

## UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire

# THÈSE présentée par :

# Guillaume CAULIER

soutenue le : **19 décembre 2024**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

# Caractérisation d'un module du complexe CCR4-NOT ciblant des ARNm codant pour des protéines potentiellement délétères

**THÈSE dirigée par :**

**Dr MAUXION Fabienne**

Chargée de recherche, Université de Strasbourg

**Dr SERAPHIN Bertrand**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr BADIS-BREARD Gwenaël**

Chargée de recherche, Université de Paris-Saclay

**Dr ROUGEMAILLE Mathieu**

Directeur de recherche, Université de Paris-Saclay

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Pr STUTZ Françoise**

Professeur des universités, Université de Genève

**Dr SAUTER Claude**

Directeur de recherche, Université de Strasbourg

## Avertissement au lecteur / Warning to the reader

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition des membres de la communauté universitaire. Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Cela implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document. D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction ou représentation illicite encourt une poursuite pénale.

This document is the result of a long process approved by the jury and made available to members of the university community. It is subject to the intellectual property rights of its author. This implies an obligation to quote and reference when using this document. Furthermore, any infringement, plagiarism, unlawful reproduction or representation will be prosecuted.

### [Code de la Propriété Intellectuelle](#)

#### [Article L122-4](#) :

Toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite. Il en est de même pour la traduction, l'adaptation ou la transformation, l'arrangement ou la reproduction par un art ou un procédé quelconque.

Any representation or reproduction in whole or in part without the consent of the author or his successors in title or assigns is unlawful. The same applies to translation, adaptation or transformation, arrangement or reproduction by any art or process whatsoever.

[Articles L335-1 à L335-9](#) : Dispositions pénales / Penal provisions.

## Licence attribuée par l'auteur



**Caractérisation d'un module du complexe  
CCR4-NOT ciblant des ARNm codant pour  
des protéines potentiellement délétères**

## Résumé

Un mécanisme de dégradation co-translationnelle des ARN messagers (ARNm) codant des protéines aberrantes et/ou des polypeptides présents en excès a été identifié chez divers eucaryotes, mais reste mal compris. L'accumulation de ces protéines est à l'origine de maladies (appelées collectivement protéinopathies) et de cancers chez l'homme. Ce mécanisme implique la dégradation des queues poly(A) des ARNm codant des protéines mal repliées par le complexe CCR4-NOT, la principale deadenylase eucaryote. Chez *S. cerevisiae*, ce processus implique Caf130, dont il a été démontré qu'il régule le niveau des ARNm codant pour la protéine ribosomale Rpl4, lorsque cette dernière est mal repliée. Les données publiées ainsi que nos propres résultats biochimiques soutiennent une interaction entre Caf130, sous-unité du CCR4-NOT, et Btt1, sous-unité du NAC, impliqué dans le repliement des polypeptides naissants. Afin d'élucider ce mécanisme, nous avons caractérisé le module du CCR4-NOT impliqué, en combinant purifications biochimiques, tests d'interactions protéiques et modélisation AlphaFold, pour en définir l'organisation. Ces études structurales et fonctionnelles offriront une compréhension globale de ce système de contrôle de qualité

Mots-clés : complexe CCR4-NOT, NAC, ribosome, dégradation de l'ARNm, traduction, levure

## Abstract

A mechanism for the co-translational degradation of messenger RNAs (mRNAs) encoding aberrant proteins and/or polypeptides present in excess has been identified in various eukaryotes but remains poorly understood. Accumulation of such proteins causes diseases (collectively named proteinopathies) and cancers in human. The mechanism involves the degradation of the poly(A) tails of mRNAs encoding the deleterious misfolded proteins by the CCR4-NOT complex, the main eukaryotic deadenylase. In *S. cerevisiae*, this process involves Caf130, which regulates mRNA levels encoding the ribosomal protein Rpl4 when it is misfolded. Published data and our own biochemical results support an interaction between Caf130, a subunit of CCR4-NOT, and Btt1, a subunit of the NAC, involved in the folding of nascent polypeptides. To elucidate this mechanism, we characterized the CCR4-NOT module involved, combining biochemical purifications, protein interaction assays, and AlphaFold modelling to define its organization. The completion of structural and functional studies will provide a global understanding of this quality control system.

Keywords: CCR4-NOT complex, NAC, ribosome, mRNA decay, translation, yeast

# Remerciements

Je souhaite tout d'abord exprimer mes plus sincères remerciements à mes directeurs de thèse. À Bertrand, mon co-directeur de thèse et chef de laboratoire, qui m'a accueilli dès mes premiers pas en recherche comme stagiaire de master et m'a donné l'envie de poursuivre en thèse. Merci pour votre soutien constant, pour votre écoute attentive, votre patience, vos conseils, les discussions et pour l'encadrement de qualité que vous m'avez offert. Vous avez été bien plus qu'un encadrant ; vous avez été un véritable mentor, et votre expertise scientifique ainsi que votre enthousiasme ont été pour moi une source d'inspiration durant ma thèse, mais aussi pour ma vie future dans la recherche.

Je tiens également à remercier Fabienne Mauxion, ma directrice de thèse, pour son soutien constant, sa disponibilité, sa bienveillance et pour les nombreux conseils qui m'ont permis de progresser dans mon travail de recherche. Votre expérience et votre capacité à m'accompagner avec professionnalisme ont été précieux pour moi.

Je remercie également chaleureusement les membres du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant ma thèse : Mélody Matelot, Éric Huntzinger, Claudine Gaudon-Plesse, Lucie Labeauvie, Lina Sene, Joseph Siblini, Emese Gazdag, Jérémy Scutenaire et Monica Peña Luna. Merci à vous tous pour votre disponibilité, pour votre soutien et tous les bons moments passés ensemble, qui ont marqué ces années de thèse.

Je voudrais aussi particulièrement remercier Mélody, pour son aide dans l'avancée de mes expériences au cours de ma thèse et pour tous les moments partagés ! Éric également, pour ses conseils et son aide dans nos combats acharnés contre les appareils capricieux. Lucie, qui m'a soutenu et a toujours été de bon conseil et d'une aide précieuse pour que je puisse avancer au mieux, mais également pour tous les moments partagés !

Je voudrais également remercier les plateformes de l'IGBMC. Particulièrement, Catherine Birck et tous les membres de la plateforme de Biologie et Génomique Structurale, pour m'avoir formé et donné de nombreux conseils dans la purification des protéines.

Je tiens également à remercier notre collaborateur Jérôme Basquin, membre de l'équipe d'Elena Conti (MPI Munich, Allemagne), pour la génération des premières données structurales.

Je remercie tout particulièrement les membres du Comité de suivi individuel de thèse (CSI) : Hélène Zuber et Clément Charenton pour leur temps, leur soutien, leurs précieux conseils ainsi que pour avoir partagé leurs connaissances tout au long de mon projet de doctorat.

Je remercie également les membres de mon jury, Dr Gwenaël Badis-Breard, Dr Mathieu Rougemaille, Pr Françoise Stutz et Dr Claude Sauter, d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail.

Je tiens à remercier ma famille, et particulièrement mes parents et ma sœur, pour leur soutien indéfectible tout au long de ce parcours. Vos encouragements, votre soutien et votre confiance en moi m'ont permis de traverser les défis de ces dernières années.

Je voudrais également remercier Marine, de m'avoir toujours soutenu au quotidien, d'avoir toujours été là pour moi, et de la force que tu m'as apporté durant ces dernières années.

# Table des matières

Liste des figures, tableaux et annexes .....	9
Liste des abréviations.....	11
Introduction.....	13
Introduction générale de l'expression des gènes nucléaires des eucaryotes .....	13
1. La synthèse de l'ARN .....	13
2. La maturation et l'export de l'ARNm .....	15
2.1. L'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' du pré-ARNm .....	16
2.2. L'épissage .....	16
2.3. Le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3' de l'ARNm .....	17
2.4. La modification m <sup>6</sup> A .....	17
2.5. L'export de l'ARNm .....	18
3. Les protéines liant l'ARNm et les mRNP cytoplasmiques .....	18
3.1. Les protéines se liant à la coiffe .....	19
3.2. Les protéines se liant à la queue poly(A) .....	19
3.3. Les autres protéines des mRNP.....	20
4. La traduction .....	21
4.1. L'initiation de la traduction .....	22
4.2. L'élongation de la traduction .....	25
4.3. La terminaison de la traduction et le recyclage des ribosomes.....	26
4.4. Les polysomes .....	27
4.5. Les chaperonnes associées aux protéines naissantes en cours de traduction ....	27
5. La dégradation des ARN .....	36
5.1. La dégradation des ARNm non-aberrants.....	37
5.2. Les voies de contrôle qualité des ARNm aberrants .....	42
5.3. Localisation de la dégradation des ARNm.....	45
6. Présentation du complexe CCR4-NOT.....	47
Introduction.....	49
Is there one CCR4-NOT complex? Composition, heterogeneity, and inter-species variations	51
7. Présentation du projet .....	92

Résultats.....	95
The NAC-complex docks the yeast CCR4-NOT Caf130 module to the ribosome for nascent protein-dependent mRNA deadenylation.....	96
Autres résultats .....	116
1. Recherche d'un phénotype thermosensible de $\Delta caf130$ .....	116
2. Association de Caf130 aux ribosomes et aux polysomes .....	117
3. Division du module Caf130 du complexe CCR4-NOT en sous-entités .....	120
4. Organisation du module entier de Caf130.....	127
5. Définition des modes d'interaction des partenaires de CNOT11 .....	129
Discussion.....	132
Matériel et méthodes .....	146
1. Analyses <i>in silico</i> .....	146
1.1. Recherches de similarité .....	146
1.2. Alignement de séquences multiples .....	146
1.3. AlphaFold.....	146
2. Souches et milieux.....	147
2.1. Milieux pour bactéries .....	147
2.2. Souches bactériennes et plasmides .....	147
2.3. Milieux pour levure .....	147
2.4. Souches de levure .....	148
3. Méthodes de biologie moléculaire .....	148
3.1. Isolation d'ADN à partir d' <i>E.coli</i> .....	148
3.2. Réaction en chaine par Polymérase (PCR) .....	148
3.3. Digestion par enzyme de restriction .....	149
3.4. Extraction par Phénol Chloroforme Isoamyle (PCI) et précipitation à l'éthanol .....	150
3.5. Ligation dans un gel d'agarose .....	150
3.6. Transformation bactérienne .....	151
3.7. Mutagénèse dirigée .....	152
4. Manipulation de la levure .....	153
4.1. Transformation d'ADN dans la levure .....	153
4.2. Construction de souche.....	154

4.3.	Double hybride .....	157
4.4.	Test phénotypique de l'activité du module Caf130 du complexe CCR4-NOT ...	159
5.	Méthode biochimique pour l'analyse de protéines.....	159
5.1.	Purifications de protéines chez la bactérie .....	159
5.2.	Analyse structurale.....	163
5.3.	Analyses des protéines chez la levure.....	165
5.4.	Analyse des protéines .....	167
Annexe.....		170
Références.....		180

# Liste des figures, tableaux et annexes

Figure 1 : Représentation schématique de l'expression génétique chez les eucaryotes. ....	14
Figure 2: Représentation schématique des sites importants du ribosome lors de la traduction avec la reconnaissance codon/anti-codon.....	22
Figure 3 : Représentation schématique de l'initiation de la traduction. ....	24
Figure 4 : Représentation schématique de l'élongation de la traduction. ....	26
Figure 5 : Représentation des domaines structuraux du complexe NAC. ....	30
Figure 6 : Alignement des séquences des sous-unités $\alpha$ -NAC et $\beta$ -NAC.....	31
Figure 7 : Reconstruction cryo EM du NAC de <i>C. elegans</i> dans le tunnel ribosomal de la sous-unité 60S (Gamerding et al., 2019) .....	32
Figure 8 : Représentation schématique de l'interaction directe de l'extension N-terminale de la sous-unité $\beta$ -NAC avec le peptide naissant dans le tunnel du ribosome.....	32
Figure 9 : Représentation schématique du rôle du NAC humain. ....	34
Figure 10 : Schéma général des voies principales de la dégradation des ARNm non-aberrants chez les eucaryotes. ....	39
Figure 11 : La dégradation des ARNm aberrants par le système NMD. ....	46
Figure 12 : Représentation schématique du modèle.....	94
Figure R1 : Test de croissance des souches $\Delta caf130$ et WT en culture liquide.....	117
Figure R2: La spécificité d'interaction de Caf130-TAP aux ribosomes et aux polysomes.....	119
Figure R3 : Purification à grande échelle de l'entité Caf130 C-terminal - Cal4.....	122
Figure R4 : Purification à grande échelle de l'entité Caf130 N-terminal – Not1(1-162).....	125
Figure R5 : Essais de cristallisation du module Caf130. ....	126
Figure R6 : Analyse structurale du module N-terminal du complexe CCR4-NOT. ....	128
Figure R7 : Interaction entre CNOT11 sauvage ou mutants avec ses différents partenaires	131
Figure D1 : Représentation schématique du module montrant les effets de la délétion d'Acl4 seule ou en combinaison avec Caf130. ....	141

Figure D2 : Représentation schématique des effets de la délétion conjointe d'Acl4 avec les différents membres du module de Caf130. ....	143
Figure M1 : Schéma de l'intégration de l'étiquette TAP en C-terminal de la protéine d'intérêt (exemple : Caf130). ....	155
Figure M2 : Schéma illustrant la délétion d'un gène d'intérêt chez la levure, remplacé par un marqueur de sélection (exemple ici avec KanMX6). ....	156
Figure M3 : Principe du test à double hybride. ....	158
Tableau 1 : Caractéristiques des chaperonnes dédiées aux protéines ribosomiques chez la levure avec leurs orthologues chez l'humain. ....	36
Annexe 1 : Interaction de Cal4-TAP avec les ribosomes et les polysomes. ....	170
Annexe 2 : Conservation entre les régions C-terminales de CNOT11 humain et de Caf130 chez la levure. ....	171
Annexe 3 : Tableau des souches utilisées durant la thèse. ....	173
Annexe 4: Tableau des plasmides utilisés pour le double hybride avec les protéines de levure. ....	174
Annexe 5 : Tableau des plasmides utilisés pour le double hybride avec les protéines humaines. ....	175
Annexe 6 : Tableau des plasmides utilisés pour l'expression de protéines recombinantes. ....	176
Annexe 7 : Tableau des oligonucléotides utilisés durant la thèse. ....	178
Annexe 8 : Tableau des anticorps utilisés durant la thèse. ....	179

## Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
ARM	Armadillo repeats
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
CBP	Calmodulin binding protein
Btt1	BTf Three 1
Caf	CCR4 associated factor
Ccr4	Carbon catabolite repression 4
CNOT	CCR4-NOT transcription complex subunit
CHX	Cycloheximide
DA	Domaine d'activation
DLA	Domaine de liaison à l'ADN
D.O	Densité optique
DTT	Dithiothreitol
DUF	Domain Unknown Function
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEP	Exonuclease-Endonuclease-Phosphatase
EGTA	Ethylene glycol-bis ( $\beta$ -aminoethyl ether)- <i>N, N, N', N'</i> -tetraacetic acid
EGD1	Enhancer of Gal4 DNA binding 1
EGD2	Enhancer of Gal4 DNA binding 2
Kan	Kanamycine
LB	Lysogenic-Broth
LiT	Lithium Acetate, Tris-HCl
Not	Negative on TATA
MIF4G	Middle domain of eukaryotic initiator factor 4G
mRNP	messenger ribonucleoprotein
NAC	Nascent polypeptide-associated complex

ORF	Open Reading Frame
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
PABPC	Poly(A) binding protein cytoplasmic
PABPN	Poly(A) binding protein nuclear
Pbp1	Pab1p-Binding Protein
PDB	Protein data base
PEG	Polyethylene Glycol
Pi	Phosphate inorganique
Poly (A)	Poly Adenine
PTC	Premature termination codon
RAC	Ribosome-associated complex
RING domain	Really Interesting New Gene finger domain
RMSD	Root Mean Square Deviation
RPL	Protéine ribosomale de la grande sous-unité
Rpm	Revolutions per minute
RPS	Protéine ribosomale de la petite sous-unité
RRM	RNA Recognition Motif
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SGD	Saccharomyces Genome Database
Ssb	Stress-Seventy subfamily B
TAP	Tandem affinity purification
TEV	Tobacco etch virus
TTP	tristetraprolin protein
WT	Wild type
YPDA	Yeast extract peptone, Dextrose, Adenine

# Introduction

## Introduction générale de l'expression des gènes nucléaires des eucaryotes

L'expression des gènes nucléaires eucaryotes est un processus complexe et multi-étapes, essentiel pour la régulation de l'activité cellulaire (Figure 1). Ce processus commence par la transcription de l'information génétique de l'ADN en ARN dans le noyau. Pour les ARN codants des protéines, la transcription génère des ARN pré-messagers (pré-ARNm) et est suivie de plusieurs étapes de modifications post-transcriptionnelles (ajout de la coiffe, épissage, polyadénylation...) pour produire des ARN messagers matures (ARNm). Ces derniers sont ensuite exportés du noyau vers le cytoplasme où ils sont traduits en protéines. Une fois la traduction achevée (ou, dans certains cas, pendant la traduction), les ARNm sont dégradés.

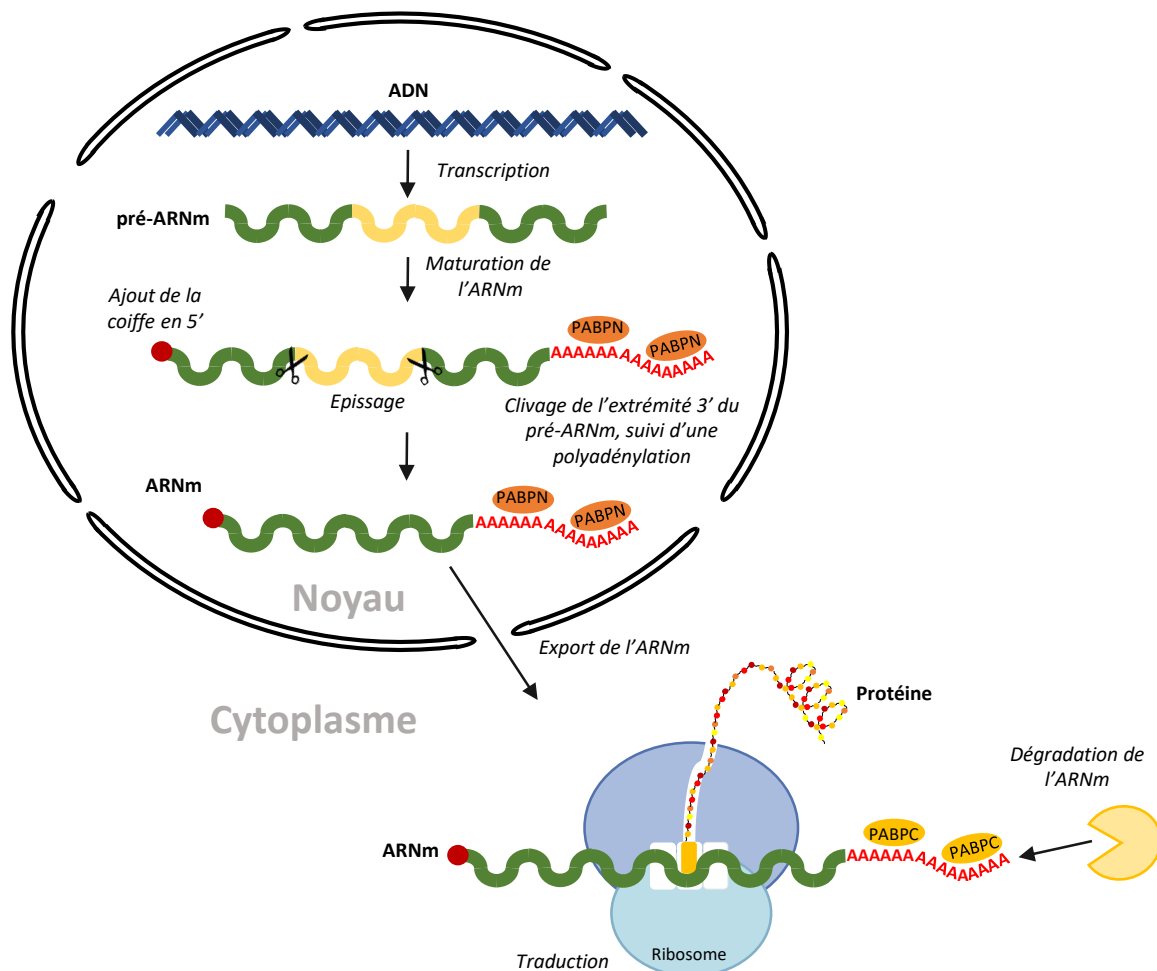
Toutes ces étapes sont régulées de manière précise et coordonnée pour assurer une expression génique correcte et efficace. Au travers de ces mécanismes, l'expression génique est régulée constamment pour l'adapter aux besoins cellulaires et maintenir l'homéostasie. Pour ce faire, les cellules ajustent l'expression des gènes durant les différentes étapes, permettant de moduler les niveaux d'ARN ou de protéines selon les besoins.

La dégradation de l'ARNm est essentielle pour le renouvellement des ARNm, car les cellules dégradent continuellement certains ARNm préexistants tout en produisant de nouveaux, ce qui maintient l'équilibre global du contenu cellulaire (Schwanhäusser et al., 2011; Vogel et Marcotte, 2012). Pour les besoins de ce manuscrit, les mécanismes cytoplasmiques de l'expression génique de l'ARNm seront principalement discutés, tout en abordant certains aspects nucléaires nécessaires à une compréhension globale. Ces principaux mécanismes seront décrits principalement chez la levure, tout en mettant en avant les similarités avec l'homme et, parfois, avec d'autres organismes.

### 1. La synthèse de l'ARN

Les acides ribonucléiques, ou ARN, sont des molécules essentielles au cœur des processus biologiques, jouant des rôles variés nécessaires au maintien des fonctions cellulaires et à l'intégrité du vivant. L'ARN est constitué d'une chaîne linéaire de nucléotides. Ces derniers sont composés de trois éléments principaux : un ribose (sucre), un groupement phosphate et

une base azotée (adénine (A), cytosine (C), guanine (G), uracile (U)). Chez les eucaryotes, la synthèse de l'ARN, appelée transcription, se déroule dans le noyau. Ce processus fondamental consiste à recopier l'information génétique contenue dans l'ADN en ARN. Chez la plupart des eucaryotes, la transcription des ARN pré-messagers est réalisée par l'ARN polymérase II (Pol II), qui est également responsable de la transcription des petits ARN nucléolaires (snoARN), des petits ARN nucléaires (snARN), des micro-ARN (miARN) et de longs ARN non-codants (lncARN). L'ARN polymérase I est quant à elle chargée de la synthèse des ARN ribosomiaux 5,8S, 18S et 28S tandis que l'ARN polymérase III transcrit les ARN de transfert (ARNt), l'ARN ribosomique 5S, ainsi que d'autres petits ARN.



**Figure 1 : Représentation schématique de l'expression génétique chez les eucaryotes.**

L'ARNm sert de support à l'information génétique des gènes codant pour une ou plusieurs protéines. De plus, certains ARN jouent un rôle clé dans l'expression génique. Les ARNr sont des composants majeurs du ribosome, où ils interviennent dans la traduction. Les ARNt jouent également un rôle crucial dans la traduction, en assurant la correspondance entre chaque codon de l'ARNm et l'acide aminé correspondant, jouant ainsi un rôle critique dans l'incorporation correcte des acides aminés dans la chaîne polypeptidique. Certains ARN non codants, tels que les snoARN, jouent également un rôle dans l'expression génique en réalisant des modifications post-transcriptionnelles des ARN. En particulier, les snoARN sont impliqués dans la modification des ARNr, ce qui est essentiel pour leur repliement correct et, par conséquent, pour le bon déroulement de la traduction. D'autres ARN jouent un rôle dans la régulation de l'expression génique. Par exemple, les miARN sont impliqués dans la répression de la traduction en ciblant des ARNm, généralement dans leur région 3' non traduite (3'UTR). Ils participent également à la dégradation d'ARNm cibles.

## **2. La maturation et l'export de l'ARNm**

La transcription de l'ADN en pré-ARNm est suivie de plusieurs modifications post-transcriptionnelles, certaines pouvant se dérouler de manière co-transcriptionnelle, regroupées sous le terme de maturation, qui transforment le pré-ARNm en ARNm mature. La première étape est l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARNm. La seconde étape est l'épissage, qui implique l'excision des introns (séquences non codantes) et la jonction des exons (séquences codantes). Cette étape est facultative, des introns n'étant pas toujours présents. La troisième étape, sauf pour de rares exceptions, consiste en l'ajout d'une queue polyadénylée (poly(A)) à l'extrémité 3'. Dans quelques cas, l'ARNm est modifié plus ponctuellement : modification de bases ou nucléotides (comme la formation de m6A) ou l'édition de résidus (comme la formation d'inosine ou conversion de C en U). Après ces modifications, l'ARNm est dit mature et, est exporté du noyau vers le cytoplasme, où il est traduit en protéine par les ribosomes. L'étape de traduction sera décrite plus loin dans le manuscrit.

### **2.1. L'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' du pré-ARNm**

Peu après le début de la transcription du pré-ARNm, une coiffe 7-méthylguanosine est ajoutée au premier nucléotide de l'extrémité 5' de l'ARNm via une liaison 5'-5' triphosphate. Lorsque l'ARNm atteint une longueur de 20 à 30 nucléotides, cette coiffe est formée par l'action de trois enzymes : la « mRNA capping enzyme » (possédant une activité ARN triphosphatase), l'ARN guanyltransférase, et l'ARN guanine-7-méthyltransférase qui catalysent respectivement l'élimination du phosphate terminal, l'ajout d'un guanosine via une liaison 5'-5', et la méthylation du guanosine (Ghosh et Lima 2010). Cette coiffe joue plusieurs rôles clés en interagissant principalement avec deux complexes : le complexe de liaison à la coiffe (CBC) principalement nucléaire, et le facteur d'initiation eucaryote de la traduction 4E (eIF4E). Par ces interactions et du fait de sa structure particulière, la coiffe protège l'extrémité 5' des ARNm de la dégradation par les exonucléases. De plus, elle facilite l'export de l'ARNm mature du noyau vers le cytoplasme via un signal de reconnaissance, et favorise le recrutement du ribosome au cours de l'initiation de la traduction.

### **2.2. L'épissage**

L'épissage est un processus essentiel dans la maturation du pré-ARNm, durant lequel les séquences non codantes, les introns, sont excisés du pré-ARNm, tandis que les séquences codantes, les exons, sont reliés entre elles pour former un ARNm mature. Cette réaction est catalysée par le spliceosome, un complexe ribonucléoprotéique (Wilkinson, Charenton, et Nagai 2020). Ce complexe est composé de plusieurs snARN associés à des protéines de la famille Sm et des protéines spécifiques, formant ainsi des petites particules ribonucléoprotéiques nucléaires (snRNP).

L'épissage alternatif, une variation de ce processus, permet de générer différents ARNm matures à partir d'un même gène. Ce mécanisme joue un rôle primordial dans la diversité protéique, car il permet aux ARNm issus de l'épissage de coder pour différentes isoformes de protéines en fonction des exons retenus ou exclus par le spliceosome.

### 2.3. Le clivage et la polyadénylation de l'extrémité 3' de l'ARNm

La queue poly(A) joue plusieurs rôles cruciaux : elle stabilise l'extrémité 3' de l'ARNm, facilite son exportation du noyau vers le cytoplasme, et participe à l'initiation de la traduction. La fin de la transcription se caractérise par la dissociation de la machinerie de transcription ainsi que par l'ajout d'une queue poly(A) au niveau du site de polyadénylation (PAS) de l'ARNm nouvellement synthétisé. Ce processus se déroule en deux étapes : le clivage puis la polyadénylation, essentielles pour la maturation complète de l'ARNm. Le clivage est catalysé par plusieurs facteurs qui se lient à l'ARN polymérase, incluant le facteur spécifique de clivage et polyadénylation, le facteur de stimulation du clivage et d'autres facteurs de clivage (Boreikaitė et Passmore 2023). Ces facteurs reconnaissent plusieurs séquences spécifiques situées en amont du site de terminaison de la transcription, dont le signal de polyadénylation, qui détermine le site de clivage. Cette reconnaissance permet le recrutement ensuite d'autres facteurs tels que la poly(A) polymérase, Pap1 (PAP chez l'homme), formant ainsi le complexe de polyadénylation (Elkon, Ugalde, et Agami 2013). Une fois le clivage effectué, Pap1 (PAP) synthétise la queue poly(A), composée de 70 à 80 adénines chez la levure et de 250 à 300 adénines chez l'homme.

### 2.4. La modification m<sup>6</sup>A

La modification m<sup>6</sup>A (N6-méthyladénosine) est l'une des modifications internes les plus importantes de l'ARNm chez les eucaryotes. On trouve le m<sup>6</sup>A enrichi à proximité du codon stop, dans la séquence codante ainsi que dans la 3'UTR. Chez la levure, cette modification est ajoutée co-transcriptionnellement par une protéine « *writer* » nommée Ime4, avec l'aide d'autres protéines. Le rôle du m<sup>6</sup>A est en partie défini par l'intermédiaire d'une protéine communément appelée « *reader* » qui, grâce à son domaine YTH, decode la marque m<sup>6</sup>A. Le « *reader* » de m<sup>6</sup>A interagit avec d'autres protéines qui influencent l'expression génique en régulant la stabilité de l'ARNm, son export et/ou sa traduction (Yang et al. 2018). Chez *S. cerevisiae*, une seule protéine « *reader* », nommée Pho92, a été identifiée, cette dernière jouant un rôle majeur dans la méiose (Scutenaire et al. 2022). Les protéines « *reader* » humaines et de levure contrôlent plusieurs étapes de l'expression des gènes par des mécanismes moléculaires qui ne sont toujours pas élucidés : épissage, traduction, dégradation

des ARN (Albihlal, Chan, et van Werven 2024). De manière intéressante, la protéine Mmi1 de *S. pombe* est un homologue de protéines « reader » de levure et humaines. Cependant, cette protéine ne lie pas le m6A et a été identifiée chez *S. pombe* comme une sous-unité constitutive du complexe CCR4-NOT, un complexe impliqué dans la dégradation des ARNm (Ukleja, Cuellar, et al. 2016).

## **2.5. L'export de l'ARNm**

Une fois la maturation de l'ARNm terminée dans le noyau, il est exporté vers le cytoplasme pour y être traduit en protéine. Ce processus commence par la liaison de plusieurs protéines adaptatrices sur l'ARNm pour faciliter son export (Zenklusen et Stutz 2001; Pacheco-Fiallos et al. 2023). Ces différents facteurs liés à l'ARNm forment ainsi un complexe ribonucléoprotéique messager (mRNP), qui sera décrit de manière plus détaillée dans une prochaine section. Les facteurs associés à l'ARNm permettent ensuite le recrutement de l'ARNm au complexe du pore nucléaire (NPC), constitué de protéines appelées nucléoporines (NUPs). Le complexe du pore nucléaire sert de canal pour le passage de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme. Une fois l'ARNm arrivé dans le cytoplasme, la majorité des facteurs associés à l'ARNm en provenance du noyau sont relargués et réimportés dans le noyau pour participer à de nouveaux cycles d'export. L'intense transport nucléocytoplasmique au sein de la cellule qui implique protéines, ARN, ribosomes néosynthétisés, est globalement sous le contrôle de la GTPase Ran qui assure la distinction entre le cytoplasme et le nucléoplasme (Izaurralde et al. 1997).

