. (2000). Unproductively spliced ribosomal protein mRNAs are natural targets of mRNA surveillance in C. elegans. Genes Dev. *14*, 2173–2184.

Mogk, A., Deuerling, E., Vorderwülbecke, S., Vierling, E., and Bukau, B. (2003). Small heat shock proteins, ClpB and the DnaK system form a functional triade in reversing protein aggregation: sHsps, ClpB and DnaK form a functional triade. Molecular Microbiology *50*, 585–595.

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.

Moore, S.D., and Sauer, R.T. (2005). Ribosome rescue: tmRNA tagging activity and capacity in Escherichia coli. Mol. Microbiol. *58*, 456–466.

Moore, S.D., and Sauer, R.T. (2007). The tmRNA system for translational surveillance and ribosome rescue. Annu. Rev. Biochem. *76*, 101–124.

Muhlrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1995). Turnover mechanisms of the stable yeast PGK1 mRNA. Mol. Cell. Biol. *15*, 2145–2156.

Muhlrad, D., and Parker, R. (1999). Aberrant mRNAs with extended 3' UTRs are substrates for rapid degradation by mRNA surveillance. RNA *5*, 1299–1307.

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 *11*, M111.013722.

Nakatsukasa, K., and Brodsky, J.L. (2008). The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. Traffic *9*, 861–870.

Neutzner, A., Benard, G., Youle, R.J., and Karbowski, M. (2008). Role of the ubiquitin conjugation system in the maintenance of mitochondrial homeostasis. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1147*, 242–253.

Nicholson, P., Yepiskoposyan, H., Metze, S., Orozco, R.Z., Kleinschmidt, N., and Mühlemann, O. (2010). Nonsense-mediated mRNA decay in human cells: mechanistic insights, functions beyond quality control and the double-life of NMD factors. Cell. Mol. Life Sci. *67*, 677–700.

Nielsen, S.V., Poulsen, E.G., Rebula, C.A., and Hartmann-Petersen, R. (2014). Protein quality control in the nucleus. Biomolecules *4*, 646–661.

Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J., and Nissen, P. (2004). Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. EMBO Reports *5*, 1137–1141.

Nogi, Y., Shimada, H., Matsuzaki, Y., Hashimoto, H., and Fukasawa, T. (1984). Regulation of expression of the galactose gene cluster in Saccharomyces cerevisiae. II. The isolation and dosage effect of the regulatory gene GAL80. Mol. Gen. Genet. *195*, 29–34.

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

Obeng, E.A., Carlson, L.M., Gutman, D.M., Harrington, W.J., Lee, K.P., and Boise, L.H. (2006). Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. Blood *107*, 4907–4916.

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.

Ohno, A., Jee, J., Fujiwara, K., Tenno, T., Goda, N., Tochio, H., Kobayashi, H., Hiroaki, H., and Shirakawa, M. (2005). Structure of the UBA domain of Dsk2p in complex with ubiquitin molecular determinants for ubiquitin recognition. Structure *13*, 521–532.

Okan, N.A., Bliska, J.B., and Karzai, A.W. (2006). A Role for the SmpB-SsrA system in Yersinia pseudotuberculosis pathogenesis. PLoS Pathog. *2*, e6.

Orban, T.I., and Izaurralde, E. (2005). Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. RNA *11*, 459–469.

Ossareh-Nazari, B., Niño, C.A., Bengtson, M.H., Lee, J.-W., Joazeiro, C.A.P., and Dargemont, C. (2014). Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy. J. Cell Biol. *204*, 909–917.

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.

Park, M.H., Nishimura, K., Zanelli, C.F., and Valentini, S.R. (2010). Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. Amino Acids *38*, 491–500.

Park, S.-H., Kukushkin, Y., Gupta, R., Chen, T., Konagai, A., Hipp, M.S., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2013). PolyQ proteins interfere with nuclear degradation of cytosolic proteins by sequestering the Sis1p chaperone. Cell *154*, 134–145.

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

Parker, R., and Song, H. (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. Nat Struct Mol Biol *11*, 121–127.

Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., and Lindquist, S. (1994). Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hspl04. Nature *372*, 475–478.

Pechmann, S., Chartron, J.W., and Frydman, J. (2014). Local slowdown of translation by nonoptimal codons promotes nascent-chain recognition by SRP in vivo. Nat Struct Mol Biol *21*, 1100–1105.

Perrin-Vidoz, L., Sinilnikova, O.M., Stoppa-Lyonnet, D., Lenoir, G.M., and Mazoyer, S. (2002). The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. Hum. Mol. Genet. *11*, 2805–2814.

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

Pickart, C.M., and Rose, I.A. (1985). Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase acts on ubiquitin carboxyl-terminal amides. J. Biol. Chem. *260*, 7903–7910.

Picotti, P., Bodenmiller, B., Mueller, L.N., Domon, B., and Aebersold, R. (2009). Full dynamic range proteome analysis of S. cerevisiae by targeted proteomics. Cell *138*, 795–806.

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., Skabkin, M.A., Hellen, C.U.T., Pestova, T.V., and Pisarev, A.V. (2011). Dissociation by Pelota, Hbs1 and ABCE1 of mammalian vacant 80S ribosomes and stalled elongation complexes. EMBO J. *30*, 1804–1817.

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., and Deuerling, E. (2012). Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis. Trends Biochem. Sci. *37*, 274–283.

Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Groth, D.F., and Glenner, G.G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. Cell *35*, 349–358.

Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. Methods *24*, 218–229.

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.