## **3. Les protéines liant l'ARNm et les mRNP cytoplasmiques**

Dans la cellule, les ARNm ne sont pas nus mais interagissent avec diverses protéines pour former un complexe ribonucléoprotéique messager (mRNP). Ce complexe joue un rôle crucial dans le métabolisme des ARNm. Les protéines constituant les mRNP existent tant dans le noyau que dans le cytoplasme. Certaines sont communes aux deux compartiments alors que d'autres sont spécifiques à une localisation. Dans ce manuscrit, nous nous focaliserons spécifiquement sur les protéines principales des mRNP cytoplasmiques.

### **3.1. Les protéines se liant à la coiffe**

Comme décrit précédemment, eIF4E, aussi appelé Cdc33 chez la levure, se lie spécifiquement à la coiffe des ARNm dans le cytoplasme (Altmann et al. 1989). eIF4E interagit avec eIF4G et eIF4A pour former le complexe eIF4F. Par ailleurs, eIF4G interagit avec la « poly(A) binding protein » PABP (facteur qui sera décrit en détail plus loin dans le manuscrit), entraînant la circularisation de l'ARNm (Kahvejian, Roy, et Sonenberg 2001). La présence de ces facteurs permet (et stimule) le recrutement du complexe de pré-initiation, marquant ainsi le début de la traduction, une étape importante qui sera décrite plus loin.

Des protéines se liant au facteur eIF4E, génériquement appelées 4E-BP (4E-Binding-Protein), comme Caf20p (appelée également p20) et Eap1 chez *Saccharomyces cerevisiae*, ont été identifiées. Ces protéines fonctionnent comme des inhibiteurs de la traduction, car elles entrent en compétition avec eIF4G pour se lier à eIF4E, empêchant ainsi le recrutement du complexe de pré-initiation de la traduction (Altmann et al. 1997; Cosentino et al. 2000; Castelli et al. 2015).

### **3.2. Les protéines se liant à la queue poly(A)**

Les protéines liant la queue poly(A) dans le cytoplasme (PABPC ou Pab1 chez la levure) jouent un rôle crucial dans la maturation et la stabilité des ARNm. Chez les mammifères, il existe plusieurs PABP cytoplasmiques (PABPC), la plus abondante étant PABPC1 (Passmore et Coller 2022). Chez la levure, comme pour ses homologues humains, Pab1 est composée de quatre domaines RRM (motif de reconnaissance de l'ARN), d'une région riche en proline et d'un domaine C-terminal structuré (Burd, Matunis, et Dreyfuss 1991). Les domaines RRM1 et RRM2 ont une forte affinité pour la queue poly(A). RRM2 interagit avec eIF4G pour la circularisation de l'ARNm mentionnée ci-dessus. Le domaine C-terminal reconnaît les motifs PAM2, un court motif protéique présent dans plusieurs protéines, en particulier, certaines régulant la taille de la queue poly(A).

Pour une interaction optimale avec la queue poly(A), Pab1 requiert 12 adénosines, bien qu'une seule Pab1 recouvre environ 30 adénosines (Deo et al. 1999; Schäfer et al. 2019). De plus, plusieurs Pab1 sur une même queue poly(A) interagissent ensemble pour faciliter leur

liaison au poly(A) (Schäfer et al. 2019). Ainsi, Pab1 stabilise l'ARNm tout en étant impliquée dans la traduction et la dégradation des ARNm.

### **3.3. Les autres protéines des mRNP**

De nombreuses protéines cellulaires se lient aux ARNm, particulièrement dans les régions non traduites 3'UTR. En effet, les protéines associées aux régions 5' non traduites (5'UTR) et aux phases codantes sont déplacées par les ribosomes lors de la traduction. Cependant, certains ARNm possèdent des structures secondaires complexes appelées IRES (Internal Ribosome Entry Sites), qui permettent aux ribosomes de se fixer à l'ARNm indépendamment que par la coiffe (Rubtsova et al. 2003). eIF4G a été identifié comme pouvant se lier aux IRES dans la 5'UTR, régulant ainsi la traduction de certains ARNm.

Certaines des protéines constitutives des mRNP cytoplasmiques sont abondantes et se lient à de nombreux ARNm, d'autres sont très spécifiques et lient des séquences (ou des structures) définies. Par exemple, chez l'homme, la tristetraprolin (TTP) se lie à des éléments riches en AU (ARE) généralement situés dans la région 3'UTR. En association avec d'autres complexes, TTP favorise la dégradation des ARN portant ces éléments (Fabian et al. 2013). De même, les homologues de TTP chez la levure, Cth1 et Cth2, se lient à des séquences ARE lorsque les cellules sont carencées en fer entraînant une réduction du niveau des ARNm ciblés (Prouteau, Daugeron, et Séraphin 2008).

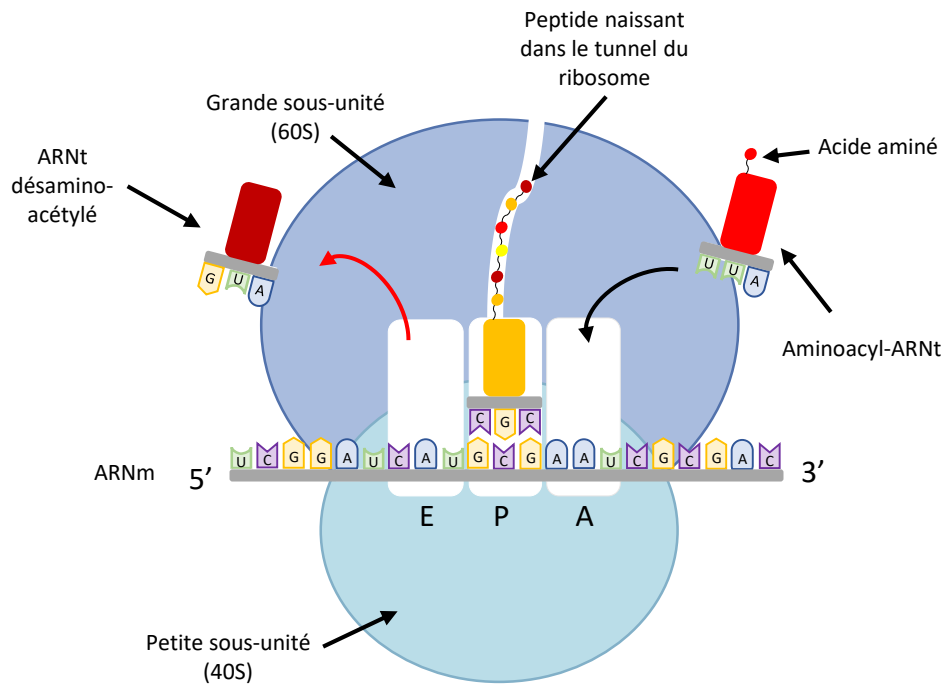
Les microARNs (miARNs) se lient à des séquences spécifiques dans la région 3'UTR des ARNm. Ils interagissent avec des protéines Argonaute (AGO) pour former le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex), qui ensemble peuvent inhiber la traduction en bloquant la progression des ribosomes, soit entraîner la dégradation de l'ARNm cible. La dégradation de cet ARNm est initiée par le recrutement du complexe CCR4-NOT (ce mécanisme sera décrit plus en détail dans la revue en section 6).

## 4. La traduction

La traduction, l'une des étapes majeures de l'expression des gènes, se déroule en plusieurs phases et implique de nombreux facteurs, dont le principal est le ribosome, qui joue un rôle essentiel dans la synthèse des protéines. Le ribosome est constitué de deux sous-unités : une petite et une grande. Chez la levure *S. cerevisiae*, la petite sous-unité 40S contient 33 protéines et l'ARN ribosomique 18S (ARNr). Elle s'associe à la grande sous-unité 60S, composée de 46 protéines ainsi que des ARNr 5S, 5.8S et 25S (28S chez l'homme), pour former un ribosome 80S.

Le processus de traduction se déroule en trois étapes principales : initiation, élongation et terminaison/recyclage du ribosome. L'initiation commence par la formation d'un complexe constitué de divers facteurs et de la sous-unité 40S du ribosome. Ce complexe balaye l'ARNm jusqu'à la reconnaissance du codon initiateur AUG, ce qui entraîne la formation du ribosome 80S. L'élongation suit, où les acides aminés sont apportés par des aminoacyl-ARNt, puis incorporés un à un dans la chaîne peptidique en formation, selon la séquence codée par l'ARNm. Enfin, la terminaison intervient lorsque le ribosome rencontre un codon d'arrêt sur l'ARNm, généralement UAA, UAG, ou UGA, stoppant ainsi l'élongation et libérant la chaîne polypeptidique. Une étape supplémentaire intervient après la terminaison, où les sous-unités ribosomiques sont recyclées pour être réutilisées dans de futurs cycles de traduction.

Le ribosome contient trois sites importants à l'interface de ses deux sous-unités : le site A (aminoacyl), le site P (peptidyl) et le site E (exit) (Figure 2). Le site A est responsable de l'entrée de l'ARNt chargé avec un acide aminé, également nommé aminoacyl-ARNt. Le site P catalyse la formation de la liaison peptidique, reliant ainsi l'acide aminé apporté par l'ARNt à la chaîne polypeptidique naissante. Le site E, quant à lui, maintient l'ARNt désacétylé avant qu'il ne quitte le ribosome. La grande sous-unité du ribosome contient également un tunnel par lequel le polypeptide en croissance s'étend avant d'atteindre le cytoplasme. Ce tunnel est juxtaposé au centre peptidyl transférase, qui catalyse la formation des liaisons peptidiques. La petite sous-unité, avec son site de décodage, facilite l'association entre le codon de l'ARNm et l'anticodon de l'aminoacyl-ARNt, assurant ainsi une traduction précise en fonction du code génétique. Ce dernier décode l'un après l'autre l'ensemble des triplets de nucléotides de l'ARNm, appelé codon, qui vont définir un acide aminé. Plusieurs triplets peuvent correspondre à un même acide aminé : le code est dégénéré.

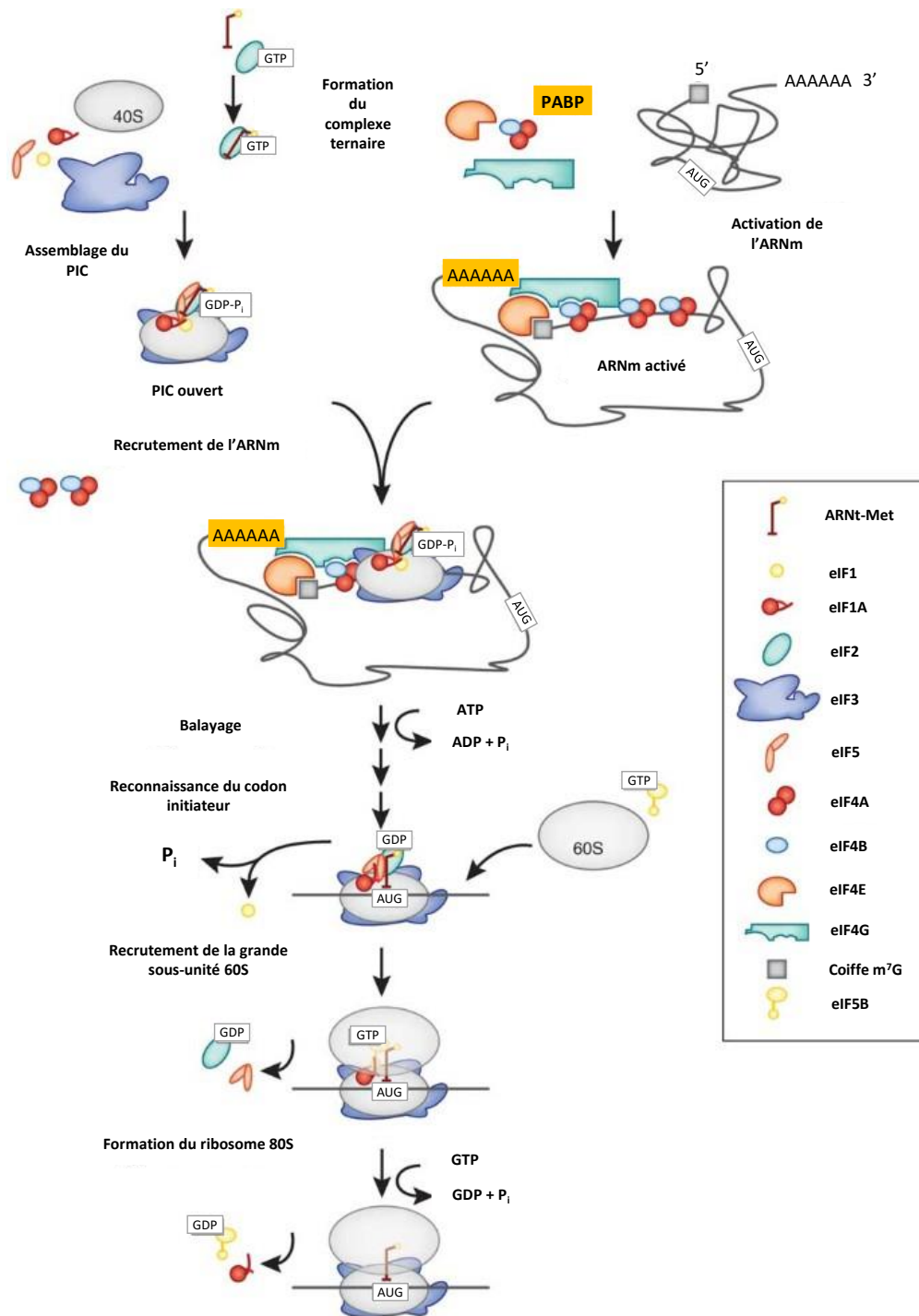


**Figure 2: Représentation schématique des sites importants du ribosome lors de la traduction avec la reconnaissance codon/anti-codon.**

#### 4.1. L'initiation de la traduction

L'initiation de la traduction conduit à l'assemblage de la petite et de la grande sous-unité ribosomique pour former un ribosome fonctionnel (Figure 3). Ce processus commence par la formation d'un complexe ternaire composé du facteur d'initiation eucaryote (eIF) eIF2, d'un méthionyl-ARNt initiateur (iARNt-Met) et d'une molécule de GTP (Aitken et Lorsch 2012). Ce complexe est ensuite recruté à la sous-unité ribosomique 40S avec l'aide d'autres facteurs d'initiation tels que eIF1, eIF1A, eIF3 et eIF5 pour constituer le complexe de pré-initiation 43S (PIC). L'assemblage du complexe dans une conformation ouverte est maintenu par eIF1 et eIF1A afin de permettre le recrutement de l'ARNm. En parallèle, avant d'être recruté, l'ARNm est pré-activé par la liaison d'eIF4E à la coiffe  $m^7G$ . Un autre facteur, eIF4G, va avoir un rôle d'ossature en se liant à eIF4A (hélicase), eIF4B, eIF4E et PABP (Passmore et Coller 2022). L'ensemble de ce complexe forme une conformation de boucle qui stimule le recrutement du PIC à la coiffe  $m^7G$  de cet ARNm pré-activé pour former le 48S.

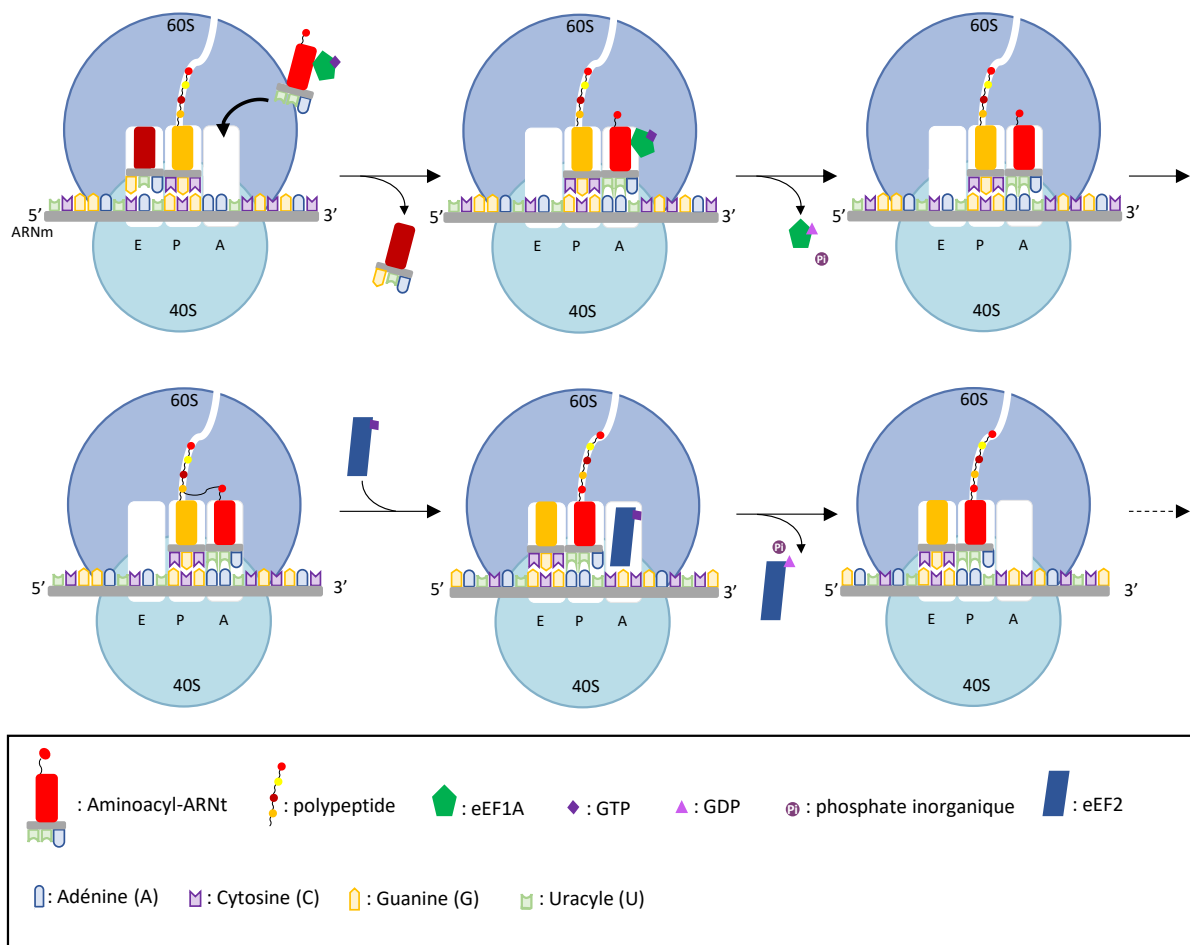
Cet assemblage permet l'entrée de l'ARNm dans un canal de la sous-unité 40S du ribosome, où débute le balayage de la 5'UTR jusqu'à la reconnaissance du codon initiateur, très généralement AUG. Une fois que le PIC identifie l'AUG, eIF1 se dissocie, déclenchant l'hydrolyse du GTP associé au complexe ternaire eIF2. Cette hydrolyse entraîne la dissociation d'eIF2-GDP, d'un phosphate inorganique et d'eIF5 marquant la fin de la phase de balayage. Cette dissociation est favorisée par la GTPase eIF5B-GTP, qui permet le remplacement de ces facteurs par le recrutement de la grande sous-unité ribosomique 60S au niveau du codon d'initiation de la traduction. Une fois les deux sous-unités assemblées, eIF5B hydrolyse son GTP, provoquant un changement conformationnel du ribosome 80S. Cette modification structurelle induit la dissociation d'eIF5B, dont l'affinité pour le complexe diminue lorsqu'il est lié au GDP, suivie de la dissociation d'eIF1A. Cette dernière étape marque la formation finale du ribosome 80S prêt à initier la phase d'élongation (Aitken et Lorsch 2012).



**Figure 3 : Représentation schématique de l'initiation de la traduction.**  
Schéma adapté de (Aitken et Lorsch 2012)

## 4.2. L'élongation de la traduction

L'élongation se caractérise par l'ajout séquentiel d'acides aminés à la chaîne polypeptidique en cours de formation (Dever et Green 2012; Dever, Dinman, et Green 2018). Ce processus comprend trois étapes essentielles : le recrutement de l'aminoacyl-ARNt, la formation de la liaison peptidique et la translocation (Figure 4). Après l'assemblage du ribosome 80S, le facteur d'élongation eucaryote 1A (eEF1A), qui possède une activité GTPase, forme un complexe avec le GTP et un aminoacyl-ARNt. Ce complexe permet la livraison d'aminoacyl-ARNt au site A du ribosome. En effet, une fois dans le ribosome, l'aminoacyl-ARNt positionne sa boucle anti-codon pour s'apparier avec le codon complémentaire de l'ARNm. Lorsque cet appariement est correct, eEF1A hydrolyse le GTP, libérant ainsi eEF1A-GDP, et un phosphate inorganique, du ribosome, ce qui permet à l'aminoacyl-ARNt de se positionner dans le site A du ribosome. La chaîne peptidique en cours de synthèse, attachée à un peptidyl-ARNt dans le site P, est reliée par une liaison peptidique au nouvel acide aminé porté par l'aminoacyl-ARNt dans le site A, formant ainsi un nouveau peptidyl-ARNt dans le site A et un ARNt désamino-acétylé dans le site P. Ensuite, des changements de conformation entre les deux sous-unités ribosomales facilitent la translocation du ribosome. En effet, le recrutement du facteur d'élongation eEF2-GTP au site A, suivi de son hydrolyse, permet à la petite sous-unité du ribosome de se déplacer de trois nucléotides et de s'aligner à un nouveau codon. Ce déplacement induit, au niveau de la grande sous-unité, la formation d'un état hybride et le décalage des ARNt initialement situés dans les sites A et P vers les sites P et E, respectivement. L'ARNt désamino-acétylé se retrouve alors dans le site E, tandis que le peptidyl-ARNt se positionne dans le site P, libérant ainsi le site A pour un nouveau cycle d'élongation. Ce processus se répète jusqu'à ce qu'un codon stop soit rencontré, déclenchant la terminaison de la traduction.



**Figure 4 : Représentation schématique de l'élongation de la traduction.**

### 4.3. La terminaison de la traduction et le recyclage des ribosomes

La terminaison de la traduction se produit lorsqu'un des codons stop (généralement UAA, UGA ou UAG) atteint le site A du ribosome. Le facteur eucaryote de terminaison eRF1 reconnaît ces codons stop grâce à sa structure en forme d'ARNt et à un motif NIKS (Asn-Ile-Lys-Ser) spécifique. De plus, eRF1 possède un motif GGQ (Gly-Gly-Gln), essentiel pour l'hydrolyse du peptidyl-ARNt. eRF1 forme un complexe avec eRF3, une GTPase, et du GTP. Lorsque eRF1 est positionné dans le site A, l'activité GTPase d'eRF3, entraîne la libération de GDP, d'eRF3, et permet le positionnement adéquat du motif GGQ d'eRF1. L'ATPase Rli1 (chez la levure) ou son homologue ABCE1 (chez les mammifères) est recruté pour guider le placement du motif dans le centre peptidyl transférase, ce qui conduit à l'hydrolyse du peptidyl-ARNt. Cette étape libère le peptide synthétisé du ribosome et entraîne également la dissociation des deux sous-

unités ribosomales qui sont ensuite recyclées afin d'être utilisées pour un autre cycle de traduction (Dever et Green 2012).

#### **4.4. Les polysomes**

A mesure que le premier ribosome progresse le long de l'ARNm, d'autres ribosomes peuvent se fixer successivement au niveau du codon initiateur pour traduire le même ARNm (Warner et Knopf 2002). Les assemblages où plusieurs ribosomes traduisent simultanément un même ARNm sont appelés polyribosomes ou polysomes. La possibilité de charger plusieurs ribosomes simultanément sur un ARNm augmente la quantité de protéines produites par copie d'ARNm pour une unité de temps définie. Plusieurs facteurs influencent la formation de ces polysomes. Tout d'abord, la taille de la séquence codante, l'ORF (*Open Reading Frame*), joue un rôle crucial dans la capacité à former des polysomes. En effet, un ARNm avec une ORF de très petite taille ne permet pas la formation efficace de polysomes du fait de contraintes stériques car plusieurs ribosomes ne peuvent être présents simultanément sur la phase codante. En revanche, plus un ARNm a une ORF de grande taille, plus il peut accueillir de ribosomes, favorisant ainsi la formation de très grands polysomes. Le rapport entre la vitesse d'initiation et celle de l'élongation est un autre paramètre déterminant. Si l'initiation est lente, le premier ribosome aura parcouru une grande partie de l'ARNm avant que d'autres ribosomes ne se fixent, limitant ainsi la formation de polysomes. Il est important de rappeler que l'initiation est l'étape limitante de la traduction, ce qui impacte directement l'efficacité de la formation de polysomes.

#### **4.5. Les chaperonnes associées aux protéines naissantes en cours de traduction**

Durant la synthèse du polypeptide naissant, celui-ci sort à travers un tunnel de sortie spécifique situé au niveau de la grande sous-unité du ribosome (Deuerling et Bukau 2004). Les protéines naissantes atteignent l'extérieur du ribosome lorsqu'elles mesurent 35 à 40 acides aminés. À la sortie du tunnel, plusieurs protéines interagissent avec le polypeptide naissant. Ces protéines sont principalement des chaperonnes génériques ou spécifiques qui facilitent le repliement co-translationnel mais aussi des facteurs de maturation qui modifient le peptide

naissant (Deuerling et Bukau 2004; Preissler et Deuerling 2012). Leur activité ATPase leur permet de fournir l'énergie nécessaire pour stabiliser les protéines en cours de repliement et éviter les repliements incorrects (Hartl, Bracher, et Hayer-Hartl 2011). Pour certaines protéines faisant partie de complexes, des domaines de la protéine naissante peuvent aussi s'associer à ses partenaires alors que leur synthèse n'est pas terminée. Dans ce cas, les chaperonnes vont avoir un rôle de protection en empêchant l'exposition par exemple de surfaces hydrophobes, qui pourraient provoquer des agrégations dans le cytoplasme. En interagissant avec ce type de surface jusqu'à ce que la protéine soit complètement synthétisée, les chaperonnes permettent à la protéine de se replier correctement lorsqu'elle est prête.

Si le peptide naissant ne parvient pas à se replier correctement, il devient susceptible de s'agréger, ce qui peut entraîner sa dégradation ou la formation d'agrégats stables dont certains sont impliqués dans des pathologies. Pour prévenir ces agrégations et assurer la fonctionnalité des protéines, les chaperonnes jouent un rôle crucial en assistant et surveillant leur bon repliement. Si une protéine ne parvient pas à adopter une conformation correcte, malgré l'assistance des chaperonnes, elle est fréquemment reconnue comme défectueuse et peut être ciblée pour être dégradé par le protéasome. Ce mécanisme de surveillance prévient l'accumulation de protéines mal repliées, dont l'agrégation pourrait être toxiques pour la cellule. Ainsi, les chaperonnes contribuent à l'homéostasie cellulaire en maintenant l'intégrité du protéome.

L'agrégation des protéines peut être ainsi due à un mauvais repliement, l'absence de chaperonnes, à l'exposition de surfaces hydrophobes, mais aussi à des conditions de stress cellulaire ou à une concentration protéique trop élevée. Chez les eucaryotes, plusieurs complexes ont été identifiés comme interagissant avec le ribosome et aidant au repliement des protéines naissantes (Gamerding 2016). Dans les sections suivantes, les complexes de levures seront principalement décrits. Des chaperonnes homologues sont généralement trouvées chez les autres eucaryotes.

#### **4.5.1. Le complexe associé au ribosome (RAC)**

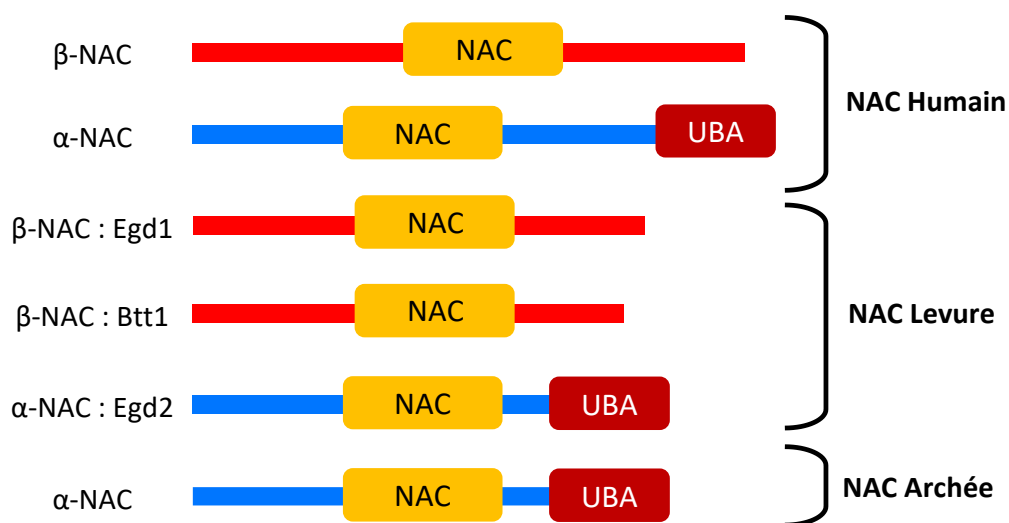
Le complexe associé au ribosome (RAC), chez la levure, est principalement composé des chaperonnes Zuotone, appelée également Zuo1 (Hsp40) et Ssz1 (Hsp70), et fonctionne en tandem avec d'autres chaperonnes Ssb1 ou Ssb2 (Hsp70), pour coordonner le repliement co-translationnel des protéines naissantes (Gautschi et al. 2001; Preissler et Deuerling 2012). Zuo1 possède un domaine J qui stimule l'activité ATPase des protéines Ssb. La chaperonne Ssz1, quant à elle, possède un domaine C-terminal qui lui permet d'interagir avec les protéines naissantes à la sortie du tunnel. L'activité du complexe RAC dépend de la présence conjointe de tous ces facteurs. De plus, pour faciliter l'interaction avec les protéines naissantes, les chaperonnes Zuo1 et Ssb se lient directement au ribosome, stabilisant ainsi le complexe RAC à la sortie du tunnel du ribosome (Peisker, Chiabudini, et Rospert 2010; Y. Zhang et al. 2014). Ce complexe RAC est évolutivement conservé de la levure à l'humain, bien que chez les mammifères, le complexe RAC (mRAC) soit composé des homologues de la Zuotone et de Ssz1, MPP11 et Hsp70L1, respectivement, mais sans les protéines Ssb (Otto et al. 2005).