Rehwinkel, J., Raes, J., and Izaurralde, E. (2006). Nonsense-mediated mRNA decay: Target genes and functional diversification of effectors. Trends Biochem. Sci. *31*, 639–646.

Richards, J., Mehta, P., and Karzai, A.W. (2006). RNase R degrades non-stop mRNAs selectively in an SmpB-tmRNA-dependent manner. Mol. Microbiol. *62*, 1700–1712.

Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, 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.

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.

Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2001). FIDELITY OF AMINOACYL-tRNA SELECTION ON THE RIBOSOME: Kinetic and Structural Mechanisms. Annual Review of Biochemistry *70*, 415–435.

Rodnina, M.V., and Wintermeyer, W. (2009). Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. Curr. Opin. Cell Biol. *21*, 435–443.

Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 519–529.

Rosenbaum, J.C., Fredrickson, E.K., Oeser, M.L., Garrett-Engele, C.M., Locke, M.N., Richardson, L.A., Nelson, Z.W., Hetrick, E.D., Milac, T.I., Gottschling, D.E., et al. (2011). Disorder targets misorder in nuclear quality control degradation: a disordered ubiquitin ligase directly recognizes its misfolded substrates. Mol. Cell *41*, 93–106.

Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. , Published Online: 01 July 2004; | Doi:10.1038/nm1066 *10*, S10–S17.

Rougemaille, M., Dieppois, G., Kisseleva-Romanova, E., Gudipati, R.K., Lemoine, S., Blugeon, C., Boulay, J., Jensen, T.H., Stutz, F., Devaux, F., et al. (2008). THO/Sub2p functions to coordinate 3'-end processing with gene-nuclear pore association. Cell *135*, 308–321.

Rubino, E., Rainero, I., Chiò, A., Rogaeva, E., Galimberti, D., Fenoglio, P., Grinberg, Y., Isaia, G., Calvo, A., Gentile, S., et al. (2012). SQSTM1 mutations in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Neurology *79*, 1556–1562.

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.

Saguez, C., Schmid, M., Olesen, J.R., Ghazy, M.A.E.-H., Qu, X., Poulsen, M.B., Nasser, T., Moore, C., and Jensen, T.H. (2008). Nuclear mRNA surveillance in THO/sub2 mutants is triggered by inefficient polyadenylation. Mol. Cell *31*, 91–103.

Saini, P., Eyler, D.E., Green, R., and Dever, T.E. (2009). Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. Nature *459*, 118–121.

Saito, S., Hosoda, N., and Hoshino, S. (2013). The Hbs1-Dom34 Protein Complex Functions in Non-stop mRNA Decay in Mammalian Cells. J. Biol. Chem. *288*, 17832–17843.

Schaeffer, D., and Van Hoof, A. (2011). Different nuclease requirements for exosome-mediated degradation of normal and nonstop mRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 2366–2371.

Scheres, S.H.W. (2012). A Bayesian view on cryo-EM structure determination. J. Mol. Biol. *415*, 406–418.

Schmid, M., and Jensen, T.H. (2010). Nuclear quality control of RNA polymerase II transcripts. Wiley Interdiscip Rev RNA *1*, 474–485.

Schröder, R., Watts, G.D.J., Mehta, S.G., Evert, B.O., Broich, P., Fliessbach, K., Pauls, K., Hans, V.H., Kimonis, V., and Thal, D.R. (2005). Mutant valosin-containing protein causes a novel type of frontotemporal dementia. Ann. Neurol. *57*, 457–461.

Schuberth, C., and Buchberger, A. (2005). Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. Nat. Cell Biol. *7*, 999–1006.

Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. Physiological Reviews *81*, 741–766.

Sha, Z., Brill, L.M., Cabrera, R., Kleifeld, O., Scheliga, J.S., Glickman, M.H., Chang, E.C., and Wolf, D.A. (2009). The eIF3 interactome reveals the translasome, a supercomplex linking protein synthesis and degradation machineries. Mol. Cell *36*, 141–152.

Shalgi, R., Hurt, J.A., Krykbaeva, I., Taipale, M., Lindquist, S., and Burge, C.B. (2013). Widespread regulation of translation by elongation pausing in heat shock. Mol. Cell *49*, 439–452.

Shandala, T., Parkinson-Lawrence, E.J., and Brooks, D.A. (2001). Protein: Cotranslational and Posttranslational Modification in Organelles. In eLS, (John Wiley & Sons, Ltd),.

Shao, S., Brown, A., Santhanam, B., and Hegde, R.S. (2015). Structure and Assembly Pathway of the Ribosome Quality Control Complex. Mol. Cell.

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., and Hegde, R.S. (2014). Reconstitution of a minimal ribosome-associated ubiquitination pathway with purified factors. Mol. Cell *55*, 880–890.

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.

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.

Shi, W., Zhang, X., Jiang, X., Yuan, H., Lee, J.S., Barry, C.E., Wang, H., Zhang, W., and Zhang, Y. (2011). Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in Mycobacterium tuberculosis. Science *333*, 1630–1632.

Shiber, A., Breuer, W., Brandeis, M., and Ravid, T. (2013). Ubiquitin conjugation triggers misfolded protein sequestration into quality control foci when Hsp70 chaperone levels are limiting. Mol Biol Cell *24*, 2076–2087.

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.

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.

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.

Skruzný, M., Schneider, C., Rácz, A., Weng, J., Tollervey, D., and Hurt, E. (2009). An endoribonuclease functionally linked to perinuclear mRNP quality control associates with the nuclear pore complexes. PLoS Biol. *7*, e8.