#### **4.5.2. Le complexe associé au polypeptide naissant (NAC)**

Le complexe associé au polypeptide (NAC) a été décrit agir comme un bouclier moléculaire, protégeant les chaînes polypeptidiques nouvellement synthétisées des interactions non spécifiques avec d'autres facteurs. Ce complexe est essentiel et évolutivement conservé, des eucaryotes aux archées. Chez les eucaryotes, le NAC est un hétérodimère composé des sous-unités  $\alpha$ -NAC et  $\beta$ -NAC (Spreter, Pech, et Beatrix 2005) (Figure 5). En revanche, chez les archées, il forme un homodimère constitué de deux sous-unités  $\alpha$ -NAC (Y. Liu et al. 2010). Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  chez les eucaryotes partagent un domaine NAC central, essentiel à leur hétérodimérisation, qui adopte une structure en tonneau  $\beta$  (Y. Liu et al. 2010). En plus de ce domaine central, ces deux sous-unités présentent des extensions aux extrémités N-terminales et C-terminales. L'extrémité C-terminale de la sous-unité  $\alpha$ -NAC possède un domaine UBA (Ubiquitin-Associated). Ces domaines sont couramment observés dans les protéines impliquées dans les voies de dégradation des protéines et interagissent souvent avec

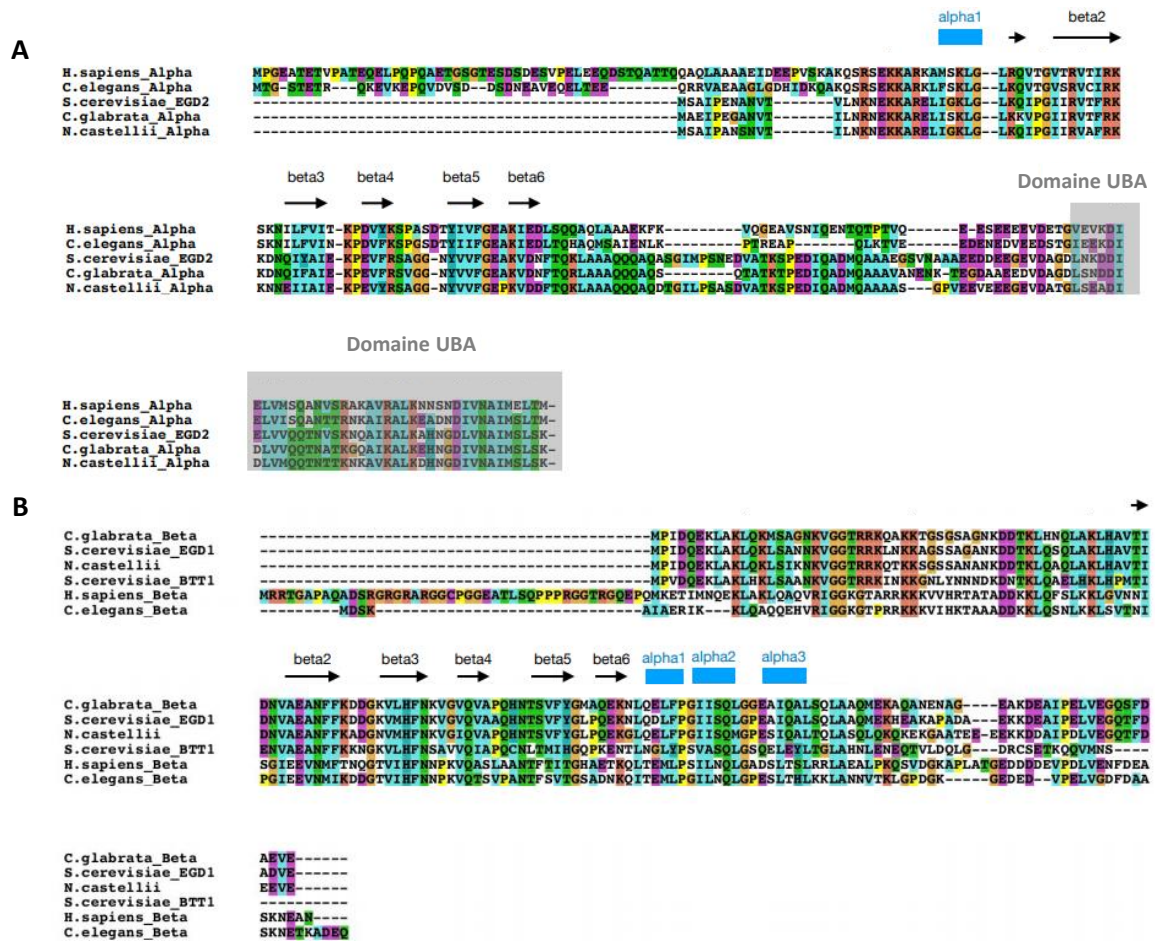
l'ubiquitine (Raasi et Pickart 2003). Les fonctions des extrémités seront décrites plus en détails plus loin dans cette section.

Chez la levure, les gènes *EGD1* et *BTT1*, codent pour deux variants de la sous-unité  $\beta$ -NAC (Figure 5 et 6). Par conséquent, le NAC chez la levure existe sous deux formes distinctes, en fonction de l'hétérodimérisation de la sous-unité  $\alpha$ -NAC, codée par *EGD2*, avec l'une des sous-unités  $\beta$ -NAC alternatives. Ces complexes sont nommés  $\text{NAC}^{\text{Egd1}}$  et  $\text{NAC}^{\text{Btt1}}$ .  $\text{NAC}^{\text{Egd1}}$  représente la forme canonique du complexe, Egd1 étant la sous-unité  $\beta$ -NAC la plus abondante, présente dans environ 95 % des NAC (Reimann et al. 1999). Egd1 est une protéine de 157 acides aminés, partageant 46 % d'identité avec Btt1, une protéine composée de 149 résidus. Les extensions N-terminales d'Egd1 et de Btt1 montrent une forte similarité (68 % d'identité), tandis que le domaine NAC est légèrement moins conservé (56 % d'identité). Les extensions C-terminales sont les plus divergentes, avec une différence de longueur de 8 résidus et une identité de séquence de seulement 36 %.



**Figure 5 : Représentation des domaines structuraux du complexe NAC.**

Organisation des domaines du NAC, chez l'humain, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et chez les archées. En jaune, le domaine conservé NAC et en rouge foncé le domaine associé à l'ubiquitine (UBA). En bleu la sous-unité  $\alpha$ -NAC et en rouge la sous-unité  $\beta$ -NAC.

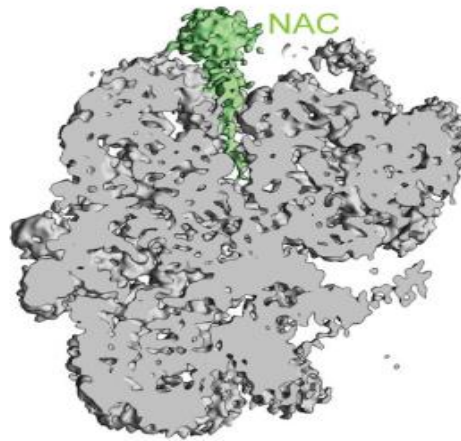


**Figure 6 : Alignement des séquences des sous-unités  $\alpha$ -NAC et  $\beta$ -NAC.**

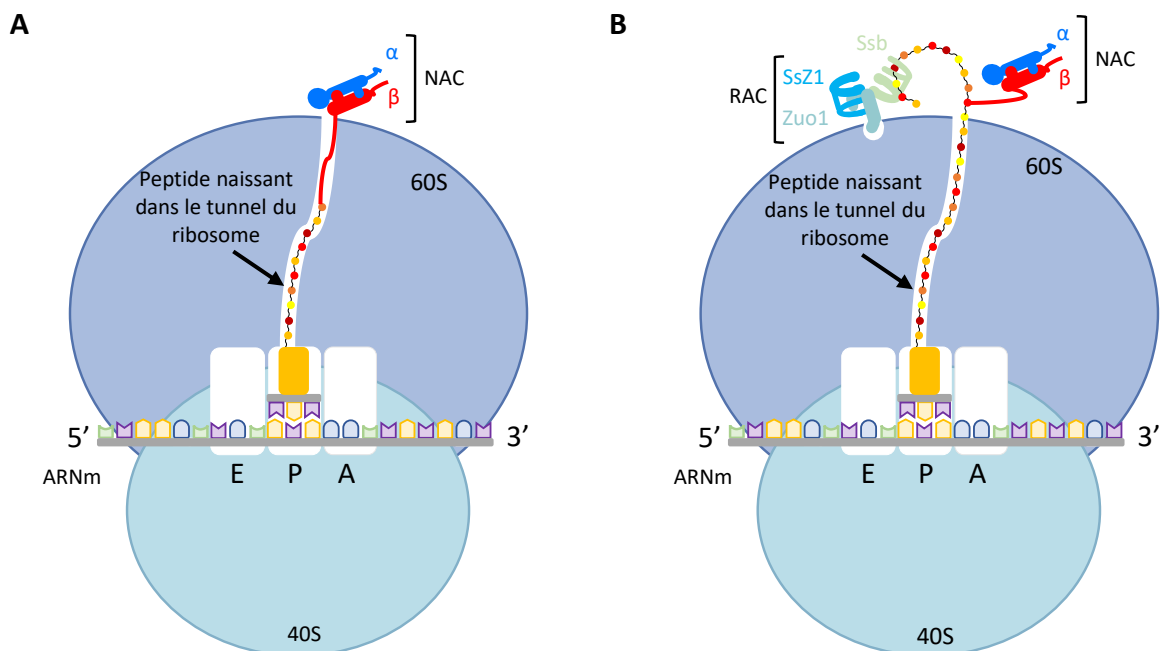
Alignement des homologues de Egd2 (A) et de Egd1 avec Btt1 (B) provenant de différentes espèces, réalisé avec le logiciel CLUSTAL. Notez que les structures secondaires (alpha en bleu et bêta en noir) ont été annotées le long de la séquence.

L'interaction du NAC avec le ribosome a été analysée par cryo EM chez *C. elegans*. Cette analyse a mis en évidence une association des sous-unités  $\alpha$ -NAC et  $\beta$ -NAC avec plusieurs protéines ribosomiques situées près de l'entrée du tunnel de sortie du ribosome. De plus, l'extension N-terminale de  $\beta$ -NAC s'insère profondément dans ce tunnel, interagissant directement avec le peptide naissant lorsqu'il atteint une longueur de 10 à 25 résidus (Gamerding et al. 2019) (Figure 7). Au fur et à mesure de l'élongation de la chaîne polypeptidique, l'extrémité N-terminale de  $\beta$ -NAC est progressivement expulsée du tunnel, entraînant le repositionnement du complexe NAC. La liaison initiale du NAC au ribosome empêche d'autres facteurs de s'y fixer, tels que le complexe RAC (Gamerding et al. 2019) (Figure 8). Ainsi, au fur et à mesure que la chaîne polypeptidique s'allonge, le déplacement du

NAC vers la sortie permet alors l'accès à l'ensemble de ces facteurs, facilitant la poursuite de la maturation des protéines en cours de synthèse (Y. Zhang et al. 2014; Gamerding et al. 2019).



**Figure 7 : Reconstruction cryo EM du NAC de *C. elegans* dans le tunnel ribosomal de la sous-unité 60S (Gamerding et al., 2019)**



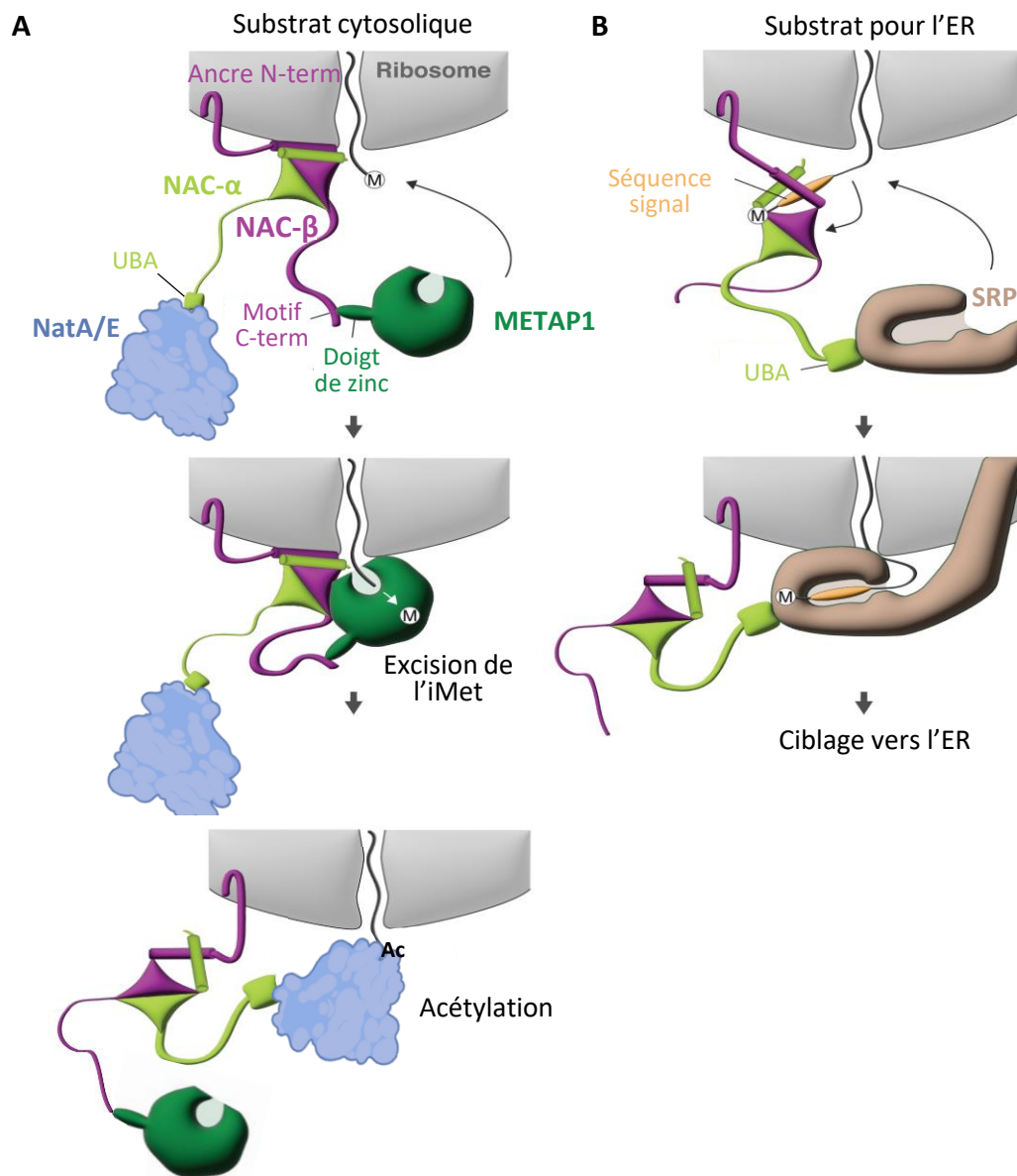
**Figure 8 : Représentation schématique de l'interaction directe de l'extension N-terminale de la sous-unité β-NAC avec le peptide naissant dans le tunnel du ribosome.**

(A) L'interaction du NAC avec le peptide naissant dans le tunnel du ribosome pendant l'élongation. (B) L'interaction du NAC et du RAC avec le peptide naissant, après que le NAC a été repoussé du tunnel par la chaîne peptidique en cours de synthèse.

Deux études récentes chez l'homme ont permis de clarifier le rôle de l'association du NAC au ribosome (Gamerdinger et al. 2023; Lentzsch et al. 2024). Le NAC facilite le recrutement de deux enzymes au niveau du peptide naissant à la sortie du tunnel du ribosome (Figure 9A). Tout d'abord, l'extension C-terminale de la sous-unité  $\beta$ -NAC recrute la méthionine aminopeptidase, METAP1 (Map1 chez la levure), une protéase qui élimine la méthionine initiatrice (iMet) en N-terminal du peptide synthétisé. De plus, le domaine UBA de la sous-unité  $\alpha$ -NAC recrute une N-acétyltransférase, NatA/E. NatA acétyle l'extrémité N-terminale de certains acides aminés après l'excision de la méthionine par METAP1. Certaines NatA possèdent une sous-unité catalytique supplémentaire, qui confère une activité NatE, spécifique pour l'acétylation de l'iMet. La sous-unité  $\alpha$ -NAC contient également un domaine globulaire, nommé H2, qui interagit avec l'acétylase et positionne son site catalytique NatA/E à proximité de la sortie du tunnel du ribosome. Une fois les enzymes positionnées, METAP1 excise l'iMet et NatA acétyle l'extrémité N-terminale du peptide naissant. Le domaine UBA de la sous-unité  $\alpha$ -NAC a un second rôle (Figure 9B). En effet, lorsqu'un signal ciblant le réticulum endoplasmique est présent, le NAC se dissocie de la protéine naissante et par son domaine UBA recrute la particule SRP (complexe de reconnaissance du signal) pour que la protéine naissante soit envoyée au réticulum endoplasmique (Gamerdinger et al. 2023).

Chez *S. cerevisiae*, plusieurs orthologues de ces facteurs sont présents. Tout d'abord, la N-acétyltransférase NatA/E est également appelée NatA chez la levure. NatA est composé de trois sous-unités : Nat1p (Naa15), Ard1p (Naa10) et Nat5p (Naa50). Contrairement à l'humain, NatA chez la levure n'est pas recruté par le NAC au ribosome (Gautschi et al. 2003). En effet, sa sous-unité Nat1p est directement ancrée dans le ribosome, ce qui permet la N-acétylation du peptide naissant à la sortie du tunnel du ribosome (Knorr et al. 2019). De plus, la perte de l'activité de NatA chez *S. cerevisiae* induit la dégradation de certaines protéines ribosomales, indiquant un rôle important de NatA dans le contrôle de la stabilité des protéines, notamment ribosomales (Takakura et al. 1992; Guzman et al. 2023). Ensuite, la méthionine aminopeptidase, Map1, se lie également à la sortie du tunnel du ribosome, indépendamment du NAC et de la chaîne peptidique, chez la levure (Vetro et Chang 2002). Il a été suggéré que le positionnement de Map1 sur le ribosome chevauche celui d'autres

chaperonnes telles que NAC et RAC. De manière intéressante, Map1 agit en tandem avec une autre N-acétyltransférase, NatB, à la sortie du tunnel du ribosome, indiquant une conservation du mécanisme humain, excepté le fait que le NAC ne joue pas de rôle dans leur recrutement (Knorr et al. 2023).



**Figure 9 : Représentation schématique du rôle du NAC humain.**

(A) Recrutement des enzymes METAP1 et NatA/E par NAC au peptide naissant. (B) Reconnaissance d'une séquence signal dans le peptide naissant par le NAC qui permet le recrutement du SRP pour envoyer la protéine au réticulum endoplasmique. Schéma adapté de (Gamerding et al. 2023).

Chez la levure, le rôle du domaine UBA de la sous-unité  $\alpha$ -NAC reste encore incertain. Les domaines UBA sont couramment observés dans les protéines impliquées dans les voies de dégradation des protéines et interagissent souvent avec l'ubiquitine (Raasi et Pickart 2003). Dans certains contextes, comme chez la protéine Rad23, les domaines UBA peuvent entrer en compétition avec la liaison des substrats ubiquitinés par le protéasome, bloquant ainsi la dégradation des protéines modifiées (Raasi et Pickart 2003). Il est donc possible que le NAC joue un rôle similaire, en modulant l'interaction des protéines naissantes qui ne sont pas encore repliées.

#### **4.5.3. Les chaperonnes dédiées aux protéines ribosomales**

Parmi l'ensemble des chaperonnes, certaines sont spécifiquement dédiées aux protéines ribosomales, assurant un rôle crucial dans leur repliement correct et leur intégration dans les sous-unités ribosomiques en cours d'assemblage (Pillet et al. 2017). Ces chaperonnes spécialisées protègent les protéines ribosomales de l'agrégation et de la dégradation, tout en guidant leur transport depuis le cytoplasme vers le nucléole et leur incorporation dans les ribosomes naissants. Par exemple, chez la levure, la chaperonne Acl4, qui sera importante pour la suite du manuscrit, est essentielle pour le repliement de la protéine ribosomique Rpl4. Acl4 assure à la fois le repliement de Rpl4 et son acheminement du cytoplasme vers le noyau, où se situe le site d'assemblage du pré-60S (Pillet et al. 2015). La protéine Rpl4 est l'une des premières à intégrer la grande sous-unité du ribosome (60S) au cours de son assemblage. Il convient de noter que la délétion d'Acl4 ralentit fortement la croissance de la levure, soulignant à quel point ces chaperonnes dédiées aux protéines ribosomales sont cruciales pour un assemblage efficace des ribosomes, un processus indispensable à la multiplication rapide des cellules. D'autres exemples de chaperonnes dédiées aux protéines ribosomiques sont présentées dans le tableau 1 (liste non exhaustive).

Chaperonnes dédiées	Tsr2	Yar1	Acl4	Rrb1	Sqt1	Syo1
Protéine ribosomale associée	Rps26 (eS26)	Rps3 (uS3)	Rpl4 (uL4)	Rpl3 (uL3)	Rpl10 (uL16)	Rpl5 (uL18) Rpl11 (uL5)
Phénotype du mutant	Croissance réduite fortement	Croissance réduite fortement à faible température	Croissance réduite fortement	Létale	Létale	Croissance réduite à faible température
Orthologues humain	hTSR2	Pas d'orthologue évident	Pas d'orthologue évident	GRWD1 (Glutamate-Rich WD-Repeat Containing 1)	AMP (Angio-Associated Migratory Cell Protein)	HEATR3 (HEAT repeat-containing protein 3)

**Tableau 1 : Caractéristiques des chaperonnes dédiées aux protéines ribosomiques chez la levure avec leurs orthologues chez l'humain.**

Tableau adapté de (Pillet et al. 2017)

## 5. La dégradation des ARN

Au cours de sa vie, une cellule s'adapte à des conditions changeantes afin de maintenir son homéostasie. Pour cela, les cellules régulent l'expression des gènes à différents niveaux, notamment la transcription, la traduction, et la dégradation de l'ARNm, ce qui permet d'ajuster les niveaux d'ARN et/ou de protéines en fonction des besoins. La dégradation de l'ARNm est cruciale pour le renouvellement des ARNm, car les cellules dégradent constamment certains ARNm préexistants tandis que de nouveaux sont produits, ce qui maintient le contenu cellulaire global à un niveau relativement constant. Par ailleurs, la dégradation des ARNm élimine également des transcrits aberrants généralement présents à des niveaux faibles : ce sont les voies de contrôle de qualité. Qu'ils soient aberrants ou « normaux », la dégradation des ARNm peut être modulée par la localisation des transcrits ou des facteurs impliqués dans leur digestion. Finalement, outre la dégradation des ARNm, tous les autres ARN sont également dégradés, mais ces processus ne seront pas décrits ici.

### **5.1. La dégradation des ARNm non-aberrants**

Chez les eucaryotes, le renouvellement de l'ARNm se produit principalement par deux grandes voies de dégradation, chacune comprenant plusieurs étapes, qui seront décrites dans ce chapitre et représentés dans la Figure 10. Dans la plupart des cas, la première étape est commune et correspond au raccourcissement de la queue poly(A) de l'ARNm, une réaction appelée déadénylation. Ensuite, l'ARNm peut être dégradé soit par la voie 5' vers 3', ou soit par la voie 3' vers 5'.

La dégradation des ARNm peut se produire de manière passive après plusieurs cycles de traduction, mais elle peut également être déclenchée activement, souvent de manière co-traductionnelle. Dans ce cas, des protéines spécifiques sont recrutées pour induire la dégradation de l'ARNm avant même que la traduction ne soit terminée. Ces différents facteurs sont pour la plupart décrits en détail dans la revue (section 6). Ce processus contrôlé permet de réguler précisément la durée de vie des ARNm en fonction des besoins cellulaires.

De plus, des études récentes ont montré que la séquence des codons au sein de l'ARNm influence directement sa demi-vie (Presnyak et al. 2015). Certains codons, ou combinaisons de codons, peuvent ralentir ou accélérer la dégradation de l'ARNm, en modulant le recrutement des facteurs de dégradation. Ainsi, la stabilité d'un ARNm dépend non seulement de signaux de régulation externes, mais aussi de la composition du codon, conférant un niveau supplémentaire de régulation à l'expression des gènes.

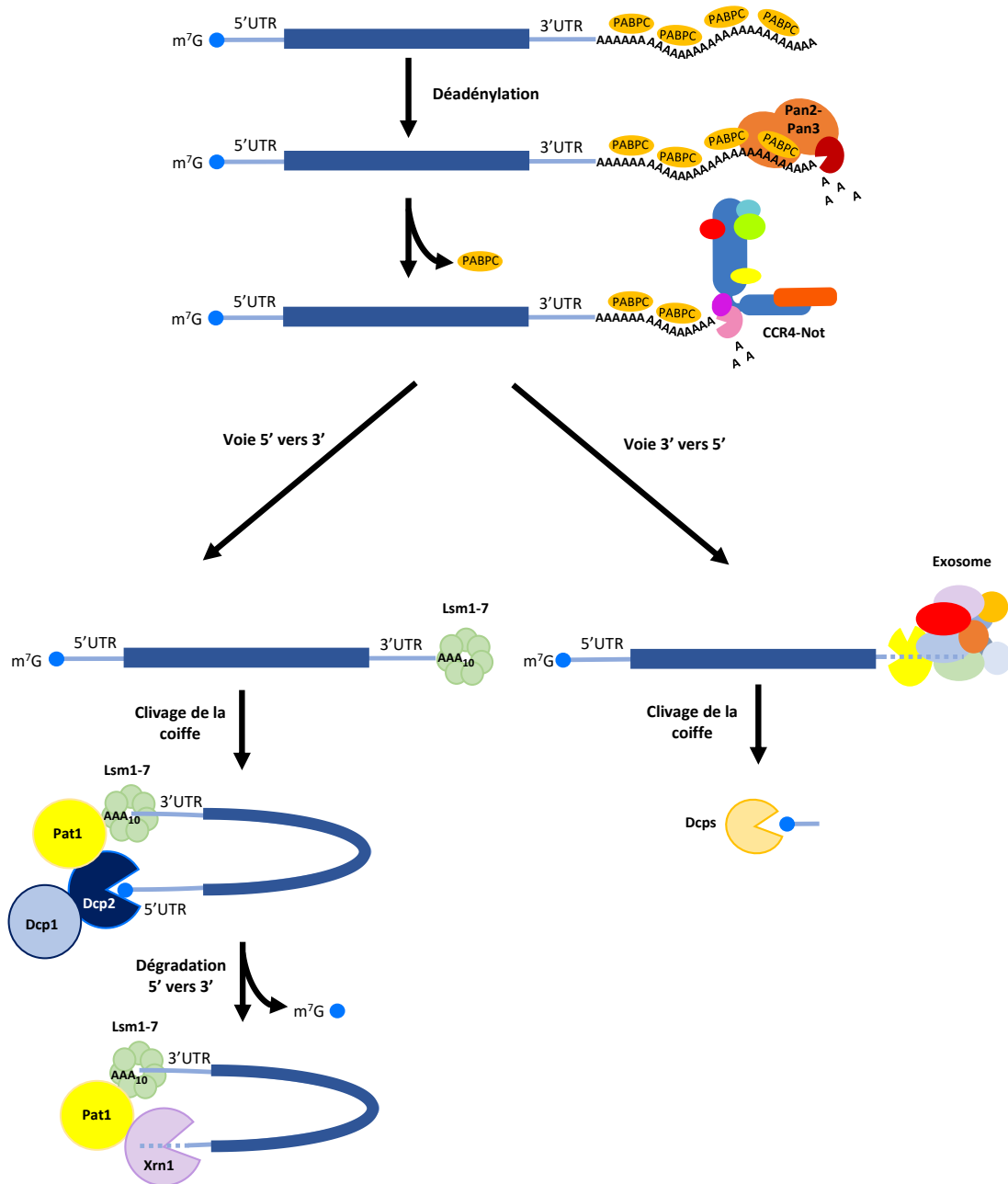
#### **5.1.1. La déadénylation**

Le raccourcissement de la queue poly(A), appelé déadénylation, est généralement la première étape de la dégradation des ARNm. Ce processus est catalysé par différentes enzymes, connues de manière générique sous le nom de déadénylases. Ces enzymes sont des exoribonucléases qui dégradent l'ARNm de l'extrémité 3' vers 5' en éliminant les résidus adénosine un par un. Elles dépendent de la présence d'ions métalliques divalents, principalement le magnésium, pour leur activité catalytique. Les déadénylases se divisent en deux catégories : les DEDD (Asp-Glu-Asp-Asp) et les EEP (exonucléase-endonucléase-phosphatase).

Les données actuelles indiquent que la déadénylation commence dans le cytoplasme par l'action du complexe Pan2-Pan3, qui initie la dégradation de la queue poly(A) à l'extrémité 3' de l'ARNm (Passmore et Collier 2022). Pan2 est une exoribonucléase de type DEDD/RNase D, qui reconnaît spécifiquement une conformation hélicoïdale simple brin, unique à la queue poly(A). Pan3, qui forme un homodimère, s'associe à une seule copie de Pan2 (Schäfer et al. 2014). Pan3 joue un rôle de protéine d'échafaudage et facilite le recrutement du complexe sur la queue poly(A) (Krempl, Lazzaretti, et Sprangers 2023). En effet, grâce à son domaine en doigt de zinc, Pan3 se lie spécifiquement aux adénosines, une interaction renforcée par la liaison de son motif PAM2 à un domaine MLLE dans la région C-terminale de PABP (Schäfer et al. 2019). PABP a ainsi à la fois un rôle de protection de la queue poly(A) (Ford, Bagga, et Wilusz 1997) mais aussi dans sa dégradation, car PABP stimule sa déadénylation par le recrutement du complexe Pan2-Pan3 (Caponigro et Parker 1995; Uchida, Hoshino, et Katada 2004). Le complexe Pan2-Pan3 reconnaît l'interface d'oligomérisation de PABP, suggérant qu'il est recruté plus favorablement sur des queues poly(A) longues, capables d'accueillir plusieurs Pab1 (Schäfer et al. 2019). Plusieurs études génétiques et biochimiques chez la levure et avec des cellules mammifères, ont montré que lorsque la queue est raccourcie entre 20 et 110 adénosines (suivant les espèces), la déadénylation se poursuit par l'action du complexe CCR4-NOT (Yamashita et al. 2005).

Chez la plupart des organismes, le complexe CCR4-NOT contient deux sous-unités avec des activités déadénylases, Ccr4 et Caf1. Caf1 possède un domaine DEDD, tandis que Ccr4 contient un domaine EEP. Ces domaines sont responsables de leur activité exoribonucléolytique. Chez *S. cerevisiae*, certains des résidus catalytiques de Caf1 ont été substitués, ce qui fait que l'activité principale de déadénylation est exécutée par le domaine EEP de Ccr4. Chez les métazoaires, des études ont suggéré que ces deux déadénylases ont des rôles distincts : Caf1 dégraderait les queues poly(A) dépourvues de PABPC et serait bloquée par la liaison avec cette dernière, tandis que Ccr4 dégraderait activement les queues poly(A) liées par les PABPC (Webster et al. 2018). Cependant, cette question est débattue en raison de résultats contradictoires : par exemple, les résultats obtenus par notre équipe ne montrent pas de ralentissement notable de la déadénylation effectuée in vitro par la protéine CAF1 humaine lorsque PABPC est présent (Stupfler et al. 2016).

Ainsi, l'activité de déadénylation semble pouvoir être assurée par Ccr4 et Caf1, sauf chez certains organismes. En effet, chez la levure Caf1 a au mieux une contribution modeste alors que chez le trypanosome, Ccr4 est absent. Cependant, chez la souris, l'inactivation du gène CNOT8 codant un des homologues de Caf1 résulte en une léthalité embryonnaire (Quan et al. 2022) tandis que l'inactivation des gènes CNOT6 et CNOT6L qui codent les homologues de Ccr4 sont viables, suggérant un rôle prépondérant de Caf1 (X.-X. Dai et al. 2021).



**Figure 10 : Schéma général des voies principales de la dégradation des ARNm non-aberrants chez les eucaryotes.**

L'association de Caf1 et Ccr4 au sein du complexe CCR4-NOT est essentielle à leur activité (Basquin et al. 2012). Ce complexe sera décrit en détails dans la section 6 du manuscrit.

Lors de la déadénylation, lorsque la queue poly(A) ne contient plus qu'environ 10-15 résidus adénosine, la dégradation de l'ARNm se poursuit par deux voies alternatives (Decker et Parker 1993; Muhlrاد, Decker, et Parker 1995). D'un point de vue mécanistique, l'activation de ces voies s'effectue probablement une fois que la dernière PABP est déplacée de la queue poly(A) devenue trop courte : ceci déprotège l'extrémité 3' de l'ARNm qui devient la cible de facteurs stimulant les étapes ultérieures de la dégradation de cet ARNm. Du point de vue cinétique, la déadénylation est généralement l'étape limitante de la dégradation de l'ARNm, déterminant la vitesse globale de ce processus. De ce fait, elle est l'étape principale de la régulation de la dégradation des ARNm.

### **5.1.2. La dégradation 5' vers 3'**

A la suite de la déadénylation, la principale voie de dégradation de l'ARNm chez la levure est la voie de dégradation 5'-3' (Muhlrاد, Decker, et Parker 1995). Cette voie débute par le recrutement du complexe Lsm1-7 qui va se lier à la queue poly(A) résiduelle dépourvue de PABP, protégeant l'ARN de la dégradation des exonucléases 3'-5' (Sharif et Conti 2013). Par l'intermédiaire de Pat1 (Fourati et al. 2014; Charenton et al. 2017; 2020), les protéines Lsm1-7 vont recruter le complexe de clivage de la coiffe Dcp1-Dcp2 (*decapping enzyme 1-2*). Son rôle est d'hydrolyser la coiffe située à l'extrémité 5' de l'ARNm et sera détaillé plus en détails dans la section suivante. Après que la coiffe en 5' a été éliminée, l'ARNm présente une extrémité 5' déprotégée qui va être ciblée par l'exoribonucléase Xrn1 pour dégrader le corps de l'ARNm.

#### **5.1.2.1. Le clivage de la coiffe**

Au sein du complexe Dcp1-Dcp2, Dcp2 détient l'activité catalytique du clivage de la coiffe tandis que Dcp1 joue un rôle structural. Chez les métazoaires, une protéine additionnelle, Edc4, est nécessaire à la stabilité du complexe. Dcp2 hydrolyse la coiffe m<sup>7</sup>Gppp-ARN en libérant un ARN 5' monophosphate et du m<sup>7</sup>GDP (Wurm et Sprangers 2019). Le clivage de la

coiffe est généralement dépendant de la déadénylation, mais dans certains cas il peut être initié par des mécanismes alternatifs. Le complexe Dcp1-Dcp2 possède une activité relativement faible par lui-même et nécessite le recrutement de plusieurs facteurs pour que le complexe soit pleinement actif.

En effet, outre le complexe Lsm1-7 et Pat1 évoqué ci-dessus, Dcp2 dispose de cofacteurs supplémentaires, appelés « *enhancers* », qui sont nécessaires pour une activation complète. Parmi ces cofacteurs, Edc1, Edc2 et en particulier Edc3 jouent un rôle crucial dans l'activation de Dcp2 (Kshirsagar et Parker 2004). Edc3 est constitué de plusieurs domaines, dont l'un est impliqué dans la liaison avec Dcp2 (Charenton et al. 2016), et un autre dans le recrutement de Dhh1. Ce recrutement peut aussi intervenir au travers d'une interaction de Dhh1 avec Pat1 (Sharif et al. 2013; Fourati et al. 2014). Dhh1, une hélicase de la famille DEAD-box, collabore avec Pat1, avec le complexe Lsm1-7, mais par Pat1, et Edc3 pour faciliter le recrutement de Dcp2 au niveau de la coiffe, afin de stimuler son clivage (J. M. Coller et al. 2001). De plus, Dhh1, Edc3 et Pat1 interviennent dans la répression de la traduction (J. Coller et Parker 2005). Des études ont proposé que Dhh1 couple cette répression de la traduction à la stimulation de la dégradation des ARNm, en reconnaissant spécifiquement des codons non optimaux lorsque la vitesse de traduction est lente (Radhakrishnan et al. 2016). Enfin, des travaux plus récents ont identifié Pby1 comme un autre partenaire direct de Dcp2 (Charenton et al. 2020). Il a été montré que cette interaction est capable de supprimer des défauts de stimulation du clivage de la coiffe.

Pour certains transcrits spécifiques, comme celui codant la protéine ribosomique Rps28b chez la levure, l'activation du clivage de la coiffe peut se faire indépendamment de la déadénylation. En effet, en présence d'un excès de Rps28b, cette protéine se lie à la région 3'UTR de son propre ARNm, permettant via une interaction directe avec Edc3, le recrutement de la machinerie de clivage de la coiffe (Badis et al. 2004; Kolesnikova et al. 2013).

#### **5.1.2.2. Digestion exonucléolytique 5' vers 3'**

Après le clivage de la coiffe, Pat1, en collaboration avec d'autres facteurs, facilite le recrutement de l'exoribonucléase Xrn1, permettant à cette dernière de dégrader l'ARNm sans coiffe dans la direction 5' vers 3' (Charenton et al. 2017). De plus, Xrn1 interagit directement avec l'ARNm à sa sortie du canal du ribosome, jouant ainsi un rôle dans la dégradation co-

traductionnelle des ARNm (Tesina et al. 2019). Cette interaction permet à Xrn1 de dégrader les ARNm en cours de traduction sans interférer avec ce dernier processus.

### **5.1.3. La dégradation 3' vers 5' par l'exosome**

La seconde voie de dégradation de l'ARNm se déroule de l'extrémité 3' vers 5' après la déadénylation. Cette voie est assurée par l'exosome, un complexe conservé chez tous les eucaryotes. L'exosome est constitué d'un corps de neuf sous-unités associé à une sous-unité enzymatique Dis3. D'autres sous-unités optionnelles sont présentes et varient suivant la localisation du complexe (Q. Liu, Greimann, et Lima 2006). Chez la levure, Dis3 est dotée à la fois d'une activité exonucléase 3' vers 5' et d'une activité endonucléase, située dans un domaine particulier PIN, qui adopte un repliement RNase H (Lebreton et al. 2008). En revanche, chez l'homme, deux activités catalytiques sont présentes ou non en fonction de la localisation des orthologues de Dis3 : Dis3L1, localisé dans le cytoplasme, possède une activité exonucléase mais pas endonucléase, tandis que Dis3, localisé dans le noyau, possède les deux activités.

La dégradation du corps de l'ARNm dégradé par l'exosome libère une coiffe dinucléotides m7GpppN qui va être ciblée par une autre enzyme de clivage de coiffe : la « *scavenger decapping enzyme* », DCPS (Dcs1 et/ou Dcs2 chez la levure). Cette pyrophosphatase va catalyser l'hydrolyse de cette coiffe résiduelle pour libérer un monophosphate 7-méthylguanosine (m7GMP) (Hudan Liu et al. 2002; Malys et al. 2004).

## **5.2. Les voies de contrôle qualité des ARNm aberrants**

Le contrôle qualité de l'ARNm est un processus crucial pour assurer l'expression génique en éliminant des transcrits aberrants. En effet, malgré la fidélité de la synthèse ou de la maturation de l'ARNm, ces étapes peuvent être défectueuses, pouvant entraîner la production de protéines toxiques pour les cellules ou l'accumulation de complexes de traduction bloqués. Trois mécanismes de surveillance principaux sont en place pour détecter et dégrader ces ARNm.

### **5.2.1. *No-Go Decay (NGD)***

Le NGD dégrade les ARNm présentant des ribosomes bloqués durant l'élongation, en raison majoritairement de structures secondaires dans l'ARN, de type tige boucle ou pseudo-nœuds mais aussi la présence de région riche en GC ou des bases ARN endommagées (Shoemaker et Green 2012). Ce blocage entraîne une collision de ribosomes. Cette collision est reconnue par plusieurs facteurs et permet le recrutement de Dom34 et Hbs1, qui contribuent à la dissociation des ribosomes, permettant la libération de l'ARNm défectueux et des peptides aberrants pour qu'ils soient dégradés, contribuant ainsi au maintien de la qualité de la traduction (Simms, Thomas, et Zaher 2017). D'autres conditions (certains codons rares par exemple) induisent aussi des collisions de ribosomes et peuvent de ce fait contribuer à la dégradation des ARNm.

### **5.2.2. *Non-Stop Decay (NSD)***

Le NSD intervient lorsqu'un ARNm ne possède pas de codon STOP (Shoemaker et Green 2012). Ceci peut être le cas pour un transcrit tronqué que le ribosome va traduire jusqu'à son extrémité 3'. Lorsque le transcrit n'a pas de codon stop mais tout de même une queue poly(A), la traduction par le ribosome va continuer jusque dans cette séquence. Dans de tels cas, Ski7 joue un rôle primordial dans ce processus en reconnaissant le ribosome à l'arrêt et va recruter l'exosome pour dégrader cet ARNm défectueux, ce qui contribue à la dissociation du ribosome, limitant ainsi la production des protéines aberrantes correspondantes (Simms, Thomas, et Zaher 2017).

### **5.2.3. *Nonsense-Mediated Decay (NMD)***

Le mécanisme de surveillance le plus étudié est le NMD. Chez les eucaryotes, le NMD est déclenché par la reconnaissance d'un codon STOP prématuré (PTC : premature termination codon), qui peut résulter d'erreurs de transcription, de maturation, ou de mutations génétiques. Comme lors de la terminaison de la traduction normale, le ribosome va s'arrêter

sur le PTC et recruter les facteurs de terminaison eRF1 et eRF3. Le mécanisme de surveillance du NMD est dirigé par plusieurs facteurs, notamment les protéines Upf1, Upf2 et Upf3, fortement conservées chez les eucaryotes (Shoemaker et Green 2012). Upf1 possède une activité hélicase et ATPase, tandis que le rôle de Upf2 et Upf3 n'a pas encore été bien défini.

Chez la levure, une analyse récente de l'interactome du NMD a permis d'identifier d'autres protéines potentiellement impliquées, telles que les protéines du clivage de la coiffe Dcp1-Dpc2, ainsi que Nmd4 et Ebs1 (Dehecq et al. 2018). Il est intéressant de noter que Dcp2 interagit avec Upf1. Ainsi, le mécanisme du système NMD chez la levure est partiellement compris, notamment la reconnaissance du PTC et certains aspects mécanistiques restent encore à déchiffrer. Des études suggèrent qu'Upf1 peut être recruté par son interaction avec les facteurs de terminaison de la traduction eRF1 et eRF3 (Czaplinski et al. 1998), cependant il existe des données contradictoires (Roque et al. 2015). Un second modèle a été proposé dans lequel la présence d'un PTC allonge la 3'UTR, créant ainsi un « *faux* » 3'UTR (Amrani et al. 2004). Du fait de ce « faux 3' UTR » le codon STOP serait trop éloigné de la queue poly(A), empêchant l'interaction entre Pab1 et eRF3. Ainsi, la terminaison de la traduction deviendrait anormale et déclencherait le système NMD. Cependant, une étude contradictoire a montré que la présence d'une longue 3'-UTR n'était pas suffisante pour activer efficacement le système NMD (Decourty et al. 2014) car la taille de la région codante a aussi un effet négatif sur l'efficacité du système. Ainsi, pour que le NMD soit efficace, deux conditions apparaissent essentielles : une longue 3'UTR et une petite région codante. Enfin, malgré ces avancées, plusieurs aspects du NMD chez la levure restent à élucider, notamment comment Upf1 interagit avec le PTC et ce qui différencie un codon stop normal d'un PTC.

Chez les eucaryotes supérieurs, des complexes protéiques de jonction d'exons (EJC) sont déposés juste en amont du point de ligation de deux exons lors de l'épissage du pré-ARNm. Ces EJC servent de repère aux ribosomes en signalant que tout codon stop situé en amont est un PTC. Les complexes EJC jouent donc un rôle crucial lorsqu'ils sont situés suffisamment en aval du PTC. Comme chez la levure, Upf1, Upf2 et Upf3 dirigent le NMD chez l'homme, avec l'aide d'autres facteurs, dont notamment des facteurs SMG (SMG6 et SMG7 étant similaires à Nmd4 et Ebs1 de la levure). Ces facteurs forment un complexe dynamique (Figure 11) (Chamieh et al. 2008). De manière similaire au « faux 3' UTR » chez la levure, un

autre modèle suggère que le système NMD pourrait également dépendre de la taille de la 3' UTR. La présence de plusieurs Upf1 qui interagiraient directement avec la 3' UTR de l'ARNm entre le PTC et la queue poly(A), stimulerait la dégradation de l'ARNm (Figure 11) (Hogg et Goff 2010). Bien que plusieurs modèles existent, le mécanisme d'activation du NMD n'est pas encore entièrement compris. Cependant, certains aspects sont clairs, notamment le rôle d'une des protéines SMG, SMG1, qui phosphoryle Upf1, permettant le recrutement de SMG6, responsable du clivage endonucléolytique de l'ARNm (Huntzinger et al. 2008).

### **5.3. Localisation de la dégradation des ARNm**

Chez les eucaryotes, y compris chez la levure, la dégradation des ARNm se déroule principalement dans trois compartiments cellulaires : le cytoplasme, les P-bodies (*Processing Bodies*) et, plus rarement, le noyau. (Des ARNm d'origines différentes sont aussi dégradés dans les mitochondries et pour les plantes, les chloroplastes). Les systèmes de contrôle qualité des ARNm aberrants, tels que NMD, NGD et NSD, fonctionnent dans le cytoplasme.

Les P-bodies sont des structures cytoplasmiques riches en particules ribonucléoprotéiques (RNP) et sont spécialisés dans le stockage temporaire ou la dégradation des ARNm. Ces structures contiennent de nombreux facteurs impliqués dans la dégradation 5' vers 3', tels que Xrn1, Dcp1-Dpc2, Lsm1-7, Pat1 et Dhh1, qui dégradent les ARNm déjà déadénylés (Parker et Sheth 2007). Cependant, certaines études remettent en question le rôle des P-bodies en tant que centres de dégradation.

La voie 3' vers 5', dirigée par l'exosome après la déadénylation, se trouve principalement dans le cytoplasme. Toutefois, l'exosome est également présent dans le noyau, où il participe à la maturation des ARN ribosomiaux et des petits ARN, tels que les snoARN et les snARN, ainsi que dans la dégradation des transcrits aberrants (Graham, Kiss, et Andrulis 2006).



## **6. Présentation du complexe CCR4-NOT**

Pour introduire le complexe CCR4-NOT, je m'appuie sur une revue en préparation dans le cadre d'un accord avec les éditeur d'un journal. Cette revue en anglais a été co-écrite par plusieurs personnes de l'équipe. La partie principale de cet article qui décrit en détail l'organisation, les fonctions, et les partenaires du complexe CCR4-NOT avec des perspectives phylogénétiques, ainsi que son implication dans diverses pathologies humaines est présentée ci-dessous.

## The multifaceted CCR4-NOT complex, decoder of molecular signals determining eukaryotic mRNA fates

Guillaume Caulier<sup>1a</sup>, Joseph Siblini (ORCID 0000-0002-6115-2943)<sup>1a</sup>, Lina Sene<sup>1a</sup>, Fabienne Mauxion (ORCID 0000-0003-0554-8211)<sup>1</sup>, and Bertrand Seraphin<sup>1\*</sup> (ORCID 0000-0002-5168-1921)

1 Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et cellulaire (IGBMC), Centre National de Recherche scientifique (CNRS) UMR 7104 - Institut National de santé et de Recherche Médicale (Inserm) U964 - Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, France

a : these authors contributed equally to this work and should be considered as co-first author.

\*Corresponding authors – email address [seraphin@igbmc.fr](mailto:seraphin@igbmc.fr)

## Introduction

In eukaryotes, the multistep gene expression pathway, leading from nuclear encoded genes to protein production, involves minimally transcription, pre-mRNA processing, mRNA export from the nucleus, translation and RNA decay. Regulatory mechanisms and quality control processes impact each of these steps to allow cells to adapt to their environment and, for multicellular organisms, permit harmonious development. Deficiencies in these mechanisms can lead to severe diseases.

In the recent years, analyses of mRNA decay have provided increasing evidence for the central contribution of this process to gene expression. In the cytoplasm, most eukaryotic mRNAs are protected from spurious exonucleolytic degradation by a 5' cap and a 3' poly(A) tail covered by cytoplasmic poly(A) binding proteins (PABPC). Generally, mRNA decay is initiated by the gradual removal of the poly(A) tail by deadenylases until a dozen A residues is left. This first step is followed by cap cleavage mediated by the decapping enzyme. The removal of these two protective marks allows the main 5'-3' exonuclease to quickly destroy the mRNA body. In addition to this main pathway, an alternative minor mRNA turnover process implicates the exosome to digest the deadenylated mRNA. In parallel, several quality control pathways actively degrade a low number of mRNAs bearing distinctive defaults such as a premature termination codon, absence of termination codon, or damage preventing efficient translation elongation.

Because deadenylation initiates mRNA decay, identifying enzymes catalyzing this process has been of prime interest. Two conserved eukaryotic complexes appear to mediate cytoplasmic mRNA deadenylation: the PAN2-PAN3 complex and the CCR4-NOT complex. The former has been implicated in the first shortening phase of poly(A) degradation and acts in a

PABPC-dependent manner. Because its deletion does not result in strong growth phenotypes in unicellular model organisms, its contribution to overall deadenylation appears limited. In contrast, since its first description over three decades ago the CCR4-NOT complex has emerged as an important component of the eukaryotic gene expression pathway. Even though it was first ascribed a role in the regulation of transcription by RNA polymerase II, its best characterized role nowadays is a function as the predominant deadenylase that shortens mRNA poly(A) tails to initiate their degradation. More recently, it has been found to contribute to some translational control processes. Thus, the CCR4-NOT complex is appearing as a central actor in the maintenance of proteostasis, from control of mRNA levels available for protein production to regulation of the translation mechanisms themselves. Here, we will review several aspects of the CCR4-NOT complex with an evolutionary perspective, from its composition to its impact on diseases, to illustrate the fascinating multiple facets of this primordial eukaryotic protein complex.

## **Is there one CCR4-NOT complex? Composition, heterogeneity, and inter-species variations**

The CCR4-NOT complex was originally identified in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (M. A. Collart et Struhl 1994; Hai-Yan Liu et al. 1998; Bai et al. 1999; J. Chen et al. 2001) and progressively shown to be composed by 9 subunits : Not1, Not2, Not3, Not4, Not5, Caf1, Ccr4, Caf40 and Caf130 in this organism (Table 1). The presence of sequence orthologs of different subunits in other species indicated its evolutionary conservation (Draper, Salvatore, et Denis 1995; T. K. Albert et al. 2000; Temme et al. 2004), this assembly soon appearing as a distinctive feature of the eukaryotic phylum. The existence and precise composition of the complex were later corroborated in a few model species by biochemical purification and direct protein identification. With increasing available information, intra and inter-species variability in the composition of this entity became apparent and it is now important to recognize that the term “the CCR4-NOT complex” corresponds to an ensemble of heterogenous protein assemblies. Use of different nomenclatures for subunit names in different organisms and the existence of species-specific paralogs increase the difficulties for non-aficionados to apprehend the subtlety of this intricate machine. Here, we will use generic names primarily based on the human system as a paradigm to provide a general framework for the description of the CCR4-NOT complex. Differences and variations observed in other species will then be highlighted.

### *Heterogenous human CCR4-NOT complexes*

Characterization of human CCR4-NOT complexes was initiated through the affinity purification of several tagged orthologs of yeast CCR4-NOT subunits followed by mass spectrometry analyses (Lau et al. 2009). This pioneering study was followed by similar analyses (Mauxion, Prève, et Séraphin 2013) and collectively they identified 11 recurrently co-purifying

proteins: CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT6, CNOT6L, CNOT7, CNOT8, CNOT9, CNOT10, CNOT11 and TNKS1BP1 (Table 1). These proteins appear to be phylogenetically conserved beyond chordates suggesting that the human complex is a good model for this group of organisms. Surprisingly, human CNOT4 was not found to co-purify with human CCR4-NOT complexes even though its homolog, Not4, is constitutively present in the yeast entity. CNOT4 was found to transiently interact with the human complex (Lau et al. 2009) revealing that mandatory subunit in a given species may only be a short-lived partner in another one.

CNOT7 and CNOT8 are paralogous proteins often referred ambiguously to as CAF1. Interestingly, either CNOT7 or CNOT8, but not both together, appeared to be present in a given complex (Lau et al. 2009) indicating mutually exclusive association. The same situation applies to CNOT6 and CNOT6L (Lau et al. 2009), collectively denominated CCR4 (Table 1). Consistently, a single ortholog of these two proteins is present in many species. Mass spectrometry analysis of the human CNOT1 protein (Mauxion, Prève, et Séraphin 2013) and RNA interference followed by Western Blotting (Gordon et al. 2020) revealed that CNOT1 exists as 2 isoforms, a shorter and a longer one, the latter containing at least 235 additional N-terminal amino acids compared to the former. As CNOT10 and CNOT11 dock on this extension (Bawankar et al. 2013; Mauxion, Prève, et Séraphin 2013; Mauxion et al. 2023), this indicates that CCR4-NOT complexes with or without the CNOT10/CNOT11 module coexist in a given cell. Altogether, the confirmed existence of 2 CNOT1 isoforms and two paralogs each for CAF1 and CCR4 indicates that minimally 8 different human CCR4-NOT complexes may (co-)exist.

Additional variability in complex composition may occur as a result of alternative splicing or existence of uncharacterized variants. While different complexes may co-exist in a given cell, some variants may be tissue- or development-specific due to specific expression of

particular protein isoforms. Finally, while each subunit is maximally present at one copy per complex, the exact stoichiometry of the different subunits in complexes assembled *in vivo* was never carefully analyzed and some assemblies could lack some peripheral subunits. Thus, additional complex heterogeneity could arise as a result of heterogeneous protein levels. Whether the different CCR4-NOT assemblies fulfill different roles is currently unknown, but this parameter should certainly be considered in future studies.

TNKS1BP1 is a peculiar protein, originally not considered as a subunit of the CCR4-NOT complex even though it was repeatedly and abundantly found by mass spectrometry analyses of the human assembly (Lau et al. 2009; Mauxion, Prève, et Séraphin 2013; Chalabi Hagkarim et al. 2018; Poetz et al. 2021; Guénolé et al. 2022). These observations suggest that it is a true subunit of the human CCR4-NOT complex and we propose renaming it CNOT12. Little is known about this protein and in particular its mode of interaction with the other subunits has not been defined.

#### *Phylogenetic variability*

Determination of the composition of the CCR4-NOT complex at the protein level was performed in different model organisms, namely *Drosophila melanogaster* (Temme et al. 2010), *Saccharomyces cerevisiae* (J. Chen et al. 2001), *Schizosaccharomyces pombe* (Ukleja, Valpuesta, et al. 2016), and *Trypanoma brucei* (Schwede et al. 2008). This revealed that 5 subunits are invariably found: CNOT1, CNOT2, CNOT3, CAF1 and CNOT9 (the generic nomenclature is used here for subunit description, species specific terminology is listed in Table 1).

Some subunits are present in the complex in some species and conspicuously absent in others. This applies for example to CNOT4 that is a constitutive subunit in the two yeast complexes but absent from their human, drosophila and trypanosome counterparts.

Interestingly, however, while CNOT4 homologs exist in human and drosophila and interact transiently with the complex, there is no clear homolog of this protein encoded by the trypanosomal genome (Schwede et al. 2008). Thus, across the evolutionary range a given subunit may be a permanent member, temporarily associated with the complex, or constitutively absent. The human CNOT10 and CNOT11 protein have clear homologs in complexes from all species except yeasts, while CCR4 is absent only from the complex purified from trypanosomes. In the latter case, no ortholog is encoded in the corresponding genome indicating that its absence is not the result of purification artefacts (Schwede et al. 2008). Proteins with no clear counterpart in the human complexes were also found. This includes Caf130 in *S. cerevisiae* that, until now, has no reported homologs in the other species. A similar situation is found in human: as indicated above, TNKSIBP1/CNOT12 appears to be a subunit of the human complex but obvious homologs are absent from the genomes of the other species analyzed. In *S. pombe*, the RNA binding YTH-domain protein Mmi1 co-purifies with the complex (Ukleja, Cuellar, et al. 2016; Stowell et al. 2016). While distant YTH-domain relatives of Mmi1 are found in different organisms, they only associate transiently with the corresponding CCR4-NOT complexes (Du et al. 2016).

Beside the examples observed in human, paralogous subunits have also been found in the *S. cerevisiae* complex. In this case, Not3 or Not5 are interchangeably present (Oberholzer et al. 1998; Bhaskar et al. 2013; Martine A. Collart 2016) and possibly expressed preferentially in different conditions. Further, like in human, two Not1 isoforms appear to co-exist in *S. cerevisiae* (Basquin et al. 2012), suggesting that this might be a common feature of CNOT1 in many eukaryotes. Considering protein isoforms and paralogs suggests that minimally 4 different CCR4-NOT complexes could be formed in *S. cerevisiae*. Thus, the

presence of heterogenous complexes is not limited to human and may be evolutionarily prevalent.

While orthologous sequences to many subunits of the CCR4-NOT complex have been identified in plant genomes, the complex has not been biochemically characterized. Thus, its composition is still uncertain but would warrant dedicated studies.

In conclusion, even though a limited number of species have been analyzed, the CCR4-NOT complex appears highly polymorphic within and between species boundaries. Overall, it is present in all eukaryotes and consists of a conserved core with peripheral subunits that are species- or lineage-specific. In several instances, duplications of genes encoding some subunits have occurred during evolution, leading to the presence of redundant alternative paralogous subunits in some organisms. The resulting compositional heterogeneity may have benefited adaptation to specific conditions or developmental regulations.

### **Organization and structure of the CCR4-NOT complex**

The organization of the CCR4-NOT complex was determined through biochemical, interactomic, and structural analyses. It is centered around the CNOT1 protein that provides a linear scaffold for the different modules of this assembly (Bawankar et al. 2013) (Figure 1). The extreme N-terminus of CNOT1 associates with CNOT10 and CNOT11 to form a module, the presence of which is optional as it is only assembled on the long CNOT1 isoform (Figure 1). A similar situation probably occurs for the presence of Caf130 in the yeast complex, again due to Not1 N-terminal heterogeneity (Basquin et al. 2012). Of note, while the Not1 protein is essential in yeast, its N-terminal region is dispensable arguing that the critical function(s) of the CCR4-NOT complex are accomplished by C-terminally located modules (Basquin et al.

2012). Along the N- to C- CNOT1 axis, the next module contains an internal region of CNOT1 bound to CAF1 that itself binds CCR4 (Figure 1). This module, often referred to as the deadenylase module, contains the two nucleases active sites required to catalyze poly(A) shortening. CCR4 is the only subunit of the complex that does not contact CNOT1. This situation may explain why CCR4 may have been gained or lost during evolution as exemplified by the difference observed between trypanosomes and the other eukaryotic species. Further along the CNOT1 axis, CNOT9 binds directly CNOT1 and forms an independent module on its own. Finally, CNOT2 and CNOT3 bind near the C-terminus of CNOT1 to form the NOT module (Figure 1). The various modules are connected by structured and/or disordered regions of CNOT1 that act as linkers.

The overall three-dimensional structure of the CCR4-NOT complex has been determined through negative-stain electron microscopy and cryogenic electron microscopy (cryo EM) analyses from the two yeast species (Nasertorabi et al. 2011; Ukleja, Cuellar, et al. 2016). Basically, the structure appears centered around CNOT1, and adopts a flat L shape with the deadenylase module at the elbow. The vertical bar would encompass the Not1 C-terminus and associated modules, while the horizontal bar represents the Not1 N-terminus and bound factors. However, only limited resolutions were achieved, possibly because of intrinsic flexibility in the complex. To circumvent this issue, crosslinking strategies and electron paramagnetic resonance spectroscopy have been applied to get insights into the distance between the different modules of the complex (Q. Zhang et al. 2022; Z. A. Chen et al. 2024) . In parallel, structural data for individual modules, sub-modules or protein domains, originating from different species, have been obtained. Together, they cover most of the CCR4-NOT complex. As those have been reviewed elsewhere (Xu et al. 2014; Ukleja, Valpuesta, et al.

2016; Raisch et Valkov 2022; Krempf, Lazzaretti, et Sprangers 2023; Pavanello, Hall, et Winkler 2023; Zhao et al. 2023), they are only summarized here. Briefly, HEAT repeats, characterized by successive sets of two antiparallel  $\alpha$  helices, are present all along CNOT1 (Mauxion et al. 2023; Fabian et al. 2013; Basquin et al. 2012; Petit et al. 2012; Q. Zhang et al. 2022; Mathys et al. 2014; Y. Chen et al. 2014; Raisch et al. 2018; Boland et al. 2013; Bhaskar et al. 2013) except in the region binding CNOT9 that adopts a specific structure originally named DUF3819 domain (Domain of Unknown Function 3819) and renamed CN9BD for CNOT9 Binding Domain (Y. Chen et al. 2014; Mathys et al. 2014). Some CNOT1 HEAT repeats belong to a subset of the large family of HEAT repeats that are named MIF4G domains. Those, identified originally in the middle region of translation initiation factor 4G (hence the name MIF4G), usually contain 5 to 7 helix-turn-helix repeats. The CN9BD being composed of  $\alpha$ -helical bundle, CNOT1 is quasi exclusively made of  $\alpha$  helices with only rare exceptions.