Smith, J.E., Alvarez-Dominguez, J.R., Kline, N., Huynh, N.J., Geisler, S., Hu, W., Coller, J., and Baker, K.E. (2014). Translation of Small Open Reading Frames within Unannotated RNA Transcripts in Saccharomyces cerevisiae. Cell Reports *7*, 1858–1866.

Sommer, T., and Jentsch, S. (1993). A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at

the endoplasmic reticulum. Nature *365*, 176–179.

Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. Cell *136*, 731–745.

Sonenberg, N., Wilchek, M., and Zamir, A. (1975). Identification of a region in 23S rRNA located at the peptidyl transferase center. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *72*, 4332–4336.

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.

Specht, S., Miller, S.B.M., Mogk, A., and Bukau, B. (2011). Hsp42 is required for sequestration of protein aggregates into deposition sites in Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol. *195*, 617–629.

Steglich, G., Neupert, W., and Langer, T. (1999). Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. Mol. Cell. Biol. *19*, 3435–3442.

Streich, F.C., and Lima, C.D. (2014). Structural and Functional Insights to Ubiquitin-Like Protein Conjugation. Annual Review of Biophysics *43*, 357–379.

Swanson, K.A., Hicke, L., and Radhakrishnan, I. (2006). Structural basis for monoubiquitin recognition by the Ede1 UBA domain. J. Mol. Biol. *358*, 713–724.

Swanson, R., Locher, M., and Hochstrasser, M. (2001). A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. Genes Dev. *15*, 2660–2674.

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

Tatsuta, T. (2009). Protein Quality Control in Mitochondria. J Biochem *146*, 455–461.

Thein, S.L., Hesketh, C., Taylor, P., Temperley, I.J., Hutchinson, R.M., Old, J.M., Wood, W.G., Clegg, J.B., and Weatherall, D.J. (1990). Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta-thalassemia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *87*, 3924–3928.

Thomas, N.S.B., and R. V. Arnstein, H. (1984). Formation of a 22S mRNA · rRNA · protein complex during translation of globin messenger RNA. European Journal of Biochemistry *143*, 27–33.

Travers, K.J., Patil, C.K., Wodicka, L., Lockhart, D.J., Weissman, J.S., and Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. Cell *101*, 249–258.

Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., David, G., and Tora, L. (1995). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. Nature *378*, 403–406.

Tsuboi, T., Kuroha, K., Kudo, K., Makino, S., Inoue, E., Kashima, I., and Inada, T. (2012). Dom34:Hbs1 Plays a General Role in Quality-Control Systems by Dissociation of a Stalled Ribosome at the 3′ End of Aberrant mRNA. Molecular Cell *46*, 518–529.

Tu, G.F., Reid, G.E., Zhang, J.G., Moritz, R.L., and Simpson, R.J. (1995). C-terminal extension of truncated recombinant proteins in Escherichia coli with a 10Sa RNA decapeptide. J. Biol. Chem. *270*, 9322–9326.

Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrad, D., and Parker, R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in Saccharomyces cerevisiae. The EMBO Journal *21*, 1427–1436.

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 Deadenylase in Saccharomyces cerevisiae. Cell *104*, 377–386.

Turner, G.C., and Varshavsky, A. (2000). Detecting and Measuring Cotranslational Protein Degradation in Vivo. Science *289*, 2117–2120.

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

Uemura, S., Aitken, C.E., Korlach, J., Flusberg, B.A., Turner, S.W., and Puglisi, J.D. (2010). Real-time tRNA transit on single translating ribosomes at codon resolution. Nature *464*, 1012–1017.

Valenzuela, D.M., Chaudhuri, A., and Maitra, U. (1982). Eukaryotic ribosomal subunit anti-association activity of calf liver is contained in a single polypeptide chain protein of Mr = 25,500 (eukaryotic initiation factor 6). J. Biol. Chem. *257*, 7712–7719.

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.

Voos, W., and Röttgers, K. (2002). Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. Biochim. Biophys. Acta *1592*, 51–62.

Wagner, E., and Lykke-Andersen, J. (2002). mRNA surveillance: the perfect persist. J Cell Sci *115*, 3033–3038.

Wan, J., Yourshaw, M., Mamsa, H., Rudnik-Schöneborn, S., Menezes, M.P., Hong, J.E., Leong, D.W., Senderek, J., Salman, M.S., Chitayat, D., et al. (2012). Mutations in the RNA exosome component gene EXOSC3 cause pontocerebellar hypoplasia and spinal motor neuron degeneration. Nat Genet *44*, 704–708.

Wang, F., Durfee, L.A., and Huibregtse, J.M. (2013). A cotranslational ubiquitination pathway for quality control of misfolded proteins. Mol. Cell *50*, 368–378.

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 *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. *23*, 451–463.

Wang, Z., and Prelich, G. (2009). Quality control of a transcriptional regulator by SUMO-targeted degradation. Mol. Cell. Biol. *29*, 1694–1706.

Weihl, C.C., Pestronk, A., and Kimonis, V.E. (2009). Valosin-containing protein disease: inclusion body myopathy with Paget's disease of the bone and fronto-temporal dementia. Neuromuscul. Disord. *19*, 308–315.

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.

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.

Wilkinson, C.R., Wallace, M., Morphew, M., Perry, P., Allshire, R., Javerzat, J.P., McIntosh, J.R., and Gordon, C. (1998). Localization of the 26S proteasome during mitosis and meiosis in fission yeast. EMBO J *17*, 6465–6476.

Wilson, M.A., Meaux, S., and Hoof, A. van (2007). A Genomic Screen in Yeast Reveals Novel Aspects of Nonstop mRNA Metabolism. Genetics *177*, 773–784.

Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J.-C., Dufour, M.-E., Boulay, J., Régnault, B., Devaux, F., Namane, A., Séraphin, B., et al. (2005). Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. Cell *121*, 725–737.

Xiang, S., Cooper-Morgan, A., Jiao, X., Kiledjian, M., Manley, J.L., and Tong, L. (2009). Structure and function of the 5'-->3' exoribonuclease Rat1 and its activating partner Rai1. Nature *458*, 784–788.

Xu, P., Duong, D.M., Seyfried, N.T., Cheng, D., Xie, Y., Robert, J., Rush, J., Hochstrasser, M., Finley, D., and Peng, J. (2009). Quantitative Proteomics Reveals the Function of Unconventional Ubiquitin Chains in Proteasomal Degradation. Cell *137*, 133–145.

Yamamoto, Y., Sunohara, T., Jojima, K., Inada, T., and Aiba, H. (2003). SsrA-mediated trans-translation plays a role in mRNA quality control by facilitating degradation of truncated mRNAs. RNA

9, 408–418.

Yan, J.X., Wait, R., Berkelman, T., Harry, R.A., Westbrook, J.A., Wheeler, C.H., and Dunn, M.J. (2000). A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. Electrophoresis *21*, 3666–3672.

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.

Zattas, D., and Hochstrasser, M. (2014). Ubiquitin-dependent protein degradation at the yeast endoplasmic reticulum and nuclear envelope. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 1–17.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 - Résultats des tests de croissance et des cribles génétiques des mutants *tetO$_2$CDC48* et *rqc1*Δ à 30°C et 37°C

Lors de notre étude fonctionnelle des facteurs du complexe RQC chez *Saccharomyces cerevisiae*, nous avons observé que la croissance de la souche *tetO$_2$CDC48*, pour laquelle le niveau d'expression de Cdc48 est diminué par rapport à la souche sauvage même en absence de doxycycline, est sensiblement diminuée à 37°C (**Figure 41**). De manière intéressante, alors que le mutant *rqc1*Δ se comporte comme la souche sauvage à cette température élevée, la délétion de *RQC1* dans le fond génétique *tetO$_2$CDC48* abolit totalement la croissance à 37°C, montrant un fort effet synergique entre ces deux mutations. En revanche, la délétion de *LTN1* dans le fond génétique *tetO$_2$CDC48* n'affecte pas la croissance à 37°C de manière significative. En parallèle, étant donné que la fusion Rqc1-TAP est déficiente pour la prévention de l'agrégation (voir la partie **3** des **Résultats**), nous avons effectué des tests en goutte dans les mêmes fonds génétiques mais en utilisant cette fusion Rqc1-TAP à la place d'une délétion de *RQC1*. Comme précédemment décrit, le mutant *tom1*Δ est thermosensible et ne pousse pas à 37°C. Cependant le lien fonctionnel à 37°C entre *RQC1* et *CDC48* a été une fois de plus observé, ce qui suggère que la sensibilité de ce double mutant proviendrait de l'accumulation de protéines défectueuses causée par un stress traductionnel à 37°C et qui ne sont pas correctement dégradées, provoquant ainsi la formation d'agrégats potentiellement toxiques, notamment lorsque Rqc1 est absent ou déficient.

De manière surprenante, une délétion de *LTN1* dans la souche Rqc1-TAP *tetO$_2$CDC48* restaure presque entièrement la croissance à 37°C, révélant un effet suppresseur de l'absence de Ltn1 sur ce phénotype thermosensible (**Figure 41**). Des tests en goutte effectués avec le triple mutant *rqc1*Δ *ltn1*Δ *tetO$_2$CDC48* ont également montré cet effet suppresseur en absence de Ltn1 (données non montrées). Quelle pourrait être la raison de ce phénotype suppresseur? On pourrait imaginer que la polyubiquitinylation des protéines aberrantes par Ltn1 augmente leur propension à s'agréger et que l'accumulation d'agrégats est la cause de cette toxicité

cellulaire, cependant nous avons montré dans la partie **3** des **Résultats** que la quantité de protéines agrégées visibles dans le mutant *rqc1*Δ n'était pas affectée par l'absence de Ltn1. Serait-il alors préférable pour la cellule d'accumuler des protéines agrégées non ubiquitinylées?

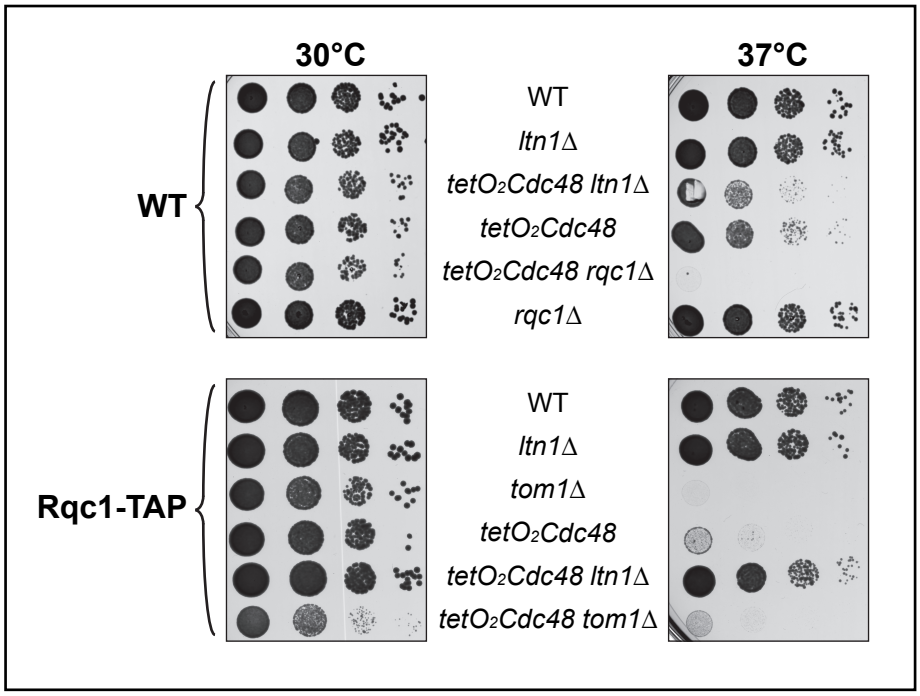


Figure 41. Tests en goutte de mutants du RQC et de Tom1 à 30°C et 37°C
Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48h ou à 37°C pendant 72 h.

Afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire à l'origine de ce phénomène, j'ai réalisé des cribles génétiques GIM (pour Genetic Interaction Mapping, voir Decourty et al., 2008) à 37°C pour identifier d'autres mutants pouvant avoir un effet synthétique létal avec les mutants *rqc1*Δ et *tetO$_2$CDC48*, et éventuellement d'autres mutants suppresseurs du double mutant *rqc1*Δ *tetO$_2$CDC48*. De manière intéressante, les cribles réalisés à 37°C avec *rqc1*Δ révèlent des interactions fonctionnelles similaires aux cribles précédemment réalisés avec ce mutant à 30°C en présence d'antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine et Nourséothricine). En effet, on observe dans les deux cas un effet synthétique létal avec les mutants des gènes du complexe SKI (**Figure 42**). Cependant, le ratio par rapport au mutant contrôle est beaucoup plus fort avec les cribles à 37°C (jusqu'à -5) qu'à 30°C (maximum à -2). Les autres mutants identifiés ne semblent pas avoir de

lien fonctionnel entre eux, ni de lien connu avec le contrôle qualité des protéines, si ce n'est *UBX4*, impliqué dans la voie ERAD, et *SEC53* qui participe au repliement des protéines au niveau du réticulum endoplasmique.

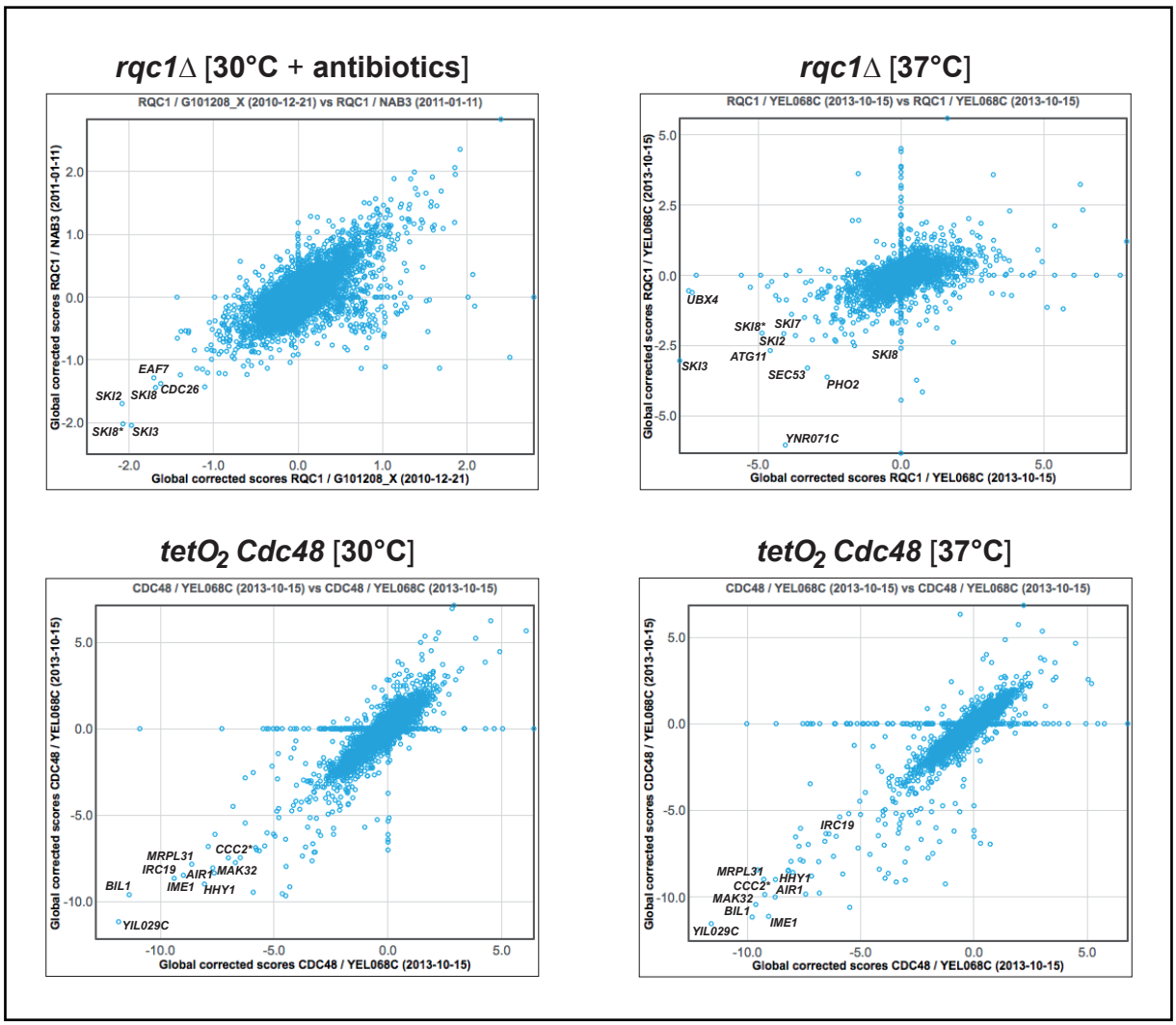


Figure 42. Cribles GIM des souches *rqc1*Δ et *tetO$_2$Cdc48* à 30°C et 37°C
Cribles GIM réalisés selon (Decourty et al., 2008). Les gènes correspondant aux mutants présentant les plus fortes interactions fonctionnelles sont indiqués.