Other CCR4-NOT subunits adopt specific fold with, in many cases, structural similarities to other proteins. CNOT10 contains 13 tetratricopeptide repeats (TPR) that wrap around the middle region of CNOT11 and contact CNOT1 (Mauxion et al. 2023). The N-terminal region of CNOT11 adopts a unique fold and contacts CNOT1. The C-terminal domain of CNOT11 is also a MIF4G domain that acts as a flexible connected antenna to recruit various partners (Mauxion et al. 2023). In the deadenylase module, CAF1 is a typical member of the 3'-5' exonuclease family (Thore et al. 2003; Y. Chen et al. 2021) while the catalytic domain of CCR4 belongs to a large family of phosphoesterases including phosphatases and nucleases (Dlakić 2000; Wang et al. 2010; Y. Chen et al. 2021). CCR4 connects to CAF1 through leucine-rich repeats (LRR) (Basquin et al. 2012; Y. Chen et al. 2021; Q. Zhang et al. 2022). CNOT9 is formed of armadillo repeats (Garces, Gillon, et Pai 2007) while CNOT2 and CNOT3 C-terminal

domains adopt Sm-like folds that dimerize and interact, together with part of the preceding non-globular regions, to the C-terminal CNOT1 HEAT repeat (Bhaskar et al. 2013; Boland et al. 2013). Finally, the N-terminal domain of CNOT3 adopts a specific structure that has been shown to bind ribosome (Buschauer et al. 2020; Absmeier et al. 2023), see also below). How TNKS1BP1/CNOT12 folds and binds to the rest of the complex remains a mystery.

While not being a member of the metazoan CCR4-NOT complex, we mention the organization of CNOT4 here as it is a stable subunit of the complex in yeast species. CNOT4 contains a C4C4 RING domain that possesses E3 ubiquitin ligase activity (Hanzawa et al. 2001), a RNA recognition motif (RRM), and a C3H1 zinc finger motif, the latter two involved in binding RNA (T. K. Albert et al. 2000). The remaining less-conserved C-terminal region of CNOT4 harbors regions involved in interaction with the CCR4-NOT complex, but the modality of which differs between species (Keskeny et al. 2019; Bhaskar, Basquin, et Conti 2015). Thus, during evolution, rewiring occurred, allowing CNOT4 to be permanently or temporarily incorporated into the CCR4-NOT complex in different organisms.

### **The CCR4-NOT complex as an inviting landing pad for auxiliary partners**

To perform its functions, the CCR4-NOT complex interacts transiently with numerous auxiliary partners. Among the many protein partners, some have been well established, including at the structural level providing further insights into the functions of the CCR4-NOT complex. The detailed functions of some partners will be discussed in a following paragraph; here we will focus on a general description on the biological activities of these factors and their mode of interaction with the CCR4-NOT complex in relation to the structure of the latter

(Figure 2). Indeed, different studies have revealed that the CCR4-NOT complex interactome is enriched in factors with specific functions, that bind to different interaction hubs (Figure 2).

Among the well characterized CCR4-NOT partners in human and drosophila are found many RNA binding proteins including Nanos (Bhandari et al. 2014; Raisch et al. 2016), Smaug (Pekovic et al. 2023), members of the Pumilio family (Enwerem et al. 2021), Unkempt (Shah et al. 2024), Bicaudal-C (Chicoine et al. 2007), DND1 (Yamaji et al. 2017), Roquin (Leppek et al. 2013; Sgromo et al. 2017) and ZFP36, also named Tristetraprolin (TTP) (Fabian et al. 2013; Bulbrook et al. 2018). These proteins contain various types of RNA binding domains but share in common their ability to interact with the CCR4-NOT complex and their repressive effect on gene expression through RNA destabilization and/or translation repression. RNA helicases DDX6 (named Dhh1 in yeast) (Y. Chen et al. 2014; Mathys et al. 2014) and HELZ (Hanet et al. 2019), often not considered as RNA binding proteins, also belong to the CCR4-NOT interactome and lead similarly as the RNA Binding Proteins to RNA destabilization and/or translation repression. YTH-domain containing factors, many of which interact with modified m6A residues, provide another mean of recruitment of the CCR4-NOT complex to repress target mRNAs (Du et al. 2016). Mmi1 from *S. pombe*, a constitutive member of the complex in this species, is an extreme representative of this group even though it has lost the ability to recognize m6A (Stowell et al. 2016). Other factors binding to the CCR4-NOT complex bridge indirectly the latter to mRNAs. Those include the TNRC6 proteins (named also GW182) involved in the miRNA-mediated silencing pathway (Y. Chen et al. 2014; Mathys et al. 2014) and the BTG-Tob factors that associate with PAPBC proteins (Okochi et al. 2005; Ezzeddine et al. 2007). Bag-of-Marble (Bam), a protein found in a subset of insects, is a clear partner of the CCR4-NOT complex that may also fit in this category even if its interaction with RNA binding proteins has not been characterized (Sgromo et al. 2017). Finally, the ribosome itself serves

as an indirect link between the CCR4-NOT complex and mRNAs. Notably, several of the CCR4-NOT partners possess ubiquitin ligases activity, of which RNF219 (Guénolé et al. 2022; Poetz et al. 2021; Du et al. 2020), CNOT4 (Keskeny et al. 2019) and Roquin (Leppek et al. 2013; Sgromo et al. 2017). The latter is particularly interesting as it hosts both RNA binding and ubiquitin ligase activities. Finally, among of the recently identified partners of the CNOT10/CNOT11 module, SCAPER appears to link proteostasis control to mRNA decay (Höpfler et al. 2023) while the function of GGNBP2 has not yet been characterized (Mauxion et al. 2023). If many partners of the CCR4-NOT complex are conserved in eukaryotes, some are found in only a subset of species. Those include the yeast Cal4 and Btt1 proteins that interact with the yeast specific Caf130 subunit (Pillet et al. 2022).

The mode of interaction of numerous auxiliary partners with the CCR4-NOT complex has been deciphered, including in some case with structural details, revealing the presence of interaction hubs in the latter. A major interaction hub is the CNOT9 protein. Its Amardillo repeats provide two specific docking surfaces, one on its convex side that presents Tryptophane (W)-binding pockets and one on its concave side presenting a groove anchoring alpha-helices. CNOT9 interacts with TNRC6 (Y. Chen et al. 2014; Mathys et al. 2014), ZFP36 (Bulbrook et al. 2018), Roquin (Sgromo et al. 2017), RNF219 (Poetz et al. 2021), CNOT4 (Keskeny et al. 2019) as well as Bam (Sgromo et al. 2018). Surprisingly, if CNOT9 is a major interaction hub of the metazoan complex, its counterpart in *S. cerevisiae* is still lacking direct interaction partners. The scaffold CNOT1 protein itself allows binding of transient partners in addition to being the backbone of the complex. Hence, it binds directly ZFP36 through its HEAT repeat located between the CNOT10/CNOT11 and the deadenylase modules (Fabian et al. 2013). Thus, ZFP36 appeared to interact with CCR4-NOT complex through multiple contacts (Fabian et al. 2013; Bulbrook et al. 2018). This theme will be recurrently found for CCR4-NOT

auxiliary factors and binding often involves short linear motifs (SLiM), each providing low affinity binding, but the combination of which allowing tighter interaction and increased specificity. The use of SLiM may facilitate fine tuning the protein-protein contacts to adapt protein association to biological needs enabling rapid evolution. Along this line, it is worth noting that SLiM are often found binding to both CNOT9 and the NOT module. The presence of SLiM does not facilitate deciphering the complex interaction network surrounding the CCR4-NOT complex. CNOT1 also recruits the DDX6 RNA helicase through the MIF4G domain of the deadenylase module (Y. Chen et al. 2014; Mathys et al. 2014). Given that DDX6 interacts with many partners involved in RNA decay and translational repression (EDC3, LSM14, PAT1, and 4E-T), it may bridge some of those factors to the CCR4-NOT complex (Ozgur et al. 2015). The intricate NOT module constituted by the C-terminus of CNOT1, CNOT2 and CNOT3 forms another important interacting hub, binding to the RNA binding proteins Nanos (Bhandari et al. 2014; Raisch et al. 2016), Smaug (Pekovic et al. 2023), Pumilio factors (Enwerem et al. 2021), Unkempt (Shah et al. 2024), Bicaudal-C (Chicoine et al. 2007) and the ubiquitin ligases Not4 (Bhaskar, Basquin, et Conti 2015) and Roquin (Sgromo et al. 2017), some time in redundancy with the CNOT9 hub as mentioned above. Another recently discovered interaction hub of the CCR4-NOT complex is the C-terminal domain of CNOT11 that constitutes the antenna of the CNOT10/CNOT11 module. It has been shown to interact with GGNBP2 (Mauxion et al. 2023) and SCAPER (Höpfner et al. 2023).

Beside these major interaction hubs, other proteins have more dedicated partners. Hence, in metazoans, CAF1 bind the members of the BTG/Tob protein family (Horiuchi et al. 2009). A recently described and sophisticated interaction involves a domain at the N-terminus of CNOT3 that inserts in the E-site of ribosomes when the A-site stays empty (Buschauer et al. 2020; Absmeier et al. 2023).

As for composition of the CCR4-NOT complex, its interaction network differs between species. For example if CNOT4 in metazoans interacts transiently to CNOT9 or the NOT modules (Keskeny et al. 2019), in *S. cerevisiae* a longer region with three interacting segments contacts directly Not1 upstream of the region involved in binding Not2/Not3 (Bhaskar, Basquin, et Conti 2015). Thus, some contacts may be rewired at a fast pace probably under selective pressure. Overall, it is striking that partners of the CCR4-NOT complex are numerous and diverse and that this population may differ from one species to the next. Yet, they collectively form a consistent network and the well-established partners of the CCR4-NOT complex connect this assembly to a limited set of cellular functions including RNA decay and translation control.

### **Biochemical functions of the CCR4-NOT complex**

#### *Is CCR4-NOT involved in transcription?*

The first subunits of the CCR4-NOT complex were identified in *S. cerevisiae* genetic screens for deregulated expression of reporter genes: the *caf1* (then called *pop2*) mutant was found to overproduce mouse amylase expressed from the PGK promoter (Sakai et al. 1992) while the *ccr4* mutant was independently identified as an activator of the glucose-repressible alcohol dehydrogenase (ADH2) expression (Clyde L. Denis 1984). Four Not genes (NOT1-4) were soon after described as global negative transcription regulators affecting HIS3 constitutive and inducible promoters (M. A. Collart et Struhl 1994; 1993). In parallel, Not4 (then called Mot2) was identified as a negative regulator of expression of pheromone responsive genes (Cade et Errede 1994; Irie et al. 1994). Some of these genes were independently identified in other genetic screens for other biological effects, such as *NOT1* and *NOT2* (then called *CDC39* and *CDC36*) that impacted the control of the cell cycle. While

some early studies didn't exclude a potential role of these factors in mRNA decay, most publications concluded that they repressed transcription. When biochemical purification demonstrated that these factors formed a unique complex that had positive and negative effects on gene expression (H. Y. Liu et al. 1998), the assumption that they regulated transcription was reinforced. Consistent with this possibility, some studies localized the CCR4-NOT complex in the nucleus. Subsequent analyses suggested a potential role in transcriptional initiation through interactions with the SAGA histone acetyltransferase complex, transcription factor II D (TFIID), the SRB/Mediator complex, TATA-binding protein (TBP), and other transcription factors (T. I. Lee et al. 1998; Benson et al. 1998; Badarinarayana, Chiang, et Denis 2000; H. Y. Liu et al. 2001; Sanders et al. 2002). But the complex was also linked to transcriptional elongation (C. L. Denis et al. 2001; Gaillard et al. 2009; Kruk et al. 2011).

The unanticipated discovery that subunits of the CCR4-NOT complex affected deadenylation and cytoplasmic mRNA decay, and that some were endowed with poly(A) nuclease activity, questioned the earlier conclusions (M. Tucker et al. 2001; Daugeron, Mauxion, et Séraphin 2001). If the possibility that the complex may have a dual function in transcription and mRNA decay was raised (Martine A. Collart 2003), several observations question this prospect. Hence, the differential effect of Not proteins on different promoters driving expression of the His3 protein was taken as a solid argument for their role in transcription. However, this observation may also be explained by a role of the Not proteins in mRNA decay if transcripts originating from the different promoters don't have the same half-lives *in vivo* (for example, the two promoters don't fire at the same time with respect to the cell cycle but the transcript that have nearly identical sequence are simultaneously degraded at a later phase). Similarly, many genetic interactions in which inactivation of CCR4-NOT subunits suppressed, or interacted with, mutations affecting transcription factors could

be explained by a partial restoration of the cellular RNA balance following altered mRNA decay. Consistently, careful analyses demonstrated that altering RNA Polymerase II transcription can be compensated by transcript buffering through modified mRNA decay, and vice-versa (Sun et al. 2012). It remains that some published biochemical data, for example those suggesting direct interactions of CCR4-NOT subunits with transcription factors or promoters, are more difficult to reconcile with an absence of implication of the CCR4-NOT complex in transcription. Yet, after over 30 years, data demonstrating a direct role of the purified complex in transcription initiation or elongation are still lacking as well as structural data demonstrating direct and specific interaction between transcription factors and the CCR4-NOT complex. To the contrary, as stated above, the well described partners of the CCR4-NOT complex connect it to cytoplasmic mRNA decay and translation, including through direct biochemical tests with purified proteins supported by complementary in vivo analyses. Also consistent with the latter, large-scale unbiased studies of protein localization indicate the presence of the majority of the complex in the cytoplasm, even if presence of a minor fraction in the nucleus cannot be excluded. Strikingly, recent efforts to identify transcription factors associated with the yeast CCR4-NOT complex using the latest TurboID technique, failed to provide support for a functional connection of the CCR4-NOT complex with the nuclear mRNA production machinery, but rather argued for its cytoplasmic role in mRNA decay and translational control (Pfannenstein et al. 2024). Overall, even if the *S. cerevisiae* CCR4-NOT complex has been widely described as a transcription factor, its implication in this process remains uncertain while many of its effects on the transcriptome may be explained through its direct or indirect role in controlling mRNA degradation.

In many other species including human, implication of the CCR4-NOT in transcription remains questionable: altering CCR4-NOT complex functions often has a major impact on the

transcriptome, but whether this is due to altered mRNA decay, indirect consequences of the latter, and/or direct effect on transcription is unknown. Yet, in *Schizosaccharomyces pombe*, regulation of the mitotic versus meiotic cell state is accompanied by changes of chromatin states at specific loci, a process that involves dedicated long non-coding RNAs as well as nascent RNAs and requires the CCR4-NOT complex including its fission yeast specific Mmi1 subunit (Cotobal et al. 2015). Both the nuclease and ubiquitin ligase activities of the CCR4-NOT complex are implicated in this process (Simonetti et al. 2017). In this system, the CCR4-NOT complex appears to have a rather direct role in controlling transcription by modulating chromatin states. However, this regulation again requires the capacity of the CCR4-NOT complex to degrade RNAs. It is unclear whether the latter happens both in the nucleus and in the cytoplasm or in only one of these compartments. One could even envisage that the CCR4-NOT complex get access to chromatin associated RNAs during the open mitosis that allows the content of both compartment mixes.

Altogether, while transcription control was the first proposed molecular function of the CCR4-NOT complex, current evidence for a direct implication is still lacking and many observations may be reconciled with indirect impact of its other functions.

### *Deadenylation*

*In vitro* and *in vivo* data demonstrate that the CCR4-NOT complex is involved in deadenylation. First, besides their structural similarities with nuclease, CCR4 and CAF1 exert deadenylase activities *in vitro* (M. Tucker et al. 2001; Daugeron, Mauxion, et Séraphin 2001; D. Zheng et al. 2008; Schwede et al. 2008; Yi et al. 2018), releasing in a stepwise manner AMP from the substrate RNA (Junji Chen, Chiang, et Denis 2002; Morgan Tucker et al. 2002; Bianchin et al. 2005). These biochemical assays were substantiated by structural analyses that

elucidated how poly(A) tails bind in the catalytic site of these enzymes (Jonstrup et al. 2007; Wang et al. 2010). Further, deleting or knocking down these factors reduce deadenylation *in vivo* in yeast, mammalian and trypanosoma cells (M. Tucker et al. 2001; Daugeron, Mauxion, et Séraphin 2001; D. Zheng et al. 2008; Yi et al. 2018; Schwede et al. 2008). It is noteworthy, however, that the yeast Caf1 nuclease domain appears to diverge from the consensus at key residues of the catalytic site and that most if not all the deadenylation activity is brought by the CCR4 subunit in this species (Junji Chen, Chiang, et Denis 2002; Morgan Tucker et al. 2002). Hence, in various species, catalysis of deadenylation originates in different subunits: in CCR4 in *S. cerevisiae*, in CAF1 and/or CCR4 in human, drosophila (Temme et al. 2010), and only in CAF1 in trypanosomes (CCR4 being absent from this organism). Interestingly, integration of the deadenylase module in the CCR4-NOT complex is required for efficient deadenylation *in vivo*: catalytically active Caf1 and Ccr4 unable to interact with the rest of the complex as a result of mutations in Not1 generate a severe deadenylation defect in yeast (Basquin et al. 2012). Reciprocally, regulated deadenylation can be achieved *in vitro* by targeting the reconstituted CCR4-NOT complex to specific substrate RNAs through RNA binding proteins (Stowell et al. 2016; Raisch et al. 2019). The latter connect the body of the CCR4-NOT complex to the targeted RNA, recruiting thereby the deadenylases. Regulation of deadenylation thus appears to switch the enzyme activity from a distributive mode to a more processive mode of action. However, the complex does not appear to be fully processive *in vivo* and deadenylation stops when the poly(A) tail has been reduced to 10-15 A residues (M. Tucker et al. 2001; Daugeron, Mauxion, et Séraphin 2001; Yamashita et al. 2005). It is still unclear whether dissociation of the final poly(A) binding protein (PABP), binding of the Lsm1-7 complex to the short oligo(A) tail, and/or other events trigger the end of deadenylation. However, artificially fusing the deadenylase to an RNA binding domain results in rapid degradation of mRNAs

containing the cognate binding site, but surprisingly 3'-5' degradation continues in this case past the poly(A) tail into the mRNA body (Finoux et Séraphin 2006). The latter observation is consistent with recruitment of the deadenylase being limiting but indicates also that deadenylases do not have an absolute specificity for A residues. *In vitro* observations are consistent with this conclusion: deadenylase will slow down at non-A residues, G being the least preferred substrate (T. T. L. Tang et al. 2019; Lim et al. 2018). Hence, deadenylation *in vivo* may be modulated when non-A residues are incorporated in poly(A) (Lim et al. 2018). The role of PABP in protecting the poly(A) tail and its interplay with the CCR4-NOT complex remain ambiguous. It has been indeed suggested that CAF1 nuclease activity is blocked by PABPC whose release from the poly(A) tail is accomplished by CCR4 based on *in vitro* assays with purified *S. pombe* CCR4-NOT complex and *in vivo studies* both in *S. cerevisiae* and mammalian cells (Webster et al. 2018; Yi et al. 2018). However, contradictory *in vitro* observations have been reported (Stupfler et al. 2016) and further this is difficult to reconcile with the fact that double knock-out of CNOT6 and CNOT6L, the two CCR4 paralogs in mammals, has little phenotype in mice (Sha et al. 2018; X. Dai et al. 2021). It would be informative to gain structural insights into the degradation of PABP-bound poly(A) by the CCR4-NOT complex to decipher the mechanistic details.

Overall, available data unequivocally demonstrate that the CCR4-NOT complex is an active deadenylase involved in the mRNA poly(A) tail shortening thereby triggering mRNA turnover. Yet, some details of the mechanisms involved remain to be elucidated.

### *Ubiquitination*

CNOT4 is a constitutive subunit of the CCR4-NOT complex in yeast and a transient partner of the complex in other eukaryotes. It contains a RING domain with E3 ubiquitin ligase

activity (Thomas K. Albert et al. 2002) that transfers ubiquitin from a E2 enzyme to target proteins, leading to their degradation and/or altering their function or localization. Consistently, the structure of the *S. cerevisiae* Not4 RING domain with the E2 enzyme Ubc4 has been solved in yeast (Bhaskar, Basquin, et Conti 2015) while the NMR structure of the human CNOT4 RING finger has been solved, and its interaction with the homologous UBE2D2 E2 enzyme has been mapped and the complex modelled (Thomas K. Albert et al. 2002). *In vitro* assays confirmed that human and *S. cerevisiae* CNOT4 homologues are active enzymes (Thomas K. Albert et al. 2002; Mulder, Inagaki, et al. 2007). In humans, CNOT4 has been identified as a translation surveillance factor, functioning through the ubiquitination of stalled ribosomes during elongation (Absmeier et al. 2023). Consistently, in *S. cerevisiae*, ubiquitination of the ribosomal protein eS7 by Not4 has been suggested to be necessary for efficient translation (Takehara et al. 2021) and a prerequisite to further poly-ubiquitination by surveillance Ubiquitin ligases when translation is impaired leading to ribosome arrest and/or collision (Ikeuchi et al. 2019). Additional factors associated with the ribosomes have been reported to be ubiquitinated by CNOT4 including the translation termination ABCE1 in humans (Z. Wu et al. 2018) and the major Nascent-protein Associated Complex (NAC) formed by Egd1 and Egd2 in *S. cerevisiae* (O. Panasenko et al. 2006; O. O. Panasenko, David, et Collart 2009). Further, *S. cerevisiae* Not4 ubiquitin ligase activity was implicated in the degradation of the nascent protein induced by translational arrests (Dimitrova et al. 2009). Finally, in *S. pombe*, the CNOT4 homolog Mot2 was shown to contribute to the destruction and/or inhibition of the meiotic regulator Mei2 during vegetative growth through its ubiquitine ligase activity (Simonetti et al. 2017). Many additional proteins, including RNA binding proteins (L. Zhang et al. 2015), histone H2B (Mulder, Brenkman, et al. 2007), the H3K4 demethylase Jhd2 (Mersman et al. 2009), or even RNA polymerase II (Jiang et al. 2019) have been reported to be modified

by CNOT4, or in a manner depending on CNOT4, affecting their stability and fate. It is noteworthy that in metazoans other E3 ubiquitin ligases, namely Roquin and RNF219, bind transiently the CNOT9 subunit of the CCR4-NOT complex in a competitive manner with CNOT4 and constitute an alternative source of ubiquitination activity that may modify other targets.

Altogether, ubiquitination appears to be an important activity of the CCR4-NOT complex with the ribosome appearing as a major target. Yet, many additional proteins have been described as possible substrates for modification. This area will need further investigation to decipher the molecular characteristics of the ubiquitinated proteins and the physiological roles of their modifications in relation to the activity of the CCR4-NOT complex.

#### **The CCR4-NOT complex at the cellular level: controlling mRNAs fate by integrating mRNA cues**

In cells, each RNA has its individual decay rate. Moreover, those are not fixed and, for a given mRNA, may be modulated according to the conditions. Because deadenylation is rate limiting in cells and is a major factor dictating the kinetics of mRNA turnover, the CCR4-NOT complex plays a central role in cells by controlling gene expression at the post-transcriptional level. A striking example occurs in trypanosomatida, organisms in which polycistronic transcription produces long pre-mRNAs that are split into newly made individual mRNAs thus originally present in equimolar quantities (Daniels, Gull, et Wickstead 2010). Post-transcriptional regulation through mRNA deadenylation (and decay) allows trypanosomal cells to adjust the level of each mRNA to a specific level (Clayton et Shapira 2007). Because poly(A) tail eliminated by deadenylases are homogenous and essentially invariant from one mRNA to the next (except when non-A residues may have been introduced post-transcriptionally), the rate of deadenylation of individual transcript is imposed by specific features present in the

mRNA body. This includes RNA sequences recognized by different factors, the presence of mRNA modifications, but also the capacity of the mRNA to be more or less efficiently translated, and even the propensity of the nascent protein to associate with dedicated partners. Through its ability to read mRNA cues, the CCR4-NOT complex appears as a complex molecular machine capable of integrating this information to shape mRNAs fate (Figure 3).

#### *Bridging target mRNAs and the CCR4-NOT complex through RNA binding proteins*

Several RNA binding proteins interact directly with the CCR4-NOT complex. By recognizing binding sites in specific mRNAs, these binding proteins bring deadenylases close to the target mRNA 3' end and speed-up their deadenylation. A typical example involves the human RNA binding protein ZFP36, also called TTP for tristetraprolin, that directly binds CNOT1 (Figure 3). ZFP36 recognizes AU-rich elements (AREs) located in the 3' region of the non-coding sequence of target mRNAs inducing their turnover (Sandler et al. 2011; Fabian et al. 2013) (Figure 3). This destabilization activity was indeed instrumental in the identification of ZFP36 as a factor that prevents synthesis of TNF $\alpha$  to excessive levels by destabilizing its mRNA under normal conditions (Carballo, Lai, et Blackshear 1998). More globally, ZFP36 safeguards cells from prolonged inflammatory responses by being induced in the process and promoting the rapid mRNA destruction of pro-inflammatory genes (Carballo, Lai, et Blackshear 1998). Interestingly, the activity of ZFP36 is controlled at several levels. For example, phosphorylation by the p90 ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) and p38-activated protein kinase (MK2) will prevent its interaction with the CCR4-NOT complex, thereby stabilizing ARE-containing mRNAs (Hsieh et al. 2021). The mRNA destabilizing activity of ZFP36 can also be counteracted by the competitive binding of HuR to mRNA ARE elements, in agreement with

the pro-inflammatory role of this factor critical for the initial phase of this response (Brennan et Steitz\* 2001; Y.-L. Chen et al. 2006).

Another important group of RNA binding proteins that recruit the CCR4-NOT complex to target mRNAs is the Pumilio family, often designated as PUF family for Pumilio and FBF. PUF proteins share a characteristic RNA binding domain and have been identified and studied in different model systems including *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* and *Saccharomyces cerevisiae* (Wickens et al. 2002). They recognize short specific sequences generally located in the 3'UTR of target mRNAs and collectively designated as Pumilio-response elements (Wickens et al. 2002; Quenault, Lithgow, et Traven 2011). In most cases, their interaction with mRNAs induces the degradation of the latter (Wickens et al. 2002; Quenault, Lithgow, et Traven 2011) although some Pumilio proteins also participate in mRNA transport and translational repression (Quenault, Lithgow, et Traven 2011). In humans, the PUM1 and PUM2 Pumilio proteins have been described to interact with deadenylases of the CCR4-NOT complex: CNOT6, CNOT6L and CNOT8 (to a lesser extent CNOT7) (Van Etten et al. 2012). This interaction has been evolutionarily conserved as in yeast the Mpt5 family member has been described to bind directly Caf1 thus triggering deadenylation of targeted mRNAs by the Ccr4 deadenylase (Goldstrohm et al. 2006; 2007). Many additional RNA binding proteins have been shown to promote deadenylation by the direct, or indirect, recruitment of the CCR4-NOT complex to target mRNAs in different species. Those include for example Smaug, Nanos, Unkempt, Roquin, ... (Pekovic et al. 2023; Raisch et al. 2016; Shah et al. 2024; Leppek et al. 2013; Sgromo et al. 2017). It is likely that, with time, additional factors mediating the enrollment of the CCR4-NOT complex to deadenylate bound mRNAs will be identified. Further, as many RNA binding proteins co-exist in cells, it will be of interest to study how they combine, possibly synergizing or antagonizing, to regulate deadenylation.

The stimulation of deadenylation by RNA binding proteins was reconstituted *in vitro* using purified or recombinant factors. Besides firmly establishing the mechanism involved, this demonstrated the exquisite sensitivity of this process to the concentration of the factors involved and their binding specificity (Pekovic et al. 2023; Stowell et al. 2016).

#### *Using microRNAs to recognize target mRNAs*

Another way to regulate mRNA deadenylation involves microRNA (miRNAs) that bind to partially complementary sites in mRNAs and induce translational repression and mRNA degradation. In humans and drosophila, the GW182 protein, named TNRC6 in humans, is a member of the miRNA-induced silencing complex (miRISC) and is able to specifically interact with CNOT1 (Braun et al. 2011; Chekulaeva et al. 2011). The TNRC6-dependant recruitment of the CCR4-NOT complex initiates translational repression, that appears to involve DDX6 binding to the CCR4-NOT complex, and degradation of the targeted mRNAs (Chen et al. 2014; Mathys et al. 2014) (Figure 3).

#### *Sensing RNA modifications*

mRNA fate may also be determined by the presence of post-translationally added N<sup>6</sup>-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) in the transcript. This modification is recognized by various reader proteins. Among them, some containing a YTH domain have been shown to impact mRNA stability. Hence, in human, the YTHDF2 factor binds m<sup>6</sup>A marks and directly recruits the CCR4-NOT complex (Du et al. 2016), establishing a direct link between m<sup>6</sup>A and mRNA turnover (Du et al. 2016) (Figure 3). As m<sup>6</sup>A has widely been observed to shorten mRNA half-lives, this process may occur in different species.

### *Generic detection of substrate poly(A) tails*

In an unanticipated twist, the presence of PABPC on mRNA poly(A) tails may also, in some conditions, promotes the recruitment of deadenylases. Indeed, in metazoans factors of the BTG/Tob family have been shown to bridge PABPC and the CAF1 deadenylase subunit of the CCR4-NOT complex, thereby stimulating deadenylation (Okochi et al. 2005; Ezzeddine et al. 2007; Winkler 2010; Stupfler et al. 2016) (Figure 3). While this process may seem counterintuitive as all mRNAs will be targeted, this mechanism offers cells the possibility to transiently downregulate the transcriptome, a situation advantageous when it has to be quickly reprogrammed for differentiation or in response to stresses.

### *Monitoring the translating ribosome*

Cryo-EM studies using factors from *S. cerevisiae* and humans have revealed that the N-terminal domain of CNOT3 (Not5 or Not3 in yeast) interacts with stalled ribosomes (Buschauer et al. 2020; Absmeier et al. 2023). In detail, the highly conserved N-terminal domain of CNOT3 or its homologs binds to the empty E site of the ribosome when the A site is also not occupied by a tRNA (Figure 3). This unusual situation arises when a non-optimal codon is present in the ribosome A site, delaying tRNA recruitment and thus allowing departure of the E site tRNA before the A site is filled. Thus, a unique conformation of the translating ribosome triggers the recruitment of the CCR4-NOT complex and initiates the degradation of inefficiently translated mRNAs (Buschauer et al. 2020; Absmeier et al. 2023). These observations provide a molecular mechanism to explain how codon usage modulates mRNA stability, a feature observed in several organisms including yeast and humans (Presnyak et al. 2015; Q. Wu et al. 2019).

### *Censoring mRNAs encoding unwelcomed proteins*

In addition to targeting poorly translated cellular mRNAs, the CCR4-NOT complex is involved in the degradation of some mRNAs encoding proteins that fail to associate with important partners. In humans, evidence for such a mechanism was obtained for the synthesis of tubulin subunits. Specifically, nascent alpha- and beta-tubulin proteins contain at their N-terminus a motif recognized by the protein TTC5 when excess unpolymerized tubulin dimers are present. TTC5 is crucial for autoregulating the levels of mRNA encoding these proteins. Using Turbo ID, SCAPER was identified as a partner of TTC5 that also interacts with the CCR4-NOT complex (Höpfler et al. 2023). Structural modelling suggested that SCAPER interacts with CNOT11 and, consistently, knockdown of CNOT1 and inactivation of CNOT11 stabilized alpha- and beta-tubulin mRNA levels. Based on these observations, it is believed that, when an excess of tubulin dimers is present, TTC5 binds to nascent tubulin proteins at the ribosome exit tunnel, inducing the recruitment of the CCR4-NOT complex through a CNOT11-SCAPER interaction (Figure 3). This process enables the deadenylation and degradation of mRNAs encoding alpha- and beta-tubulins and the fine adjustment of the levels of the mRNAs encoding these critical factors. A similar mechanism was detected in yeast where the slow growth of strains lacking the Acl4 chaperone, a protein specifically involved in escorting of the Rpl4 protein from its site of synthesis to the nucleolus, is suppressed by mutations of the Caf130 subunit of the CCR4-NOT complex as well as its partners Cal4, Btt1 and Egd2 (Pillet et al. 2022). This unexpected observation was explained by the fact that the CCR4-NOT complex initiates the deadenylation and the degradation of the Rpl4 mRNA when the nascent protein is unable to associate with its specific chaperone Acl4. Preventing the downregulation of the Rpl4 mRNA when Acl4 is absent by removing Caf130 and its partner, results in the synthesis of a higher level of the Rpl4 protein that partly compensate from the defect resulting from the absence of the chaperone.

Overall, through a complex network of interactions, the CCR4-NOT complex appears able to decode several signals present in mRNAs to enforce a specific deadenylation rate that will dictate the tempo of the transcript disappearance. As the factors involved in this decoding can themselves be regulated, either through timely synthesis or degradation, or by post-translational modifications, the decay of individual mRNA can be finely tuned. In this vein, it is possible that additional partners of the CCR4-NOT complex will contribute to the control of mRNA deadenylation by decoding additional features present in mRNAs.

## **Conclusion**

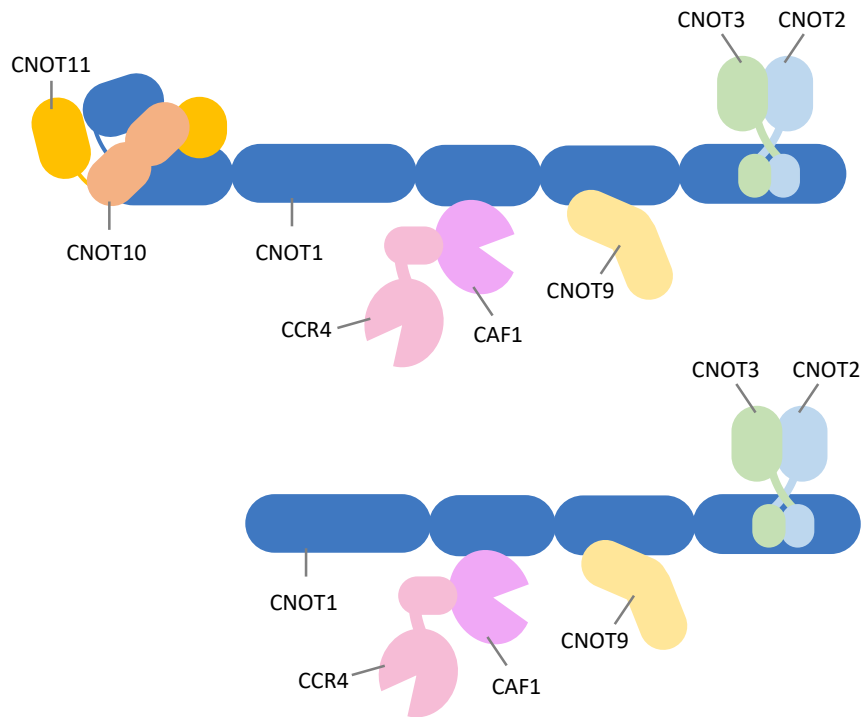
Decades of analyses have shifted the focus of the function of the CCR4-NOT complex from an elusive role in transcription to a critical cytoplasmic machinery involved in controlling mRNA degradation with tight connections to the ribosome. The essential nature of the CCR4-NOT complex is supported by several facts. Early on, the yeast Not1 protein was shown to be essential for viability. It is surprising that this is the only subunit of the complex CCR4-NOT complex that has this property, suggesting that its main role as a scaffold is to balance the activities of the different modules. Analyses of mutants of the CCR4-NOT complex in other organisms have also demonstrated its importance. Hence, mouse homozygous for CNOT1, CNOT3 or CNOT9 mutations are embryonic lethal (Takahashi et al. 2020) (Neely et al. 2010; X. Zheng et al. 2016) (Sarmah et al. 2020). The same applies to CNOT8 (Quan et al. 2022), while CNOT7 mutants are male sterile due to oligo-astheno-teratozoospermia (Berthet et al. 2004; Nakamura et al. 2004). Surprisingly, inactivation of CNOT6 or CNOT6L results in viable mice (X. Dai et al. 2021; Sha et al. 2018). The CNOT6L KO mice are subfertile and displayed a reduction in inosine mRNA modifications in oocytes and clearance of inosine-modified mRNA, indicating the existence of a previously unidentified mRNA clearance mechanism during oocyte

maturation (Brachova, Alvarez, et Christenson 2021). The CNOT6 KO mice, born at the predicted Mendelian frequency, exhibited no obvious abnormalities and were fertile (Mostafa et al. 2020). In contrast, a CNOT4 mutant is also embryonic lethal (X. Dai et al. 2021). In human, variants in the scaffold subunit, CNOT1, have been demonstrated to affect multiple physiological systems. In the cardiovascular system, these variants have been linked to QT interval modulation, a measure of cardiac repolarisation, which predisposes individuals to ventricular arrhythmias and sudden cardiac death (SCD) (Pfeufer et al. 2009). Furthermore, CNOT1 variants have been linked to the development of congenital heart disease (Szot et al. 2018). Neurodevelopmental implications include holoprosencephaly, with or without pancreatic agenesis (OMIM #618500) (De Franco et al. 2019; Cospain et al. 2022), and Vissers-Bodmer syndrome (OMIM #61903), a neurodevelopmental disorder characterized by global developmental delay, intellectual disability, hypotonia, and autistic features with a highly variable phenotype (Vissers et al. 2020; X. Tang et al. 2024; T. Wu, Chen, et Zhang 2024). Additionally, CNOT1 variants have been linked to mood disorders (Humphries et al. 2023) and high-grade colon adenomas, indicating a potential involvement in oncogenesis (S. H. Lee et al. 2017). Other subunits of the CCR4-NOT complex have also been linked to a number of human diseases, although the number of reported associations is variable from one subunit to the next. For example, CNOT2 haploinsufficiency has been linked to a rare neurodevelopmental disorder characterized by intellectual disability, nasal speech, dysmorphic facies, and variable skeletal anomalies (OMIM #618608). Beyond genetic and chronic diseases, several lines of evidence also implicate the CCR4-NOT complex in viral pathologies (e.g., (Ahmed et al. 2018)). Altogether, the CCR4-NOT complex has become a central player of the gene expression pathway through its control of mRNA deadenylation and translation. It is likely that further studies will uncover new implication of this intricate machine in subtle molecular processes.

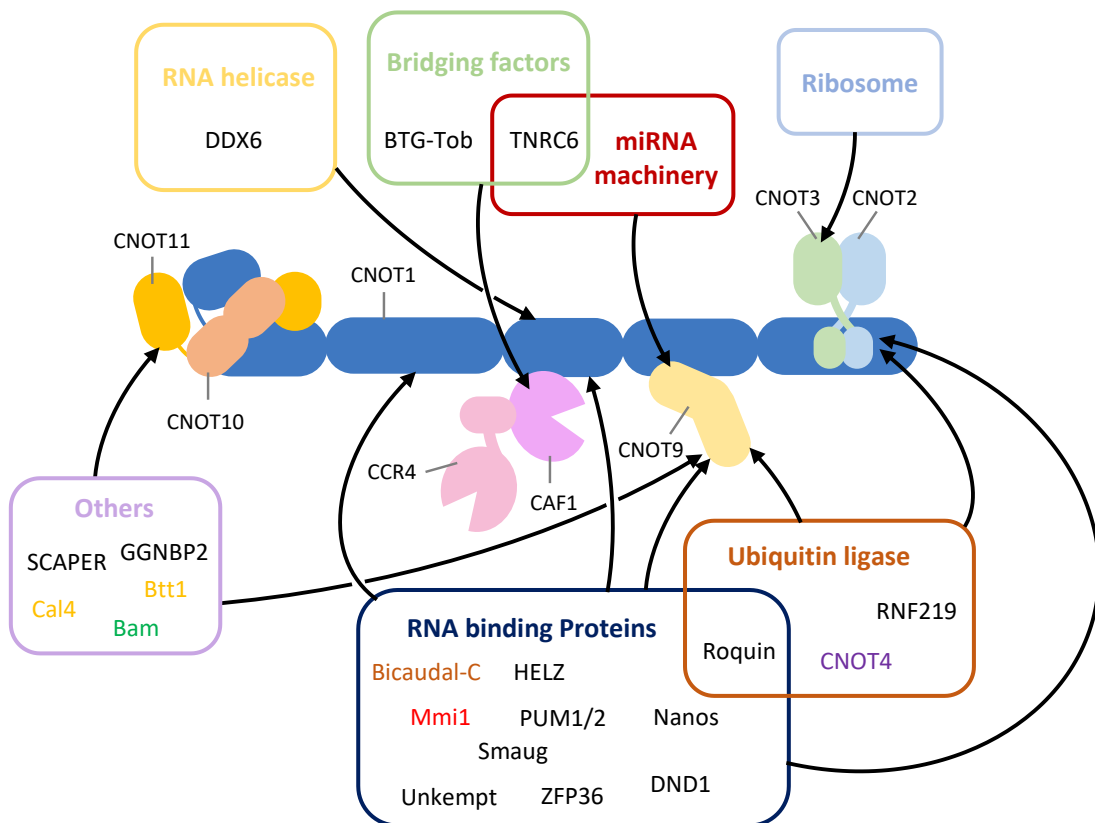
Generic names	H. sapiens	S. cerevisiae	S. pombe	D. melanogaster	T. brucei
<b>CNOT1</b>	CNOT1	Not1	Not1	NOT1	NOT1
<b>CNOT2</b>	CNOT2	Not2	Not2	NOT2	NOT2
<b>CNOT3</b>	CNOT3	Not3 Not5	Not3	NOT3	NOT3
<b>CAF1</b>	CNOT7 CNOT8	Caf1	Caf1	POP2	CAF1
<b>CNOT9</b>	CNOT9	Caf40	Rcd1	CAF40	NOT9
<b>CCR4</b>	CNOT6 CNOT6L	Ccr4	Ccr4	CCR4	X
<b>CNOT10</b>	CNOT10	X	X	NOT10	NOT10
<b>CNOT11</b>	CNOT11	X	X	NOT11	NOT11
<b>CNOT12</b>	TNKS1BP1	X	X	X	X
<b>CNOT4</b>	(CNOT4)	Not4	Mot2	(NOT4)	X
<b>Caf130</b>	X	Caf130	X	X	X
<b>Mmi1</b>	X	X	Mmi1	X	X

**Table 1: Composition of the CCR4-NOT complex in model organisms.**

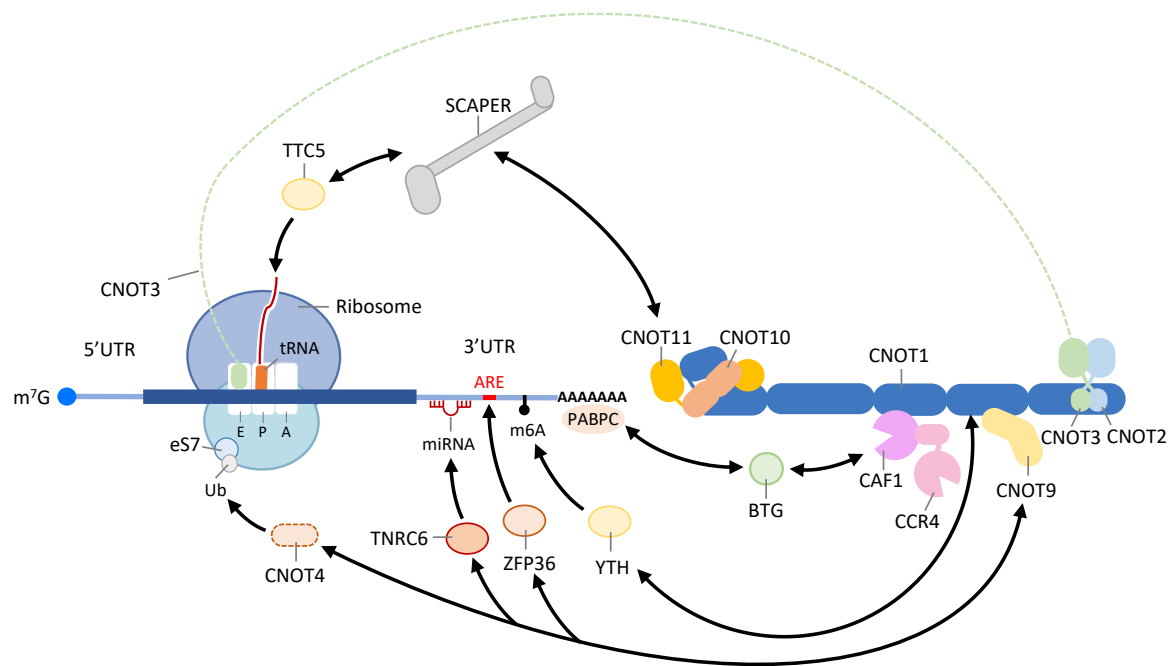
This table recapitulates the composition of the CCR4-NOT complex in species (*Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Trypanosome brucei*) where mass spectrometry (MS) analyses following purification identified the complex components. Generic names correspond to the names used in this review. Names of paralogs, when present, are indicated below each other. The proteins found invariably in the 5 species have a blue background. Proteins present in a subset of species and not in other are indicated with a green background. For CNOT4 a yellow background indicates that homologs transiently interact with the complex (bracketed names, *Homo sapiens* and *Drosophila melanogaster*) or stably (non-bracketed names *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*). Proteins restricted to a single species are presented with an orange background. X: Absence of sequence ortholog in the species. In case of Mmi1, distantly related YTH-domain containing proteins are found in other species that interact transiently with CCR4-NOT.



**Figure 1: Organization of the CCR4-NOT complex and heterogeneity.**



**Figure 2: CCR4-NOT partners and interaction hubs**



**Figure 3: Panel of possible molecular links between the CCR4-NOT complex and a schematic mRNA**

## Figure Legends

### Figure 1: Organization of the CCR4-NOT complex and heterogeneity.

Top: Overall organization of the human CCR4-NOT complex with individual subunits presented in different colors. Their main domains are schematized. Deadenylase subunits are represented as Pac-Man to indicate their catalytic activities. Bottom: A variant complex built around a shorter version of Not1 lacks the CNOT10/CNOT11 module.

### Figure 2: CCR4-NOT partners and interaction hubs

Well-defined partners of the CCR4-NOT complex, grouped by functional categories in boxes, are indicated. Partner names in black represent human proteins and their homologs when known, those in yellow correspond to *Saccharomyces cerevisiae* proteins, those in red indicate *Schizosaccharomyces pombe* proteins, those in green denote insect proteins, those in orange correspond to *Drosophila*, and those in purple represent proteins conserved across several species. Their approximate site(s) of interaction are indicated by black arrows.

### Figure 3: Panel of possible molecular links between the CCR4-NOT complex and a schematic mRNA

Complex subunits, partners, and the interaction network allowing the CCR4-NOT complex to decode cues present in a given mRNA to trigger its deadenylation are indicated. Whether several interactions can occur simultaneously remains to be elucidated.

## Bibliography

- Absmeier, Eva, Viswanathan Chandrasekaran, Francis J O'Reilly, James AW Stowell, Juri Rappsilber, et Lori A Passmore. 2023. « Specific recognition and ubiquitination of translating ribosomes by mammalian CCR4-NOT ». *Nature structural & molecular biology* 30 (9): 1314-22. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01075-8>.
- Ahmed, Choudhary Shoaib, Poppy L. Winlow, Aimee L. Parsons, et Catherine L. Jopling. 2018. « Eukaryotic Translation Initiation Factor 4AII Contributes to microRNA-122 Regulation of Hepatitis C Virus Replication ». *Nucleic Acids Research* 46 (12): 6330-43. <https://doi.org/10.1093/nar/gky262>.
- Albert, T. K., M. Lemaire, N. L. van Berkum, R. Gentz, M. A. Collart, et H. T. Timmers. 2000. « Isolation and Characterization of Human Orthologs of Yeast CCR4-NOT Complex Subunits ». *Nucleic Acids Research* 28 (3): 809-17. <https://doi.org/10.1093/nar/28.3.809>.
- Albert, Thomas K., Hiroyuki Hanzawa, Yvonne I. A. Legtenberg, Marjolein J. de Ruwe, Fiona A. J. van den Heuvel, Martine A. Collart, Rolf Boelens, et H. Th Marc Timmers. 2002. « Identification of a Ubiquitin-Protein Ligase Subunit within the CCR4-NOT Transcription Repressor Complex ». *The EMBO Journal* 21 (3): 355-64. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.355>.
- Badarinarayana, V, Y C Chiang, et C L Denis. 2000. « Functional interaction of CCR4-NOT proteins with TATAA-binding protein (TBP) and its associated factors in yeast. » *Genetics* 155 (3): 1045-54.
- Bai, Yongli, Christopher Salvatore, Yueh-Chin Chiang, Martine A. Collart, Hai-Yan Liu, et Clyde L. Denis. 1999. « The CCR4 and CAF1 Proteins of the CCR4-NOT Complex Are Physically and Functionally Separated from NOT2, NOT4, and NOT5 ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (10): 6642-51. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.10.6642>.
- Basquin, Jérôme, Vladimir V. Roudko, Michaela Rode, Claire Basquin, Bertrand Séraphin, et Elena Conti. 2012. « Architecture of the Nuclease Module of the Yeast Ccr4-Not Complex: The Not1-Caf1-Ccr4 Interaction ». *Molecular Cell* 48 (2): 207-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.014>.
- Bawankar, Praveen, Belinda Loh, Lara Wohlbold, Steffen Schmidt, et Elisa Izaurralde. 2013. « NOT10 and C2orf29/NOT11 form a conserved module of the CCR4-NOT complex that docks onto the NOT1 N-terminal domain ». *RNA Biology* 10 (2): 228-44. <https://doi.org/10.4161/rna.23018>.
- Benson, J D, M Benson, P M Howley, et K Struhl. 1998. « Association of distinct yeast Not2 functional domains with components of Gcn5 histone acetylase and Ccr4 transcriptional regulatory complexes. » *The EMBO Journal* 17 (22): 6714-22. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6714>.
- Berthet, Cyril, Anne-Marie Morera, Marie-Jeanne Asensio, Marie-Agnes Chauvin, Anne-Pierre Morel, Frederique Dijoud, Jean-Pierre Magaud, Philippe Durand, et Jean-Pierre Rouault. 2004. « CCR4-Associated Factor CAF1 Is an Essential Factor for Spermatogenesis ». *Molecular and Cellular Biology* 24 (13): 5808-20. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.13.5808-5820.2004>.
- Bhandari, Dipankar, Tobias Raisch, Oliver Weichenrieder, Stefanie Jonas, et Elisa Izaurralde. 2014. « Structural Basis for the Nanos-Mediated Recruitment of the CCR4-NOT Complex and Translational Repression ». *Genes & Development* 28 (8): 888-901. <https://doi.org/10.1101/gad.237289.113>.
- Bhaskar, Varun, Jérôme Basquin, et Elena Conti. 2015. « Architecture of the Ubiquitylation Module of the Yeast Ccr4-Not Complex ». *Structure(London, England:1993)* 23 (5): 921-28. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.03.011>.
- Bhaskar, Varun, Vladimir Roudko, Jérôme Basquin, Kundan Sharma, Henning Urlaub, Bertrand Séraphin, et Elena Conti. 2013. « Structure and RNA-Binding Properties of the Not1-Not2-Not5 Module of the Yeast Ccr4-Not Complex ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (11): 1281-88. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2686>.
- Bianchin, Claire, Fabienne Mauxion, Stéphanie Sentis, Bertrand Séraphin, et Laura Corbo. 2005. « Conservation of the Deadenylase Activity of Proteins of the Caf1 Family in Human ». *RNA* 11 (4): 487-94. <https://doi.org/10.1261/rna.7135305>.

- Boland, Andreas, Ying Chen, Tobias Raisch, Stefanie Jonas, Duygu Kuzuoğlu-Öztürk, Lara Wohlbold, Oliver Weichenrieder, et Elisa Izaurralde. 2013. « Structure and Assembly of the NOT Module of the Human CCR4–NOT Complex ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (11): 1289-97. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2681>.
- Brachova, Pavla, Nehemiah S. Alvarez, et Lane K. Christenson. 2021. « Loss of Cnot6l Impairs Inosine RNA Modifications in Mouse Oocytes ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (3): 1191. <https://doi.org/10.3390/ijms22031191>.
- Braun, Joerg E., Eric Huntzinger, Maria Fauser, et Elisa Izaurralde. 2011. « GW182 Proteins Directly Recruit Cytoplasmic Deadenylation Complexes to miRNA Targets ». *Molecular Cell* 44 (1): 120-33. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.09.007>.
- Brennan, C. M., et J. A. Steitz\*. 2001. « HuR and mRNA Stability ». *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 58 (2): 266-77. <https://doi.org/10.1007/PL00000854>.
- Bulbrook, D., H. Brazier, P. Mahajan, M. Kliszczak, O. Fedorov, F.P. Marchese, A. Aubareda, et al. 2018. « Tryptophan-Mediated Interactions between Tristetraprolin and the CNOT9 Subunit Are Required for CCR4-NOT Deadenylation Complex Recruitment ». *Journal of Molecular Biology* 430 (5): 722-36. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.12.018>.
- Buschauer, Robert, Yoshitaka Matsuo, Takato Sugiyama, Ying-Hsin Chen, Najwa Alhusaini, Thomas Sweet, Ken Ikeuchi, et al. 2020. « The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality ». *Science (New York, N.Y.)* 368 (6488): eaay6912. <https://doi.org/10.1126/science.aay6912>.
- Cade, R. M., et B. Errede. 1994. « MOT2 Encodes a Negative Regulator of Gene Expression That Affects Basal Expression of Pheromone-Responsive Genes in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (5): 3139-49. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.5.3139-3149.1994>.
- Carballo, Ester, Wi S. Lai, et Perry J. Blackshear. 1998. « Feedback Inhibition of Macrophage Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production by Tristetraprolin ». *Science* 281 (5379): 1001-5. <https://doi.org/10.1126/science.281.5379.1001>.
- Chalabi Hagkarim, Nafiseh, Ellis L. Ryan, Philip J. Byrd, Robert Hollingworth, Neil J. Shimwell, Angelo Agathangelou, Manon Vavasseur, et al. 2018. « Degradation of a Novel DNA Damage Response Protein, Tankyrase 1 Binding Protein 1, Following Adenovirus Infection ». *Journal of Virology* 92 (12): e02034-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02034-17>.
- Chekulaeva, Marina, Hansruedi Mathys, Jakob T. Zipprich, Jan Attig, Marija Colic, Roy Parker, et Witold Filipowicz. 2011. « miRNA Repression Involves GW182-Mediated Recruitment of CCR4-NOT through Conserved W-Containing Motifs ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (11): 1218-26. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2166>.
- Chen, J., J. Rappsilber, Y. C. Chiang, P. Russell, M. Mann, et C. L. Denis. 2001. « Purification and Characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT Complex Identifies Two Novel Components of the Complex ». *Journal of Molecular Biology* 314 (4): 683-94. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5162>.
- Chen, Junji, Yueh-Chin Chiang, et Clyde L. Denis. 2002. « CCR4, a 3'–5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylation ». *The EMBO Journal* 21 (6): 1414-26. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1414>.
- Chen, Ying, Andreas Boland, Duygu Kuzuoğlu-Öztürk, Praveen Bawankar, Belinda Loh, Chung-Te Chang, Oliver Weichenrieder, et Elisa Izaurralde. 2014. « A DDX6-CNOT1 Complex and W-Binding Pockets in CNOT9 Reveal Direct Links between miRNA Target Recognition and Silencing ». *Molecular Cell* 54 (5): 737-50. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.034>.
- Chen, Ying, Elena Khazina, Elisa Izaurralde, et Oliver Weichenrieder. 2021. « Crystal structure and functional properties of the human CCR4-CAF1 deadenylation complex ». *Nucleic Acids Research* 49 (11): 6489-6510. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab414>.
- Chen, Yu-Ling, Ya-Lin Huang, Nien-Yi Lin, Hui-Chen Chen, Wan-Chih Chiu, et Ching-Jin Chang. 2006. « Differential Regulation of ARE-Mediated TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA Stability by Lipopolysaccharide in RAW264.7

- Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 346 (1): 160-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.093>.
- Chen, Zhuo Angel, Eva Absmeier, James Stowell, Ludwig Roman Sinn, Shabih Shakeel, Tamara Sijacki, Kendra Njo, et al. 2024. « Molecular Insights into Dynamic Protein Structures by High-Contrast Crosslinking Mass Spectrometry ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.09.02.610668>.
- Chicoine, Jarred, Perrine Benoit, Chiara Gamberi, Miltiadis Paliouras, Martine Simonelig, et Paul Lasko. 2007. « Bicaudal-C Recruits CCR4-NOT Deadenylation to Target mRNAs and Regulates Oogenesis, Cytoskeletal Organization, and Its Own Expression ». *Developmental Cell* 13 (5): 691-704. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.002>.
- Clayton, Christine, et Michal Shapira. 2007. « Post-Transcriptional Regulation of Gene Expression in Trypanosomes and Leishmanias ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 156 (2): 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.07.007>.
- Collart, M. A., et K. Struhl. 1993. « CDC39, an Essential Nuclear Protein That Negatively Regulates Transcription and Differentially Affects the Constitutive and Inducible HIS3 Promoters ». *The EMBO Journal* 12 (1): 177-86. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05643.x>.
- Collart, Martine A. 2003. « Global Control of Gene Expression in Yeast by the Ccr4-Not Complex ». *Gene* 313 (août):1-16. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00672-3](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00672-3).
- Cospain, Auriane, Marie Faucher, Aurélie Cauchois, Wilfrid Carre, Chloé Quelin, et Christèle Dubourg. 2022. « Fetal Description of the Pancreatic Agenesis and Holoprosencephaly Syndrome Associated to a Specific CNOT1 Variant ». *Pediatric and Developmental Pathology: The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 25 (5): 548-52. <https://doi.org/10.1177/10935266221095305>.
- Cotobal, Cristina, María Rodríguez-López, Caia Duncan, Ayesha Hasan, Akira Yamashita, Masayuki Yamamoto, Jürg Bähler, et Juan Mata. 2015. « Role of Ccr4-Not complex in heterochromatin formation at meiotic genes and subtelomeres in fission yeast ». *Epigenetics & Chromatin* 8 (août):28. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0018-4>.
- Dai, Xing-Xing, Yu Jiang, Jia-Hui Gu, Zhi-Yan Jiang, Yun-Wen Wu, Chao Yu, Hao Yin, et al. 2021. « The CNOT4 Subunit of the CCR4-NOT Complex is Involved in mRNA Degradation, Efficient DNA Damage Repair, and XY Chromosome Crossover during Male Germ Cell Meiosis ». *Advanced Science* 8 (10): 2003636. <https://doi.org/10.1002/advs.202003636>.
- Daniels, Jan-Peter, Keith Gull, et Bill Wickstead. 2010. « Cell Biology of the Trypanosome Genome ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 74 (4): 552-69. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00024-10>.
- Daugeron, M. C., F. Mauxion, et B. Séraphin. 2001. « The Yeast POP2 Gene Encodes a Nuclease Involved in mRNA Deadenylation ». *Nucleic Acids Research* 29 (12): 2448-55. <https://doi.org/10.1093/nar/29.12.2448>.
- De Franco, Elisa, Rachel A. Watson, Wolfgang J. Weninger, Chi C. Wong, Sarah E. Flanagan, Richard Caswell, Angela Green, et al. 2019. « A Specific CNOT1 Mutation Results in a Novel Syndrome of Pancreatic Agenesis and Holoprosencephaly through Impaired Pancreatic and Neurological Development ». *American Journal of Human Genetics* 104 (5): 985-89. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.03.018>.
- Denis, C. L., Y. C. Chiang, Y. Cui, et J. Chen. 2001. « Genetic Evidence Supports a Role for the Yeast CCR4-NOT Complex in Transcriptional Elongation ». *Genetics* 158 (2): 627-34. <https://doi.org/10.1093/genetics/158.2.627>.
- Denis, C. L., et T. Malvar. 1990. « The Ccr4 Gene from *Saccharomyces Cerevisiae* Is Required for Both Nonfermentative and Spt-Mediated Gene Expression ». *Genetics* 124 (2): 283-91.
- Denis, Clyde L. 1984. « Identification of New Genes Involved in the Regulation of Yeast Alcohol Dehydrogenase II ». *Genetics* 108 (4): 833-44.
- Dimitrova, Lyudmila N., Kazushige Kuroha, Tsuyako Tatematsu, et Toshifumi Inada. 2009. « Nascent Peptide-Dependent Translation Arrest Leads to Not4p-Mediated Protein Degradation by the Proteasome ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (16): 10343-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808840200>.