Les cribles réalisés avec le mutant *tetO$_2$CDC48* révèlent des interactions fonctionnelles similaires à 30°C et à 37°C (**Figure 42**), ce qui souligne la reproductibilité de ces cribles génétiques, cependant un très grand nombre de gènes semblent interagir fonctionnellement avec *CDC48* et la plupart d'entre eux n'ont pas de lien avec la dégradation ou le contrôle qualité des protéines (*IME1* est impliqué dans la méïose, *BIL1* est impliqué dans l'assemblage de l'actine, *AIR1* est un facteur de maturation des ARN, et *CCC2* un transporteur de cuivre). Les mutants des ORFs

YNR071C et *YIL029C* identifiés comme synthétiques létaux (respectivement dans les cribles *rqc1*Δ et *tetO*$_2$*CDC48*) n'ont pas de fonction connue, nous savons seulement que la première pourrait avoir une activité aldose 1-épimérase et que la délétion de la deuxième confère une sensibilité au GSAO, un poison mitochondrial de synthèse (Dilda et al., 2008). Enfin, le mutant *rqc1*Δ ne présente pas de lien fonctionnel avec *CDC48* dans ces cribles contrairement aux résultats observés en tests en goutte. Il semble donc que le mutant hypomorphe *tetO*$_2$*CDC48* cause un effet trop pléiotropique pour être utilisé de manière spécifique dans le cadre du contrôle qualité des protéines aberrantes, ce qui provient probablement de la multitude de voies dans lesquelles la protéine Cdc48 est impliquée (Meyer and Weihl, 2014). Etant donné que les liens fonctionnels entre *RQC1* et *CDC48* observés en tests en goutte n'ont pas été reproduits en cribles génétiques GIM à 37°C, nous n'avons pas donné suite à cette partie du projet de caractérisation fonctionnelle et nous nous sommes concentrés sur des purifications biochimiques du complexe RQC et des tests fonctionnels en utilisant des rapporteurs aberrants "Non-Stop".

Annexe 2 - Souches de levure utilisées au cours de cette étude

Souches	Génotypes	Références
Wild type		
BY4741	*MATa, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0*	Brachmann *et al.*, 1998
BY4742	*MATα, ura3Δ0, his3Δ1, leu2Δ0, lys2Δ0*	Brachmann *et al.*, 1998
Protéines de fusion		
LMA1949	as *BY4741*, ***Rqc2-TAP****:HIS3MX6*	Ghaemmaghami *et al.*, 2003
LMA1951	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6,*	Ghaemmaghami *et al.*, 2003
LMA2195	as *BY4741*, ***Rpl16a-TAP****:HIS3MX6*	Ghaemmaghami *et al.*, 2003
LMA2196	as *BY4741*, ***Cdc48-TAP****:HIS3MX6,*	Ghaemmaghami *et al.*, 2003
LMA2544	as *BY4741*, ***Ltn1-TAP****:HIS3MX6*	Ghaemmaghami *et al.*, 2003
LMA2685	as *BY4741*, ***Rqc2-TAP****:HIS3MX6,* ***Itn1****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA2686	as *BY4741*, ***Rqc2-TAP****:HIS3MX6,* ***rqc1****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA2688	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6,* ***rqc2****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA2689	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6,* ***Itn1****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA2711	as *BY4741*, ***Cdc48-TAP****:HIS3MX6,* ***Itn1****Δ::URA3*	Cette étude
LMA2712	as *BY4741*, ***Cdc48-TAP****:HIS3MX6,* ***rqc2****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA2713	as *BY4741*, ***Cdc48-TAP****:HIS3MX6,* ***rqc1****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA2947	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6,* ***tom1****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA2648	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6, KANMX4:PrTetO2:****CDC48*	Cette étude
LMA2870	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6, KANMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***Itn1****Δ::URA3*	Cette étude
LMA3002	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6, KANMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***tom1****Δ::LEU2*	Cette étude
LMA3180	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6, KANMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***Itn1****Δ****RING****::LEU2*	Cette étude

LMA3136	as *BY4741*, ***Rqc1-TAP****:HIS3MX6,* ***Itn1*****Δ*****RING****::LEU2*	Cette étude
LMA3052	as *BY4741,* ***Rqc1-CRAC****:URA3*	Cette étude
LMA3054	as *BY4741,* ***Rqc2-CRAC****:URA3*	Cette étude