- Dlakić, Mensur. 2000. « Functionally Unrelated Signalling Proteins Contain a Fold Similar to Mg<sup>2+</sup>-Dependent Endonucleases ». *Trends in Biochemical Sciences* 25 (6): 272-73. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01582-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01582-6).
- Draper, Michael P., Christopher Salvatore, et Clyde L. Denis. 1995. « Identification of a Mouse Protein Whose Homolog in *Saccharomyces cerevisiae* Is a Component of the CCR4 Transcriptional Regulatory Complex ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (7): 3487-95. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.7.3487>.
- Du, Hao, Chen Chen, Yan Wang, Yang Yang, Zhuanzhuan Che, Xiaoxu Liu, Siyan Meng, et al. 2020. « RNF219 interacts with CCR4–NOT in regulating stem cell differentiation ». *Journal of Molecular Cell Biology* 12 (11): 894-905. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjaa061>.
- Du, Hao, Ya Zhao, Jinqiu He, Yao Zhang, Hairui Xi, Mofang Liu, Jinbiao Ma, et Ligang Wu. 2016. « YTHDF2 Destabilizes m6A-Containing RNA through Direct Recruitment of the CCR4–NOT Deadenylation Complex ». *Nature Communications* 7 (1): 12626. <https://doi.org/10.1038/ncomms12626>.
- Enwerem, Isioma I. I., Nathan D. Elrod, Chung-Te Chang, Ai Lin, Ping Ji, Jennifer A. Bohn, Yevgen Levitskiy, Eric J. Wagner, Eugene Valkov, et Aaron C. Goldstrohm. 2021. « Human Pumilio Proteins Directly Bind the CCR4–NOT Deadenylation Complex to Regulate the Transcriptome ». *RNA* 27 (4): 445-64. <https://doi.org/10.1261/rna.078436.120>.
- Ezzeddine, Nader, Tsung-Cheng Chang, Wenmiao Zhu, Akio Yamashita, Chyi-Ying A. Chen, Zhenping Zhong, Yukiko Yamashita, Dinghai Zheng, et Ann-Bin Shyu. 2007. « Human TOB, an Antiproliferative Transcription Factor, Is a Poly(A)-Binding Protein-Dependent Positive Regulator of Cytoplasmic mRNA Deadenylation ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (22): 7791-7801. <https://doi.org/10.1128/MCB.01254-07>.
- Fabian, Marc R., Filipp Frank, Christopher Rouya, Nadeem Siddiqui, Wi S. Lai, Alexey Karetnikov, Perry J. Blackshear, Bhushan Nagar, et Nahum Sonenberg. 2013. « Structural Basis for the Recruitment of the Human CCR4–NOT Deadenylation Complex by Tristetraprolin ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (6): 735-39. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2572>.
- Finoux, Anne-Laure, et Bertrand Séraphin. 2006. « In Vivo Targeting of the Yeast Pop2 Deadenylation Subunit to Reporter Transcripts Induces Their Rapid Degradation and Generates New Decay Intermediates \* ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (36): 25940-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600132200>.
- Gaillard, Hélène, Cristina Tous, Javier Botet, Cristina González-Aguilera, Maria José Quintero, Laia Viladevall, María L. García-Rubio, et al. 2009. « Genome-Wide Analysis of Factors Affecting Transcription Elongation and DNA Repair: A New Role for PAF and Ccr4-Not in Transcription-Coupled Repair ». *PLoS Genetics* 5 (2): e1000364. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000364>.
- Garces, Robert G., Wanda Gillon, et Emil F. Pai. 2007. « Atomic Model of Human Rcd-1 Reveals an Armadillo-like-Repeat Protein with in Vitro Nucleic Acid Binding Properties ». *Protein Science* 16 (2): 176-88. <https://doi.org/10.1110/ps.062600507>.
- Goldstrohm, Aaron C., Brad A. Hook, Daniel J. Seay, et Marvin Wickens. 2006. « PUF Proteins Bind Pop2p to Regulate Messenger RNAs ». *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (6): 533-39. <https://doi.org/10.1038/nsmb1100>.
- Goldstrohm, Aaron C., Daniel J. Seay, Brad A. Hook, et Marvin Wickens. 2007. « PUF Protein-Mediated Deadenylation Is Catalyzed by Ccr4p ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (1): 109-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609413200>.
- Gordon, David E., Ariane Watson, Assen Roguev, Simin Zheng, Gwendolyn M. Jang, Joshua Kane, Jiewei Xu, et al. 2020. « A Quantitative Genetic Interaction Map of HIV Infection ». *Molecular Cell* 78 (2): 197-209.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.02.004>.
- Guénolé, Aude, Fabien Velilla, Aymeric Chartier, April Rich, Anne-Ruxandra Carvunis, Claude Sardet, Martine Simonelig, et Bijan Sobhian. 2022. « RNF219 Regulates CCR4–NOT Function in mRNA Translation and Deadenylation ». *Scientific Reports* 12 (1): 9288. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13309-8>.

- Hanet, Aoife, Felix Räscher, Ramona Weber, Vincenzo Ruscica, Maria Fauser, Tobias Raisch, Duygu Kuzuoğlu-Öztürk, et al. 2019. « HELZ Directly Interacts with CCR4–NOT and Causes Decay of Bound mRNAs ». *Life Science Alliance* 2 (5). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900405>.
- Hanzawa, H., M. J. de Ruwe, T. K. Albert, P. C. van Der Vliet, H. T. Timmers, et R. Boelens. 2001. « The Structure of the C4C4 Ring Finger of Human NOT4 Reveals Features Distinct from Those of C3HC4 RING Fingers ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (13): 10185-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009298200>.
- Höpfner, Markus, Eva Absmeier, Sew-Yeu Peak-Chew, Evangelia Vartholomaiou, Lori A. Passmore, Ivana Gasic, et Ramanujan S. Hegde. 2023. « Mechanism of ribosome-associated mRNA degradation during tubulin autoregulation ». *Molecular Cell* 83 (13): 2290-2302.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.05.020>.
- Horiuchi, Masataka, Kosei Takeuchi, Nobuo Noda, Nobuyuki Muroya, Toru Suzuki, Takahisa Nakamura, Junko Kawamura-Tsuzuku, Kiyohiro Takahashi, Tadashi Yamamoto, et Fuyuhiko Inagaki. 2009. « Structural Basis for the Antiproliferative Activity of the Tob-hCaf1 Complex \* ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 13244-55. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809250200>.
- Hsieh, Hsin-Hui, Yen-An Chen, Yao-Jen Chang, Hsin-Hui Wang, Ya-Han Yu, Sheng-Wei Lin, Yin-Jung Huang, Steven Lin, et Ching-Jin Chang. 2021. « The Functional Characterization of Phosphorylation of Tristetraprolin at C-Terminal NOT1-Binding Domain ». *Journal of Inflammation (London, England)* 18 (1): 22. <https://doi.org/10.1186/s12950-021-00288-2>.
- Humphries, Elizabeth M., Kwangmi Ahn, Rachel L. Kember, Fabiana L. Lopes, Evelina Mocci, Juan M. Peralta, John Blangero, et al. 2023. « Genome-Wide Significant Risk Loci for Mood Disorders in the Old Order Amish Founder Population ». *Molecular Psychiatry* 28 (12): 5262-71. <https://doi.org/10.1038/s41380-023-02014-1>.
- Ikeuchi, Ken, Petr Tesina, Yoshitaka Matsuo, Takato Sugiyama, Jingdong Cheng, Yasushi Saeki, Keiji Tanaka, Thomas Becker, Roland Beckmann, et Toshifumi Inada. 2019. « Collided Ribosomes Form a Unique Structural Interface to Induce Hel2-Driven Quality Control Pathways ». *The EMBO Journal* 38 (5): e100276. <https://doi.org/10.15252/embj.2018100276>.
- Irie, K., K. Yamaguchi, K. Kawase, et K. Matsumoto. 1994. « The Yeast MOT2 Gene Encodes a Putative Zinc Finger Protein That Serves as a Global Negative Regulator Affecting Expression of Several Categories of Genes, Including Mating-Pheromone-Responsive Genes ». *Molecular and Cellular Biology* 14 (5): 3150-57. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.5.3150-3157.1994>.
- Jiang, Haoyang, Marley Wolgast, Laura M. Beebe, et Joseph C. Reese. 2019. « Ccr4-Not Maintains Genomic Integrity by Controlling the Ubiquitylation and Degradation of Arrested RNAPII ». *Genes & Development* 33 (11-12): 705-17. <https://doi.org/10.1101/gad.322453.118>.
- Jonstrup, Anette Thyssen, Kasper R. Andersen, Lan B. Van, et Ditlev E. Brodersen. 2007. « The 1.4-Å crystal structure of the *S. pombe* Pop2p deadenylase subunit unveils the configuration of an active enzyme ». *Nucleic Acids Research* 35 (9): 3153-64. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm178>.
- Keskeny, Csilla, Tobias Raisch, Annamaria Sgromo, Cátia Igreja, Dipankar Bhandari, Oliver Weichenrieder, et Elisa Izaurralde. 2019. « A Conserved CAF40-Binding Motif in Metazoan NOT4 Mediates Association with the CCR4–NOT Complex ». *Genes & Development* 33 (3-4): 236-52. <https://doi.org/10.1101/gad.320952.118>.
- Krempl, Christina, Daniela Lazzaretti, et Remco Sprangers. 2023. « A Structural Biology View on the Enzymes Involved in Eukaryotic mRNA Turnover ». *Biological Chemistry* 404 (11-12): 1101-21. <https://doi.org/10.1515/hsz-2023-0182>.
- Kruk, Jennifer A., Arnob Dutta, Jianhua Fu, David S. Gilmour, et Joseph C. Reese. 2011. « The multifunctional Ccr4–Not complex directly promotes transcription elongation ». *Genes & Development* 25 (6): 581-93. <https://doi.org/10.1101/gad.2020911>.
- Lau, Nga-Chi, Annemieke Kolkman, Frederik M. A. van Schaik, Klaas W. Mulder, W. W. M. Pim Pijnappel, Albert J. R. Heck, et H. Th. Marc Timmers. 2009. « Human Ccr4–Not Complexes Contain Variable Deadenylase Subunits ». *The Biochemical Journal* 422 (3): 443-53. <https://doi.org/10.1042/BJ20090500>.

- Lee, Sung Hak, Seung Hyun Jung, Tae-Min Kim, Je-Keun Rhee, Hyeon-Chun Park, Min Sung Kim, Sung Soo Kim, Chang Hyeok An, Sug Hyung Lee, et Yeun-Jun Chung. 2017. « Whole-Exome Sequencing Identified Mutational Profiles of High-Grade Colon Adenomas ». *Oncotarget* 8 (4): 6579-88. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14172>.
- Lee, Tong Ihn, John J. Wyrick, Sang Seok Koh, Ezra G. Jennings, Ellen L. Gadbois, et Richard A. Young. 1998. « Interplay of Positive and Negative Regulators in Transcription Initiation by RNA Polymerase II Holoenzyme ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (8): 4455-62.
- Leppeck, Kathrin, Johanna Schott, Sonja Reitter, Fabian Poetz, Ming C. Hammond, et Georg Stoecklin. 2013. « Roquin Promotes Constitutive mRNA Decay via a Conserved Class of Stem-Loop Recognition Motifs ». *Cell* 153 (4): 869-81. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.016>.
- Lim, Jaechul, Dongwan Kim, Young-suk Lee, Minju Ha, Mihye Lee, Jinah Yeo, Hyesik Chang, Jaewon Song, Kwangseog Ahn, et V. Narry Kim. 2018. « Mixed Tailing by TENT4A and TENT4B Shields mRNA from Rapid Deadenylation ». *Science* 361 (6403): 701-4. <https://doi.org/10.1126/science.aam5794>.
- Liu, H. Y., V. Badarinarayana, D. C. Audino, J. Rappsilber, M. Mann, et C. L. Denis. 1998. « The NOT Proteins Are Part of the CCR4 Transcriptional Complex and Affect Gene Expression Both Positively and Negatively ». *The EMBO Journal* 17 (4): 1096-1106. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1096>.
- Liu, H. Y., Y. C. Chiang, J. Pan, J. Chen, C. Salvatore, D. C. Audino, V. Badarinarayana, V. Palaniswamy, B. Anderson, et C. L. Denis. 2001. « Characterization of CAF4 and CAF16 Reveals a Functional Connection between the CCR4-NOT Complex and a Subset of SRB Proteins of the RNA Polymerase II Holoenzyme ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (10): 7541-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009112200>.
- Liu, Hai-Yan, Vasudeo Badarinarayana, Deborah C. Audino, Juri Rappsilber, Matthias Mann, et Clyde L. Denis. 1998. « The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively ». *The EMBO Journal* 17 (4): 1096-1106. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1096>.
- Mathys, Hansruedi, Jérôme Basquin, Sevim Ozgur, Mariusz Czarnocki-Cieciura, Fabien Bonneau, Aafke Aartse, Andrzej Dziembowski, Marcin Nowotny, Elena Conti, et Witold Filipowicz. 2014. « Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression ». *Molecular Cell* 54 (5): 751-65. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.036>.
- Mauxion, Fabienne, Jérôme Basquin, Sevim Ozgur, Marion Rame, Jana Albrecht, Ingmar Schäfer, Bertrand Séraphin, et Elena Conti. 2023. « The Human CNOT1-CNOT10-CNOT11 Complex Forms a Structural Platform for Protein-Protein Interactions ». *Cell Reports* 42 (1): 111902. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111902>.
- Mauxion, Fabienne, Brigitte Prève, et Bertrand Séraphin. 2013. « C2ORF29/CNOT11 and CNOT10 form a new module of the CCR4-NOT complex ». *RNA Biology* 10 (2): 267-76. <https://doi.org/10.4161/rna.23065>.
- Mersman, Douglas P., Hai-Ning Du, Ian M. Fingerman, Paul F. South, et Scott D. Briggs. 2009. « Polyubiquitination of the Demethylase Jhd2 Controls Histone Methylation and Gene Expression ». *Genes & Development* 23 (8): 951-62. <https://doi.org/10.1101/gad.1769209>.
- Mostafa, Dina, Akinori Takahashi, Akiko Yanagiya, Tomokazu Yamaguchi, Takaya Abe, Taku Kureha, Keiji Kuba, et al. 2020. « Essential functions of the CNOT7/8 catalytic subunits of the CCR4-NOT complex in mRNA regulation and cell viability ». *RNA Biology* 17 (3): 403-16. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1709747>.
- Mulder, Klaas W., Arjan B. Brenkman, Akiko Inagaki, Niels J. F. van den Broek, et H. Th Marc Timmers. 2007. « Regulation of Histone H3K4 Tri-Methylation and PAF Complex Recruitment by the Ccr4-Not Complex ». *Nucleic Acids Research* 35 (7): 2428-39. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm175>.
- Mulder, Klaas W., Akiko Inagaki, Elisabetta Cameroni, Florence Mousson, G Sebastiaan Winkler, Claudio De Virgilio, Martine A Collart, et H Th Marc Timmers. 2007. « Modulation of Ubc4p/Ubc5p-Mediated Stress Responses by the RING-Finger-Dependent Ubiquitin-Protein Ligase Not4p in *Saccharomyces cerevisiae* ». *Genetics* 176 (1): 181-92. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.060640>.

- Nakamura, Takahisa, Ryoji Yao, Takehiko Ogawa, Toru Suzuki, Chizuru Ito, Naoki Tsunekawa, Kimiko Inoue, et al. 2004. « Oligo-Astheno-Teratozoospermia in Mice Lacking Cnot7, a Regulator of Retinoid X Receptor Beta ». *Nature Genetics* 36 (5): 528-33. <https://doi.org/10.1038/ng1344>.
- Nasertorabi, Fariborz, Claire Batisse, Meikel Diepholz, Dietrich Suck, et Bettina Böttcher. 2011. « Insights into the structure of the CCR4-NOT complex by electron microscopy ». *Febs Letters* 585 (14): 2182-86. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.071>.
- Neely, G. Gregory, Keiji Kuba, Anthony Cammarato, Kazuya Isobe, Sabine Amann, Liyong Zhang, Mitsushige Murata, et al. 2010. « A global in vivo Drosophila RNAi screen identifies NOT3 as a conserved regulator of heart function ». *Cell* 141 (1): 142-53. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.023>.
- Oberholzer, U, et M. A Collart. 1998. « Characterization of NOT5 That Encodes a New Component of the Not Protein Complex ». *Gene* 207 (1): 61-69. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00605-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00605-7).
- Okochi, Kentaro, Toru Suzuki, Jun-ichiro Inoue, Satoru Matsuda, et Tadashi Yamamoto. 2005. « Interaction of Anti-Proliferative Protein Tob with Poly(A)-Binding Protein and Inducible Poly(A)-Binding Protein: Implication of Tob in Translational Control ». *Genes to Cells* 10 (2): 151-63. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2005.00826.x>.
- Ozgun, Sevim, Jérôme Basquin, Anastasiia Kamenska, Witold Filipowicz, Nancy Standart, et Elena Conti. 2015. « Structure of a Human 4E-T/DDX6/CNOT1 Complex Reveals the Different Interplay of DDX6-Binding Proteins with the CCR4-NOT Complex ». *Cell Reports* 13 (4): 703-11. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.033>.
- Panasenko, Olesya, Emilie Landrieux, Marc Feuermann, Andrija Finka, Nicole Paquet, et Martine A. Collart. 2006. « The Yeast Ccr4-Not Complex Controls Ubiquitination of the Nascent-Associated Polypeptide (NAC-EGD) Complex \* ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (42): 31389-98. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)84051-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)84051-6).
- Panasenko, Olesya O, Fabrice P A David, et Martine A Collart. 2009. « Ribosome Association and Stability of the Nascent Polypeptide-Associated Complex Is Dependent Upon Its Own Ubiquitination ». *Genetics* 181 (2): 447-60. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.095422>.
- Pavanello, Lorenzo, Michael Hall, et Gerlof Sebastiaan Winkler. 2023. « Regulation of Eukaryotic mRNA Deadenylation and Degradation by the Ccr4-Not Complex ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11 (avril). <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1153624>.
- Pekovic, Filip, Christiane Rammelt, Jana Kubíková, Jutta Metz, Mandy Jeske, et Elmar Wahle. 2023. « RNA Binding Proteins Smaug and Cup Induce CCR4-NOT-Dependent Deadenylation of the Nanos mRNA in a Reconstituted System ». *Nucleic Acids Research* 51 (8): 3950-70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad159>.
- Petit, Alain-Pierre, Lara Wohlbold, Praveen Bawankar, Eric Huntzinger, Steffen Schmidt, Elisa Izaurralde, et Oliver Weichenrieder. 2012. « The structural basis for the interaction between the CAF1 nuclease and the NOT1 scaffold of the human CCR4-NOT deadenylase complex ». *Nucleic Acids Research* 40 (21): 11058-72. <https://doi.org/10.1093/nar/gks883>.
- Pfannenstien, J., M. Tyryshkin, M.E Gulden, E.H. Doud, A. L. Mosley, et J.C. Reese. 2024. « Characterization of BioID tagging systems in budding yeast and exploring the interactome of the Ccr4-Not complex ». *bioRxiv*, mai, 2024.05.09.593354. <https://doi.org/10.1101/2024.05.09.593354>.
- Pfeufer, Arne, Serena Sanna, Dan E. Arking, Martina Müller, Vesela Gateva, Christian Fuchsberger, Georg B. Ehret, et al. 2009. « Common Variants at Ten Loci Modulate the QT Interval Duration in the QTSCD Study ». *Nature Genetics* 41 (4): 407-14. <https://doi.org/10.1038/ng.362>.
- Pillet, Benjamin, Alfonso Méndez-Godoy, Guillaume Murat, Sébastien Favre, Michael Stumpe, Laurent Falquet, et Dieter Kressler. 2022. « Dedicated Chaperones Coordinate Co-Translational Regulation of Ribosomal Protein Production with Ribosome Assembly to Preserve Proteostasis ». *eLife* 11 (mars):e74255. <https://doi.org/10.7554/eLife.74255>.
- Poetz, Fabian, Joshua Corbo, Yevgen Leviansky, Alexander Spiegelhalter, Doris Lindner, Vera Magg, Svetlana Lebedeva, et al. 2021. « RNF219 Attenuates Global mRNA Decay through Inhibition of CCR4-NOT

- Complex-Mediated Deadenylation ». *Nature Communications* 12 (1): 7175. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27471-6>.
- Presnyak, Vladimir, Najwa Alhusaini, Ying-Hsin Chen, Sophie Martin, Nathan Morris, Nicholas Kline, Sara Olson, et al. 2015. « Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability ». *Cell* 160 (6): 1111-24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.029>.
- Quan, Yujun, Meijiao Wang, Chengpeng Xu, Xiaoxiao Wang, Yu Wu, Dandan Qin, Yuxuan Lin, Xukun Lu, Falong Lu, et Lei Li. 2022. « Cnot8 Eliminates Naïve Regulation Networks and Is Essential for Naïve-to-Formative Pluripotency Transition ». *Nucleic Acids Research* 50 (8): 4414-35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac236>.
- Quenault, Tara, Trevor Lithgow, et Ana Traven. 2011. « PUF Proteins: Repression, Activation and mRNA Localization ». *Trends in Cell Biology* 21 (2): 104-12. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.013>.
- Raisch, Tobias, Dipankar Bhandari, Kevin Sabath, Sigrun Helms, Eugene Valkov, Oliver Weichenrieder, et Elisa Izaurralde. 2016. « Distinct modes of recruitment of the CCR4–NOT complex by Drosophila and vertebrate Nanos ». *The EMBO Journal* 35 (9): 974-90. <https://doi.org/10.15252/embj.201593634>.
- Raisch, Tobias, Chung-Te Chang, Yevgen Leviansky, Sowndarya Muthukumar, Stefan Raunser, et Eugene Valkov. 2019. « Reconstitution of Recombinant Human CCR4–NOT Reveals Molecular Insights into Regulated Deadenylation ». *Nature Communications* 10 (1): 3173. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11094-z>.
- Raisch, Tobias, Felix Sandmeir, Oliver Weichenrieder, Eugene Valkov, et Elisa Izaurralde. 2018. « Structural and Biochemical Analysis of a NOT1 MIF4G-like Domain of the CCR4–NOT Complex ». *Journal of Structural Biology* 204 (3): 388-95. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2018.10.009>.
- Raisch, Tobias, et Eugene Valkov. 2022. « Regulation of the Multisubunit CCR4–NOT Deadenylase in the Initiation of mRNA Degradation ». *Current Opinion in Structural Biology* 77 (décembre):102460. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2022.102460>.
- Sakai, A, T Chibazakura, Y Shimizu, et F Hishinuma. 1992. « Molecular analysis of POP2 gene, a gene required for glucose-derepression of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. » *Nucleic Acids Research* 20 (23): 6227-33.
- Sanders, Steven L., Jennifer Jennings, Adrian Canutescu, Andrew J. Link, et P. Anthony Weil. 2002. « Proteomics of the Eukaryotic Transcription Machinery: Identification of Proteins Associated with Components of Yeast TFIID by Multidimensional Mass Spectrometry ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (13): 4723-38. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.13.4723-4738.2002>.
- Sandler, Heike, Jochen Kreth, H. Th Marc Timmers, et Georg Stoecklin. 2011. « Not1 Mediates Recruitment of the Deadenylation Caf1 to mRNAs Targeted for Degradation by Tristetraprolin ». *Nucleic Acids Research* 39 (10): 4373-86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr011>.
- Sarmah, Hemanta, Kentaro Ito, Mari Kaneko, Takaya Abe, et Tadashi Yamamoto. 2020. « Loss of CNOT9 Begets Impairment in Gastrulation Leading to Embryonic Lethality ». *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.063172>.
- Schwede, Angela, Louise Ellis, Julia Luther, Mark Carrington, Georg Stoecklin, et Christine Clayton. 2008. « A role for Caf1 in mRNA deadenylation and decay in trypanosomes and human cells ». *Nucleic Acids Research* 36 (10): 3374-88. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn108>.
- Sgromo, Annamaria, Tobias Raisch, Charlotte Backhaus, Csilla Keskeny, Vikram Alva, Oliver Weichenrieder, et Elisa Izaurralde. 2018. « *Drosophila* Bag-of-Marbles Directly Interacts with the CAF40 Subunit of the CCR4–NOT Complex to Elicit Repression of mRNA Targets ». *RNA* 24 (3): 381-95. <https://doi.org/10.1261/rna.064584.117>.
- Sgromo, Annamaria, Tobias Raisch, Praveen Bawankar, Dipankar Bhandari, Ying Chen, Duygu Kuzuoğlu-Öztürk, Oliver Weichenrieder, et Elisa Izaurralde. 2017. « A CAF40-Binding Motif Facilitates Recruitment of the CCR4–NOT Complex to mRNAs Targeted by *Drosophila* Roquin ». *Nature Communications* 8 (1): 14307. <https://doi.org/10.1038/ncomms14307>.
- Sha, Qian-Qian, Jia-Li Yu, Jing-Xin Guo, Xing-Xing Dai, Jun-Chao Jiang, Yin-Li Zhang, Chao Yu, et al. 2018. « CNOT6L couples the selective degradation of maternal transcripts to meiotic cell cycle progression in mouse oocyte ». *The EMBO Journal* 37 (24): e99333. <https://doi.org/10.15252/embj.201899333>.

- Shah, Kriti, Shiyang He, David J. Turner, Joshua Corbo, Khadija Rebbani, Daniel Dominguez, Joseph M. Bateman, et al. 2024. « Regulation by the RNA-Binding Protein Unkempt at Its Effector Interface ». *Nature Communications* 15 (1): 3159. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47449-4>.
- Simonetti, Fabrizio, Tito Candelli, Sebastien Leon, Domenico Libri, et Mathieu Rougemaille. 2017. « Ubiquitination-dependent control of sexual differentiation in fission yeast ». Édité par Torben Heick Jensen. *eLife* 6 (août):e28046. <https://doi.org/10.7554/eLife.28046>.
- Stowell, James A.W., Michael W. Webster, Alexander Kögel, Jana Wolf, Kathryn L. Shelley, et Lori A. Passmore. 2016. « Reconstitution of Targeted Deadenylation by the Ccr4-Not Complex and the YTH Domain Protein Mmi1 ». *Cell Reports* 17 (8): 1978-89. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.10.066>.
- Stupfler, Benjamin, Catherine Birck, Bertrand Séraphin, et Fabienne Mauxion. 2016. « BTG2 Bridges PABPC1 RNA-Binding Domains and CAF1 Deadenylation to Control Cell Proliferation ». *Nature Communications* 7 (1): 10811. <https://doi.org/10.1038/ncomms10811>.
- Sun, Mai, Björn Schwalb, Daniel Schulz, Nicole Pirkel, Stefanie Etzold, Laurent Larivière, Kerstin C. Maier, Martin Seizl, Achim Tresch, et Patrick Cramer. 2012. « Comparative Dynamic Transcriptome Analysis (cDTA) Reveals Mutual Feedback between mRNA Synthesis and Degradation ». *Genome Research* 22 (7): 1350-59. <https://doi.org/10.1101/gr.130161.111>.
- Szot, Justin O., Hartmut Cuny, Gillian M. Blue, David T. Humphreys, Eddie Ip, Katrina Harrison, Gary F. Sholler, et al. 2018. « A Screening Approach to Identify Clinically Actionable Variants Causing Congenital Heart Disease in Exome Data ». *Circulation. Genomic and Precision Medicine* 11 (3): e001978. <https://doi.org/10.1161/CIRCGEN.117.001978>.
- Takahashi, Akinori, Toru Suzuki, Shou Soeda, Shohei Takaoka, Shungo Kobori, Tomokazu Yamaguchi, Haytham Mohamed Aly Mohamed, et al. 2020. « The CCR4-NOT Complex Maintains Liver Homeostasis through mRNA Deadenylation ». *Life Science Alliance* 3 (5): e201900494. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900494>.
- Takehara, Yuka, Hideki Yashiroda, Yoshitaka Matsuo, Xian Zhao, Akane Kamigaki, Tetsuo Matsuzaki, Hidetaka Kosako, Toshifumi Inada, et Shigeo Murata. 2021. « The Ubiquitination-Deubiquitination Cycle on the Ribosomal Protein eS7A Is Crucial for Efficient Translation ». *iScience* 24 (3). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102145>.
- Tang, Terence T. L., James A. W. Stowell, Chris H. Hill, et Lori A. Passmore. 2019. « The Intrinsic Structure of Poly(A) RNA Determines the Specificity of Pan2 and Caf1 Deadenylation ». *Nature Structural & Molecular Biology* 26 (6): 433-42. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0227-9>.
- Tang, Xiaojun, Xiaoping Lan, Xiaozhen Song, Wuhen Xu, Yuanfeng Zhang, Simei Wang, Man Xiao, Yongchen Yang, Hong Zhang, et Shengnan Wu. 2024. « Clinical Characteristics and Identification of Novel CNOT1 Variants in Three Unrelated Chinese Families with Vissers-Bodmer Syndrome ». *Heliyon* 10 (4): e26743. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e26743>.
- Temme, Claudia, Sophie Zaessinger, Sylke Meyer, Martine Simonelig, et Elmar Wahle. 2004. « A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in Drosophila ». *The EMBO Journal* 23 (14): 2862-71. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600273>.
- Temme, Claudia, Lianbing Zhang, Elisabeth Kremmer, Christian Ihling, Aymeric Chartier, Andrea Sinz, Martine Simonelig, et Elmar Wahle. 2010. « Subunits of the Drosophila CCR4-NOT Complex and Their Roles in mRNA Deadenylation ». *RNA* 16 (7): 1356-70. <https://doi.org/10.1261/rna.2145110>.
- Thore, Stéphane, Fabienne Mauxion, Bertrand Séraphin, et Dietrich Suck. 2003. « X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylation complex ». *EMBO reports* 4 (12): 1150-55. <https://doi.org/10.1038/sj.embo.7400020>.
- Tucker, M., M. A. Valencia-Sanchez, R. R. Staples, J. Chen, C. L. Denis, et R. Parker. 2001. « The Transcription Factor Associated Ccr4 and Caf1 Proteins Are Components of the Major Cytoplasmic mRNA Deadenylation in Saccharomyces Cerevisiae ». *Cell* 104 (3): 377-86. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00225-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00225-2).