Mutants

LMA1713	as *BY4741*, ***rqc2****Δ::HIS3*	Cette étude
LMA1740	as *BY4741*, ***ski2****Δ::URA3*	Cette étude
LMA1986	as *BY4741*, ***Itn1****Δ::URA3*	Cette étude
LMA1741	as *BY4741*, ***rqc2****Δ::HIS3,* ***ski2****Δ::URA3*	Cette étude
LMA2026	as *BY4741*, ***rqc2****Δ::HIS3,* ***Itn1****Δ::URA3*	Cette étude
LMA1744	as *BY4741*, ***rqc2****Δ::URA3*	Cette étude
LMA2203	as *BY4741*, ***Itn1****Δ::HIS3*	Cette étude
LMA2204	as *BY4741*, ***Itn1****Δ::HIS3,* ***ski2****Δ::URA3*	Cette étude
LMA2714	as *BY4741*, ***rqc1****Δ::HIS3*	Cette étude
LMA2715	as *BY4741,* ***rqc1****Δ::HIS3,* ***ski2****Δ::URA3*	Cette étude
LMA2649	as *BY4741*, *KANMX4:PrTetO2:****CDC48***	Cette étude
LMA843	as *BY4742*, *yel068cΔ::PraNATMX4,ydl242wΔ::KANMX4*	Cette étude
LMA836	as *BY4742*, ***rqc2****Δ::PraNATMX4, yel068cΔ::KANMX4*	Cette étude
LMA837	as *BY4742*, ***ski2****Δ::KANMX4, yel068cΔ::PraNATMX4*	Cette étude
LMA832	as *BY4742*, ***ski7****Δ::KANMX4,* ***rqc2****Δ::PraNATMX4*	Cette étude
LMA839	as *BY4742*, ***ski7****Δ::KANMX4, yel068cΔ::PraNATMX4*	Cette étude
LMA1921	as *BY4742*, ***Itn1****Δ::KANMX4, yel068cΔ::PraNATMX4*	Cette étude
LMA830	as *BY4742*, ***rqc2****Δ::PraNATMX4,* ***ski2****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA1920	as *BY4742*, ***rqc2****Δ::PraNATMX4,* ***Itn1****Δ::KANMX4*	Cette étude
LMA1997	as *BY4742*, ***ski2****Δ::PraNATMX4,* ***Itn1****Δ::KANMX4*	Cette étude

LMA2001	as *BY4742*, ***ski7***Δ*::PraNATMX4,* ***ltn1***Δ*::KANMX4*	Cette étude
LMA2306	as *BY4742*, ***rqc1***Δ*::KANMX4, yel068c*Δ*::PraNATMX4*	Cette étude
LMA1996	as *BY4742*, ***rqc1***Δ*::KANMX4,* ***ski2***Δ*::PraNATMX4*	Cette étude
LMA2709	as *BY4742*, *KANMX4:PrTetO2:****CDC48***	Cette étude
LMA2719	as *BY4742*, *PraNATMX4:PrTetO2:****CDC48***	Cette étude
LMA2746	as *BY4742*, *PraNATMX4:PrTetO2:****CDC48****,* ***ski2***Δ*::KANMX4*	Cette étude
LMA1967	as *BY4742*, ***rqc1***Δ*::KANMX4*	Euroscarf
LMA2070	as *BY4741*, ***rqc1***Δ*::KANMX4*	Euroscarf
LMA2948	as *BY4742,* ***tom1***Δ*::LEU2*	Cette étude
LMA3123	as *BY4742,* ***tom1***Δ*::LEU2,* ***rqc1***Δ*::KANMX4*	Cette étude
LMA3202	as *BY4742,* ***tom1***Δ*::LEU2,* ***rqc1***Δ*::KANMX4,* ***ltn1***Δ*::NATMX4*	Cette étude
LMA3193	as *BY4742,* ***tom1****-hectC3235A:LEU2,* ***rqc1***Δ*::KANMX4*	Cette étude
LMA2039	as *BY4742*, ***rqc1***Δ*:: PralphaNATMX4,* ***ltn1***Δ*::KANMX4,*	Cette étude
LMA2135	as *BY4742*, ***rqc1***Δ*::KANMX4,* ***rqc2***Δ*:: PralphaNATMX4*	Cette étude
LMA3645	as *BY4742*, ***rqc1***Δ*::KANMX4,* ***tom1***Δ*::LEU2* ***rqc2***Δ*::HIS3*	Cette étude
LMA3041	as *BY4741,* ***erg6***Δ*::LEU2*	Cette étude
LMA3120	as *BY4741,* ***erg6***Δ*::LEU2,* ***rqc1***Δ*::KANMX4*	Cette étude
LMA3265	as *BY4741*, ***dsk2***Δ*::LEU2*	Cette étude
LMA3267	as *BY4741*, ***dsk2***Δ*::LEU2,* ***rqc1***Δ*::HIS3*	Cette étude
LMA3306	as *BY4742*, ***dsk2***Δ*::LEU2,* ***rqc1***Δ*::HIS3,* ***tom1***Δ*::LEU2*	Cette étude

Souches utilisées pour les cribles GIM

GIM123	as *BY4742,* ***ski2***Δ*::Pr*α*NATMX4*	Cette étude
GIM155	as *BY4742,* ***rqc2***Δ*::Pr*α*NATMX4*	Cette étude
GIM225	as *BY4742,* ***ski8***Δ*::Pr*α*NATMX4*	Cette étude

GIM477	as *BY4742, **ski7**Δ::PrαNATMX4*	Cette étude
GIM479	as *BY4742, **rqc1**Δ::PrαNATMX4*	Cette étude
GIM503	as *BY4742, **ski3**Δ::PrαNATMX4*	Cette étude
GIM448	as *BY4742, **ltn1**Δ::PrαNATMX4*	Cette étude

Annexe 3 - Plasmides utilisés au cours de cette étude

Plasmide	Marqueurs	Référence
pGID1	URA3, HygR	Decourty *et al.*, 2008
pAV183	URA3	Van Hoof *et al.*, 2002
pAV184	URA3	Van Hoof *et al.*, 2002
pAV188	URA3	Van Hoof *et al.*, 2002
pTAP Stop	URA3	Defenouillère *et al.*, 2013
pTAP Non-Stop	URA3	Defenouillère *et al.*, 2013
pGFP Non-Stop	URA3	Defenouillère *et al.*, 2015

Annexe 4 - Anticorps utilisés pour les immunodétections

Protéine ciblée	Anticorps	Dilution
Protéine A ou TAP	PAP (complexe peroxidase anti-peroxidase), Sigma-Aldrich	1/10000ème
Fusions 3xHA	anti-HA couplé à la peroxidase, Roche	1/500ème
Fusion 3xFLAG	anti-FLAG M2, monoclonal de souris, Sigma-Aldrich	1/16000ème
Cdc48	Polyclonal de lapin, offert par Alexander Buchberger	1/4000ème
Nog1	Polyclonal de lapin	1/5000ème
Rpl3	Polyclonal de souris, offert par Jonathan Warner	1/5000ème
Rps8	Polyclonal de lapin, offert par Georgio Dieci	1/5000ème
Rpt5	Polyclonal de lapin, Biomol	1/5000ème
G6PDH	Polyclonal de lapin	1/100000ème
Ubiquitine	P4D1, monoclonal de souris, Covance	1/1000ème

RÉSUMÉ

Chez les eucaryotes, la régulation de l'expression des gènes fait intervenir des mécanismes de contrôle qualité qui permettent de préserver l'intégrité du transcriptome et du protéome, par la détection et l'élimination des ARN et des peptides défectueux. Ces processus sont essentiels pour limiter l'accumulation de protéines déficientes qui ont tendance à former des agrégats, ce qui peut entraîner une toxicité cellulaire et des pathologies telles que des maladies neurodégénératives. Chaque compartiment cellulaire possède des systèmes de contrôle qualité spécifiques permettant d'éliminer les protéines défectueuses qui s'y accumulent. Dans le cytosol, la traduction de certains ARN messagers aberrants conduit à un blocage des ribosomes, ce qui déclenche le recrutement de facteurs de contrôle qualité permettant à la fois la dissociation des ribosomes bloqués et la dégradation de ces transcrits aberrants. Cependant, les peptides synthétisés à partir de ces ARNm étant généralement déficients, ils doivent également être dégradés. Au cours de ma thèse, j'ai découvert l'existence du complexe RQC, composé des protéines Rqc1, Rqc2, Ltn1 et Cdc48, qui se lie aux sous-unités 60S bloquées afin de reconnaître et d'éliminer les peptides naissants aberrants. Alors que Ltn1 assure leur polyubiquitinylation, Rqc2 permet l'ajout d'alanines-thréonines à leur extrémité C-terminale (CAT tails), et Cdc48 extrait ces peptides de manière à ce que le complexe RQC les escorte jusqu'au protéasome pour qu'ils soient dégradés. Une étude de Rqc1 nous a alors permis de montrer que ce facteur est essentiel à la fois pour le recrutement de Cdc48 et pour la prévention de l'agrégation des peptides aberrants. Ce phénomène d'agrégation, induit par l'addition de CAT tails par Rqc2, permet notamment de déclencher la réponse Hsf1 en cas de stress. Enfin, nous avons découvert que de multiples voies de contrôle qualité, notamment des chaperonnes et des facteurs d'adressage au protéasome, participent à l'élimination des agrégats de protéines aberrantes lorsque Rqc1 est déplété. L'ensemble de ces mécanismes de contrôle qualité permet aux cellules de répondre efficacement à un stress traductionnel afin de maintenir l'homéostasie des protéines.

ABSTRACT

Gene expression in eukaryotes requires quality control mechanisms that preserve the integrity of the transcriptome and the proteome by detecting and eliminating defective RNAs and peptides. These processes are essential to prevent the accumulation of deficient proteins that are prone to aggregation, which can cause a cellular toxicity and pathologies such as neurodegenerative diseases. Each cellular compartment contains specific quality control systems that ensure the elimination of accumulated defective proteins. In the cytosol, translation of aberrant mRNAs may lead to ribosome stalling, which triggers the recruitment of quality control factors that enable the dissociation of stalled ribosomes and the degradation of these aberrant transcripts. However, since the polypeptides synthesized from these mRNAs are generally deficient, they must also be degraded. During my thesis, I discovered the existence of the RQC complex, composed of Rqc1, Rqc2, Ltn1 and Cdc48, that bind stalled 60S subunits to detect and eliminate aberrant nascent peptides. Whereas Ltn1 ensures their polyubiquitylation, Rqc2 enables the addition of C-terminal alanine-threonine tails (CAT tails), and Cdc48 extracts these peptides so that the RQC complex can escort them to the proteasome for their degradation. A study of Rqc1 revealed that this factor is essential for Cdc48 recruitment and to prevent the aggregation of aberrant proteins. This aggregation phenomenon, which is induced by the addition of CAT tails by Rqc2, is essential to trigger the Hsf1 response in case of stress. Finally, we discovered that multiple quality control pathways, such as chaperones and proteasome-recruiting factors, participate in the elimination of aberrant protein aggregates when Rqc1 is depleted. This set of quality control mechanisms ensures an efficient cellular response in case of translational stress in order to maintain protein homeostasis.

MOTS-CLÉS

Synthèse et dégradation des protéines - Contrôle qualité des ARN - NSD/NGD - Contrôle qualité des protéines - Agrégation - Chaperonnes - Ubiquitine - Protéasome - *Saccharomyces cerevisiae*.