- Tucker, Morgan, Robin R. Staples, Marco A. Valencia-Sanchez, Denise Muhlrade, et Roy Parker. 2002. « Ccr4p Is the Catalytic Subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA Deadenylation Complex in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The EMBO Journal* 21 (6): 1427-36. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.6.1427>.
- Ukleja, Marta, Jorge Cuellar, Aleksandra Siwaszek, Joanna M. Kasprzak, Mariusz Czarnocki-Cieciura, Janusz M. Bujnicki, Andrzej Dziembowski, et Jose M. Valpuesta. 2016. « The architecture of the *Schizosaccharomyces pombe* CCR4-NOT complex ». *Nature Communications* 7 (janvier):10433. <https://doi.org/10.1038/ncomms10433>.
- Ukleja, Marta, José María Valpuesta, Andrzej Dziembowski, et Jorge Cuellar. 2016. « Beyond the Known Functions of the CCR4-NOT Complex in Gene Expression Regulatory Mechanisms ». *BioEssays* 38 (10): 1048-58. <https://doi.org/10.1002/bies.201600092>.
- Van Etten, Jamie, Trista L. Schagat, Joel Hrit, Chase A. Weidmann, Justin Brumbaugh, Joshua J. Coon, et Aaron C. Goldstrohm. 2012. « Human Pumilio Proteins Recruit Multiple Deadenylation Complexes to Efficiently Repress Messenger RNAs ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (43): 36370-83. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373522>.
- Vissers, Lisenka E. L. M., Sreehari Kalvakuri, Elke de Boer, Sinje Geuer, Machteld Oud, Inge van Outersterp, Michael Kwint, et al. 2020. « De Novo Variants in CNOT1, a Central Component of the CCR4-NOT Complex Involved in Gene Expression and RNA and Protein Stability, Cause Neurodevelopmental Delay ». *American Journal of Human Genetics* 107 (1): 164-72. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.05.017>.
- Wang, Hui, Masahiro Morita, Xiuna Yang, Toru Suzuki, Wen Yang, Jiao Wang, Kentaro Ito, et al. 2010. « Crystal structure of the human CNOT6L nuclease domain reveals strict poly(A) substrate specificity ». *The EMBO Journal* 29 (15): 2566-76. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.152>.
- Webster, Michael W., Ying-Hsin Chen, James A. W. Stowell, Najwa Alhusaini, Thomas Sweet, Brenton R. Graveley, Jeff Collier, et Lori A. Passmore. 2018. « mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases ». *Molecular Cell* 70 (6): 1089-1100.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.033>.
- Wickens, Marvin, David S. Bernstein, Judith Kimble, et Roy Parker. 2002. « A PUF Family Portrait: 3'UTR Regulation as a Way of Life ». *Trends in Genetics* 18 (3): 150-57. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02616-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02616-6).
- Winkler, G. Sebastiaan. 2010. « The Mammalian Anti-Proliferative BTG/Tob Protein Family ». *Journal of Cellular Physiology* 222 (1): 66-72. <https://doi.org/10.1002/jcp.21919>.
- Wu, Qiushuang, Santiago Gerardo Medina, Gopal Kushawah, Michelle Lynn DeVore, Luciana A Castellano, Jacquelyn M Hand, Matthew Wright, et Ariel Alejandro Bazzini. 2019. « Translation affects mRNA stability in a codon-dependent manner in human cells ». Édité par Nahum Sonenberg, Kevin Struhl, et Jonathan S Weissman. *eLife* 8 (avril):e45396. <https://doi.org/10.7554/eLife.45396>.
- Wu, Tingting, Xi Chen, et Xingxing Zhang. 2024. « Vissers-Bodmer Syndrome Caused by a Novel de Novo CNOT1 Frameshift Variant ». *American Journal of Medical Genetics. Part A* 194 (2): 363-67. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63439>.
- Wu, Zhihao, Yan Wang, Junghyun Lim, Boxiang Liu, Yanping Li, Rasika Vartak, Trisha Stankiewicz, Stephen Montgomery, et Bingwei Lu. 2018. « Ubiquitination of ABCE1 by NOT4 in Response to Mitochondrial Damage Links Co-Translational Quality Control to PINK1-Directed Mitophagy ». *Cell Metabolism* 28 (1): 130-144.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.05.007>.
- Xu, Kun, Yuwei Bai, Aili Zhang, Qionglian Zhang, et Mark G. Bartlam. 2014. « Insights into the structure and architecture of the CCR4-NOT complex ». *Frontiers in Genetics* 5 (mai):137. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00137>.
- Yamaji, Masashi, Miki Jishage, Cindy Meyer, Hemant Suryawanshi, Evan Der, Misaki Yamaji, Aitor Garzia, et al. 2017. « DND1 Maintains Germline Stem Cells via Recruitment of the CCR4-NOT Complex to Target mRNAs ». *Nature* 543 (7646): 568-72. <https://doi.org/10.1038/nature21690>.

- Yamashita, Akio, Tsung-Cheng Chang, Yukiko Yamashita, Wenmiao Zhu, Zhenping Zhong, Chyi-Ying A. Chen, et Ann-Bin Shyu. 2005. « Concerted Action of Poly(A) Nucleases and Decapping Enzyme in Mammalian mRNA Turnover ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (12): 1054-63. <https://doi.org/10.1038/nsmb1016>.
- Yi, Hyerim, Joha Park, Minju Ha, Jaechul Lim, Hyeshik Chang, et V. Narry Kim. 2018. « PABP Cooperates with the CCR4-NOT Complex to Promote mRNA Deadenylation and Block Precocious Decay ». *Molecular Cell* 70 (6): 1081-1088.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.009>.
- Zhang, Li, Ngoc-Tung Tran, Hairui Su, Rui Wang, Yuheng Lu, Haiping Tang, Sayura Aoyagi, et al. 2015. « Cross-Talk between PRMT1-Mediated Methylation and Ubiquitylation on RBM15 Controls RNA Splicing ». *eLife* 4 (novembre):e07938. <https://doi.org/10.7554/eLife.07938>.
- Zhang, Qionglin, Lorenzo Pavanello, Alexey Potapov, Mark Bartlam, et Gerlof Sebastiaan Winkler. 2022. « Structure of the Human Ccr4-Not Nuclease Module Using X-Ray Crystallography and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy Distance Measurements ». *Protein Science* 31 (3): 758-64. <https://doi.org/10.1002/pro.4262>.
- Zhao, Qi, Lorenzo Pavanello, Mark Bartlam, et Gerlof Sebastiaan Winkler. 2023. « Structure and Function of Molecular Machines Involved in Deadenylation-Dependent 5'-3' mRNA Degradation ». *Frontiers in Genetics* 14 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fgene.2023.1233842>.
- Zheng, Dinghai, Nader Ezzeddine, Chyi-Ying A. Chen, Wenmiao Zhu, Xiangwei He, et Ann-Bin Shyu. 2008. « Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells ». *Journal of Cell Biology* 182 (1): 89-101. <https://doi.org/10.1083/jcb.200801196>.
- Zheng, Xiaofeng, Pengyi Yang, Brad Lackford, Brian D. Bennett, Li Wang, Hui Li, Yu Wang, et al. 2016. « CNOT3-Dependent mRNA Deadenylation Safeguards the Pluripotent State ». *Stem Cell Reports* 7 (5): 897-910. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.09.007>.

## 7. Présentation du projet

La dégradation des ARNm contribue de manière essentielle, et complémentaire à la transcription, à la régulation de leur niveau, et par conséquent, au contrôle de l'expression des gènes. Comme détaillé ci-dessus, chez les eucaryotes, la principale voie de dégradation des ARNm commence par la déadénylation, un processus catalysé principalement par le complexe CCR4-NOT (Schwede et al., 2008). Chez la levure *S. cerevisiae*, des données préliminaires issues d'un crible protéomique à grande échelle suggèrent une interaction entre la sous-unité Caf130, du complexe CCR4-NOT et la sous-unité Btt1 du NAC<sup>Btt1</sup> (Ito et al. 2001; Krogan et al. 2006; Cui et al. 2008). Pour rappel, ce complexe est impliqué dans le repliement des polypeptides naissants lors de leur sortie du tunnel du ribosome et il est composé d'Egd2 et de, soit Egd1 soit Btt1 chez la levure.

L'interaction Caf130-Btt1 pourrait donc coupler le repliement des protéines lors de la traduction et l'initiation de la dégradation de l'ARNm par la déadénylation. A partir de cette observation, l'hypothèse de base de ma thèse est que, lorsque le repliement d'une protéine est lent et/ou défectueux, le NAC recrute le complexe CCR4-NOT via l'interaction Btt1/Caf130, induisant ainsi la déadénylation de l'ARNm codant cette protéine (Figure 12).

Peu après le début de ma thèse, une publication est venue étayer notre hypothèse. Cet article provient d'une équipe étudiant la biogénèse du ribosome, un processus impliquant des chaperonnes spécifiques telles que Rrb1 ou Acl4, respectivement impliquées dans le repliement des protéines ribosomales Rpl3 et Rpl4. La délétion du gène *ACL4* générant un fort défaut de croissance, des mutations suppresseurs spontanées améliorant la prolifération cellulaire ont été obtenues et caractérisées et se sont trouvées être des mutations de *CAF130*, *CAL4*, *NOT1* et *RPL4A* (Pillet et al., 2022). Les auteurs ont confirmé que la délétion des gènes *CAF130*, *CAL4* mais aussi de *BTT1* supprimait le phénotype de croissance dû à la délétion d'*acl4* chez la levure *S. cerevisiae*. De plus, en l'absence de leurs chaperonnes dédiées, les niveaux des ARNm codant Rpl3 et Rpl4 étaient réduits, mais que ce défaut était moindre en l'absence de *CAF130* ou de facteurs associés. Ainsi, il a été proposé que lorsque la production des protéines Rpl3 ou Rpl4 est supérieure à la quantité de leurs chaperonnes dédiées disponibles, le NAC se lie à ces protéines naissantes et recrute le complexe CCR4-NOT via Caf130, induisant la dégradation des ARNm correspondants (Pillet et al., 2022).

Ces observations soutiennent notre hypothèse initiale selon laquelle la synthèse d'une protéine naissante en excès et/ou incapable de se replier correctement entraîne la détection de cette situation spécifique, induisant la déadénylation ciblée de l'ARNm en cours de traduction, et en conséquence sa dégradation.

Dans ce contexte, les objectifs de ma thèse ont visé à étudier l'organisation et la fonction du module de Caf130. Pour ce faire, j'ai entrepris de :

- Identifier et valider l'interactome de Caf130.

J'ai tout d'abord déterminé les protéines interagissant avec Caf130 en réalisant une purification par la méthode TAP (Tandem Affinity Purification) suivie d'une analyse par spectrométrie de masse. Les interactions avec les protéines partenaires directes de Caf130 ont été cartographiées par double hybride et confirmées par expression et purification de complexes recombinants. De plus, j'ai validé l'interaction de Caf130 avec le ribosome, qui avait été suggéré par les résultats de spectrométrie de masse, en effectuant des gradients de polysomes.

- Générer un modèle structural du module de Caf130.

Mes données ont servi de base pour des études de modélisation structurale par AlphaFold de l'association de Caf130 avec ses partenaires. Le modèle structural positionnant tous les partenaires sur Caf130 est solide.

- Valider ce modèle et approfondir la compréhension des interactions entre Caf130 et ses partenaires

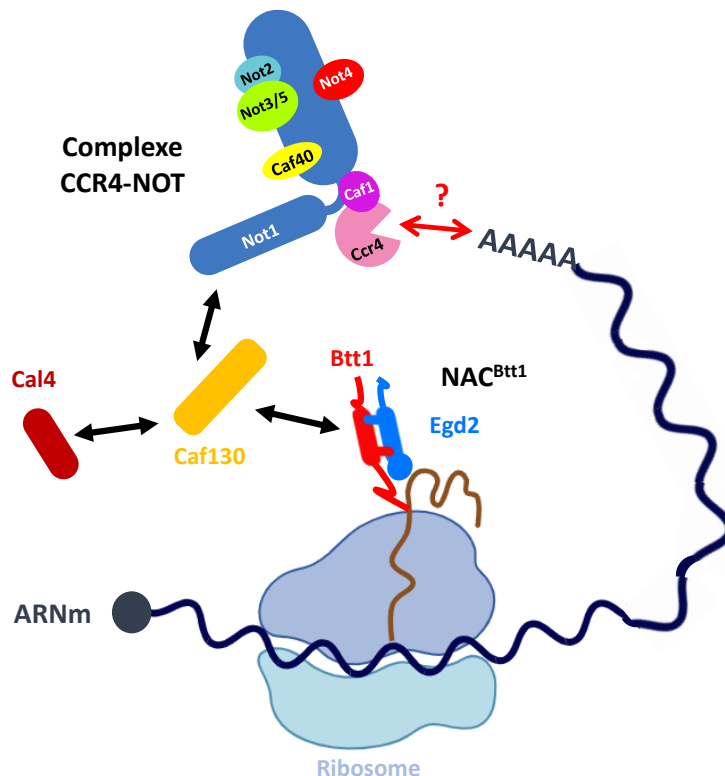
Ce modèle structural robuste est également étayé par les données d'interactions issues de tests double hybride. De plus, il a ensuite été utilisé pour affiner la construction d'opérons codant des combinaisons de protéines contenant des étiquettes de purification. Après leur expression dans des bactéries, des purifications en plusieurs étapes ont permis de produire des sous-complexes avec des rendements satisfaisants.

- Explorer le rôle potentiel d'autres facteurs dans ce processus de contrôle de qualité.

Un test phénotypique a été mis au point pour évaluer l'impact de l'absence d'Acl4, chaperonne spécifique de Rpl4, sur la croissance des levures. La délétion du gène *ACL4* entraîne une forte réduction de croissance, mais ce défaut est corrigé lorsque le gène *caf130* est également supprimé (Pillet et al., 2022). Cette stratégie nous a permis de tester les phénotypes des partenaires de Caf130.

- Évaluer la similarité entre la protéine CNOT11 et Caf130 des complexes CCR4-NOT de l'humain et de *S. cerevisiae*, respectivement.

Des recherches à haute sensibilité de similarités de séquences basées sur un « modèle de Markov caché (HMM) », ainsi que notre modèle structural, nous ont permis de mettre en évidence des similitudes inattendues entre CNOT11 humain et Caf130 levure dans plusieurs régions, notamment la région C-terminale de CNOT11 essentielle pour l'interaction avec l'un de ses partenaires.



**Figure 12 : Représentation schématique du modèle.**

L'interaction de Btt1, la sous-unité  $\beta$  du NAC, avec Caf130, une sous-unité du complexe CCR4-NOT, permet le recrutement d'une déadénylase pour initier la dégradation d'un ARNm lorsque le repliement de la protéine qu'il code est lent et/ou défectueux.

# Résultats

La partie suivante des résultats de mon travail de thèse a été rédigée en anglais pour servir de base à un article scientifique. Cet article vise à présenter l'identification du module Caf130 du complexe CCR4-NOT de la levure, à définir et valider son organisation, et à préciser la fonction de ce groupe de protéines. Ce module est constitué des protéines Not1, Btt1, Egd2, Caf130 et Cal4, et interagit avec le ribosome. Pour cela, nous avons combiné des approches de purifications biochimiques et des tests d'interactions protéiques avec une modélisation AlphaFold. Au cours de ces travaux, nos analyses ont révélé également des similarités insoupçonnées entre les protéines CNOT11 et Caf130 des complexes CCR4-NOT humain et de levure, suggérant une fonction conservée. Finalement, l'étude fonctionnelle de ce module au travers de tests phénotypiques a permis d'affiner son mode d'interaction avec le ribosome lors du ciblage d'ARNm codant pour des protéines naissantes potentiellement délétères. Par ailleurs, les analyses de cryo EM, une fois finalisées, viendront compléter ce manuscrit afin qu'il puisse être soumis.

# **The NAC-complex docks the yeast CCR4-NOT Caf130 module to the ribosome for nascent protein-dependent mRNA deadenylation**

**Guillaume Caulier, Fabienne Mauxion, Bertrand Séraphin**

## RESULTS

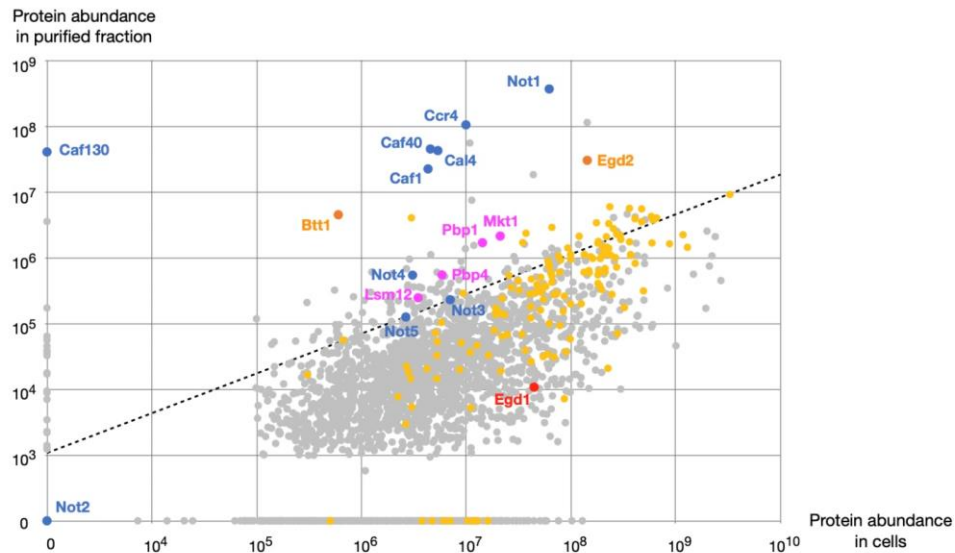
### Interactome of the N-terminal module of the CCR4-NOT complex in *Saccharomyces cerevisiae*

To get insights into the organization and cellular integration of the N-terminal module of CCR4-NOT in *S. cerevisiae*, we purified Caf130 using the TAP purification method (Puig et al. 2001). Plotting the level of the copurifying partners estimated by mass spectrometry versus their abundance in extract (Figure 1A) revealed the enrichment of the CCR4-NOT complex, including the recently described Cal4 associated factor as the top partners. Additional copurifying factors included the two NAC  $\alpha$  and  $\beta$  subunits Egd2 and Btt1. The presence of Egd2 was unexpected as previous analyses had suggested that Btt1 interacted with Caf130 in its absence (Pillet et al. 2022). Interestingly, the alternative yeast  $\beta$ -NAC subunit, Egd1, was among the less enriched partners despite being more abundant than its Btt1 counterpart demonstrating that association with the latter is specific. Other complexes and proteins associated with Caf130 included the Pbp1 complex that has been functionally connected to mRNA decay and translation, and some translation factors including ribosomal proteins (Figure 1A). Concerning the latter, one should take into account that, given their very high abundance in extracts, that largely exceeds the level of Caf130, one can expect at most a modest enrichment.

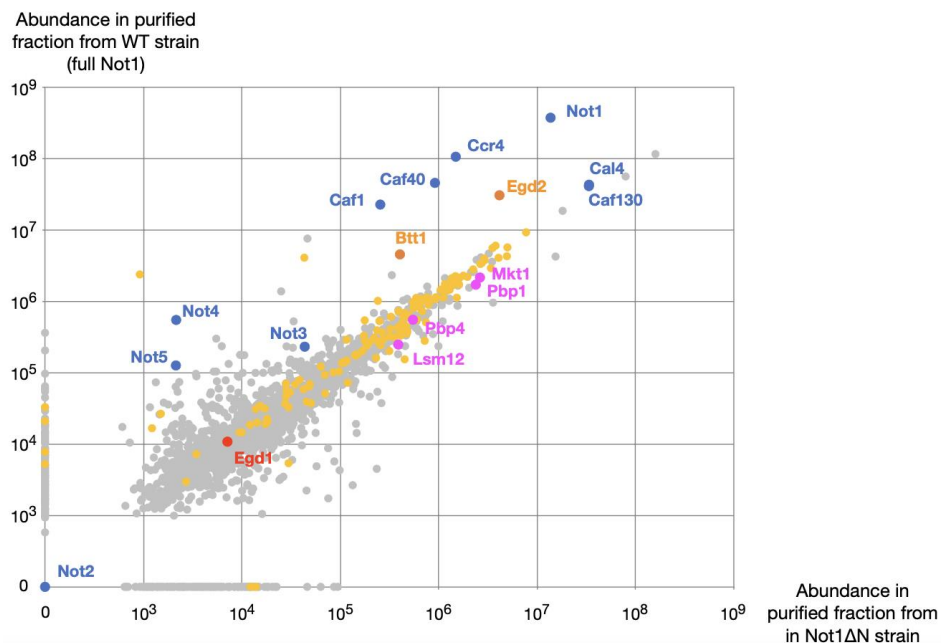
We and others have shown that Caf130 associate with the N-terminus of Not1 (Pillet et al. 2022). Thus, to assess the specificity of the purification, we performed a second TAP purification of Caf130 from a strain carrying a deletion of the 162 N-terminal residues of Not1. Comparing the two purifications (Figure 1B) demonstrated that association of Caf130 with other CCR4-NOT subunits occurred via its interaction with Not1. The only exception was Cal4 that was as efficiently co-purified from the two strains indicating a direct interaction with Caf130. Interestingly, Egd2 and Btt1 were co-purified from both strains but slightly more efficiently from the strain carrying full-length Not1. This suggests that the NAC<sup>Btt1</sup> complex binds Caf130-Cal4 but that this interaction is stabilized when the N-terminus of Not1 is present. Other co-purifying factors including the Pbp1 complex and translation factors were enriched to a similar extent whether the N-terminus of Not1 was present or not.

Overall, these data suggest that Caf130 associates with Cal4, Egd2, Btt1, and the N-terminus of Not1 to form a specific assembly that does not appear to contain additional component.

A



B



**Figure 1: Identifying partners of Caf130 by TAP purification – mass spectrometry.** (A) Proteins were identified and quantified by label-free mass spectrometry following TAP purification of Caf-130-TAP and from the starting extract. The log of the protein abundance in the TAP-purified sample is plotted as a function of the log of the protein abundance in extract based on the extracted ion chromatography intensity of the peptides. Proteins not identified in the TAP-purified sample or in extract are presented on the axes labelled “0”. Points above the dotted line represent the 5% most enriched proteins taking into account that background signal increases with protein abundance in extract. For this purpose, the dotted line is parallel to the best fit line of the whole distribution excluding points identified only in

one of the two samples. Points are colored according to the protein function: blue: CCR4-NOT complex including Cal4, orange: NAC<sup>Btt1</sup>, red: Egd1, pink: Pbp1 complex, yellow: ribosome and translation factors, grey: all other points. (B) Comparison of the proteins identified and quantified following the TAP purification of Caf-130-TAP presented in (A) with those from the TAP purification of Caf-130-TAP in a Not1 ( $\Delta N$ -terminal) strain. The log of the protein abundance in the TAP-purified samples are plotted with proteins not identified in one or the other sample presented on the axes labelled "0". Color are as in (A).

### Validating and mapping Caf130 interaction with partners

To validate the affinity purification – mass spectrometry results and decipher the network of interaction between the components of the Caf130 module, we employed the two-hybrid tests. The host yeast strain was transformed with plasmids encoding full-length Caf130 fused to the Gal4 DNA Binding Domain (DBD) together with Not1, Egd1, Btt1, Egd2, or Cal4 fused to the Gal4 transcription Activation Domain (AD). Empty vectors were also included as specificity controls. Interaction signals were monitored by quantifying  $\beta$ -galactosidase production. Significant signals were detected for Caf130 with Btt1, Not1, or Cal4 (Figure 2A). This supports an interaction between these factors. Surprisingly, no signal was detected for the Egd2 - Caf130 pair. However, negative results are poorly informative because a given fusion protein may poorly enter the nucleus or interfere with transcription activation. Further, high level of endogenous Egd1 and Egd2 proteins may compete with the corresponding fusion proteins, while the low-copy Btt1 factor may not. Overall, the two-hybrid assay supports interactions between Caf130 and Btt1, Cal4 or Not1.

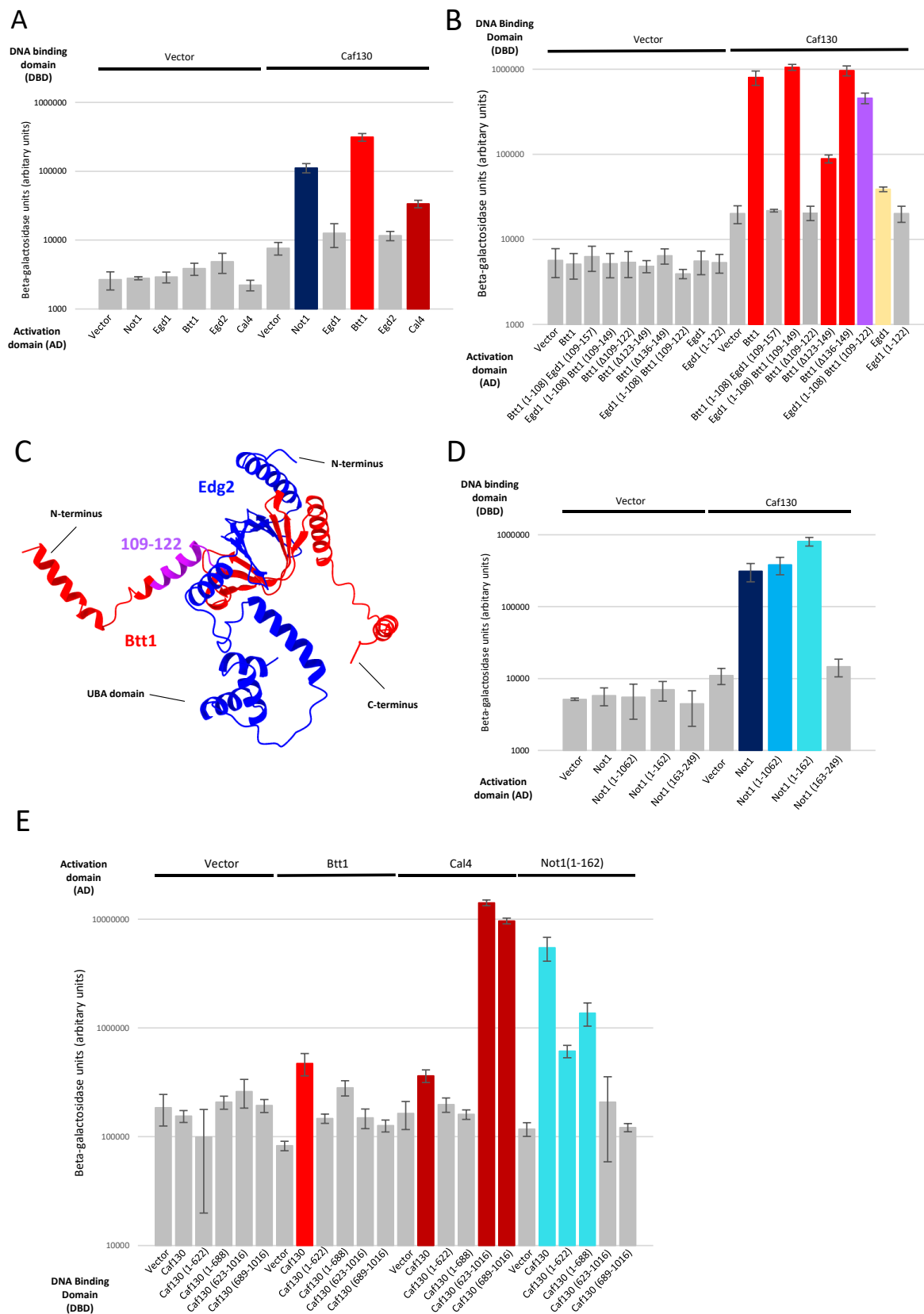
To assess whether Egd2 is important implicated in the Caf130 module assembly, we generated an Egd2 deletion in the yeast host strain used to perform two-hybrid assays. This host strain was transformed with plasmids encoding full-length Caf130 and truncation variants fused to the Gal4 DNA Binding Domain (DBD), together with Btt1, Cal4, or Not1(1-162) fused to the Gal4 AD. Empty vectors were included as specificity controls. In the absence of Egd2, the signal for the Caf130 - Btt1 pair is significantly reduced, whereas signals corresponding to Caf130 interaction with Cal4 and Not1 remain unchanged (Figure 2E). This argues that Egd2 is required for efficient interaction between Caf130 and Btt1, supporting its presence in the Caf130 module.

The results obtained above suggest that the two-hybrid assay could map residues differing between Btt1 and Egd1 that are responsible for their differential binding to Caf130. Indeed, Btt1 and Egd1 have the same structural organization and share 46% identity, but behave in an opposite manner in this interaction assay. Truncated and chimera of Btt1 and Egd1 proteins were constructed to map their interactions with Caf130 using two-hybrid assays (Figure 2B-S2). Those confirmed interaction between Btt1 and Caf130 and showed only background-level or a slight interaction between Caf130 and Egd1, consistent with earlier findings (Figure 2A-S2). Since Btt1 and Egd1 differ mainly in their C-terminus (Figure S1), we tested whether these residues were implicated in binding specificity. When the Btt1 region (109-149) was substituted by the homologous Egd1 region (109-157), the resulting protein could no longer interact with Caf130 (Figure 2B-S2). Conversely, grafting the Btt1 region (109-149) onto Egd1(1-108) enabled the chimera to bind Caf130 (Figure 2B-S2). This indicates that Btt1 C-terminal region confers the ability to bind Caf130 when present in a  $\beta$ -NAC subunit. Further deletion of amino acids 109-122 abolished binding, indicating that this region is critical for interaction with Caf130. To confirm this observation, a chimera of Egd1 (1-108) with Btt1(109-122) was constructed and showed strong signal for binding to Caf130, whereas the truncated Egd1 (1-122) control did not. Overall, these results demonstrate that, in the context of a  $\beta$ -NAC scaffold, amino acids 109-122 of Btt1 are necessary and sufficient for interaction with Caf130, while downstream residues are not necessary. This amino acid region corresponds essentially to a  $\alpha$  helix in a Btt1 structural model (Figure 2C).

To determine the region of Not1 necessary for Caf130 binding (Figure 2D), a series of Not1 truncations were analysed by two-hybrid assays. Given that Not1 and its derivatives tend to induce transcription when bound to the DBD, a single orientation was tested. Positive signals were observed with Caf130 in the presence of both full-length Not1 and derivatives encompassing the Not1 N-terminus. The smallest region of Not1 interacting with Caf130 contained amino acids 1-162. Consistently, constructs lacking this region, e.g., Not1(163-249), failed to interact with Caf130. Consistent with previous data, our results indicate that Caf130 specifically binds to the extreme N-terminal region 1-162 of Not1. Notably, this Not1 region is sufficient for the interaction and is significantly conserved in Eukaryotes (Figure S3).

Taken together, these data confirm that Caf130, Btt1, Egd2, Cal4 and the N-terminus of Not1 forms an independent module with Caf130 forming the central scaffold that interacts

minimally with Not1<sub>N</sub>, Btt1 and Cal4. The region 109-122 of Btt1 is required for its interaction with Caf130 while amino acids 1-162 of Not1 are sufficient Caf130 binding.



**Figure 2: Validating and mapping interactions of Caf130 with its partners.** (A) Results of interaction tests between Caf130 and Not1, Egd1, Btt1, Egd2 and Cal4. Protein interactions were monitored by quantitating  $\beta$ -galactosidase activity (arbitrary units) in the two-hybrid assay. Three biological replicates were tested and average and standard error values were plotted on a logarithmic scale. A Kruskal-Wallis test rejected homogeneity with a P value lower than 0.0001. Signals corresponding to background are represented in grey. Positive results were observed for Not1 (dark blue), for Btt1 (red) and for Cal4 (dark red). (B) Mapping of the region of Btt1 required for interaction with Caf130 using the two-hybrid assay. Conditions were the same as in (A). A Kruskal-Wallis test rejected homogeneity with a P value lower than 0.01. Positive signals were detected for Btt1 (red), for Egd1(1-108)-Btt1(109-149) (red), for Btt1( $\Delta$ 123-149) (red), for Btt1( $\Delta$ 136-149) (red), for Egd1(1-108)-Btt1(109-122) (purple), and a slight positive signal for Egd1 (yellow). Note that background absolute levels and signals (arbitrary units) varied from one experiment to the next but that relative intensities were conserved. (C) The region required for Btt1 interaction with Caf130 (amino acids 109-122, purple) is plotted on an AlphaFold3 prediction of the *S. cerevisiae* NAC<sup>Btt1</sup> structure complex with other residues of Btt1 in red and Egd2 in blue. (D) Mapping the region of Not1 required and sufficient for interaction with Caf130 using the two-hybrid assay. Conditions were the same as in (A). A Kruskal-Wallis test rejected homogeneity with a P value lower than 0.0001. Positive signals are shown for Not1 (dark blue), for Not1 (1-1062) (light blue) and for Not1 (1-162) (cyan). (E) Egd2 is important for interaction between Caf130 and Btt1. Conditions were the same as in (A), except that the assays were carried out in a  $\Delta$ egd2 yeast host strain. For Caf130 and Btt1, a weak positive result was observed (red). For Cal4, positive results were observed for Caf130, Caf130(623-1016), Caf130(689-1016) (dark red). For Not1(1-162), positive results were observed for Caf130, Caf130(1-622), Caf130 (1-688) (cyan).

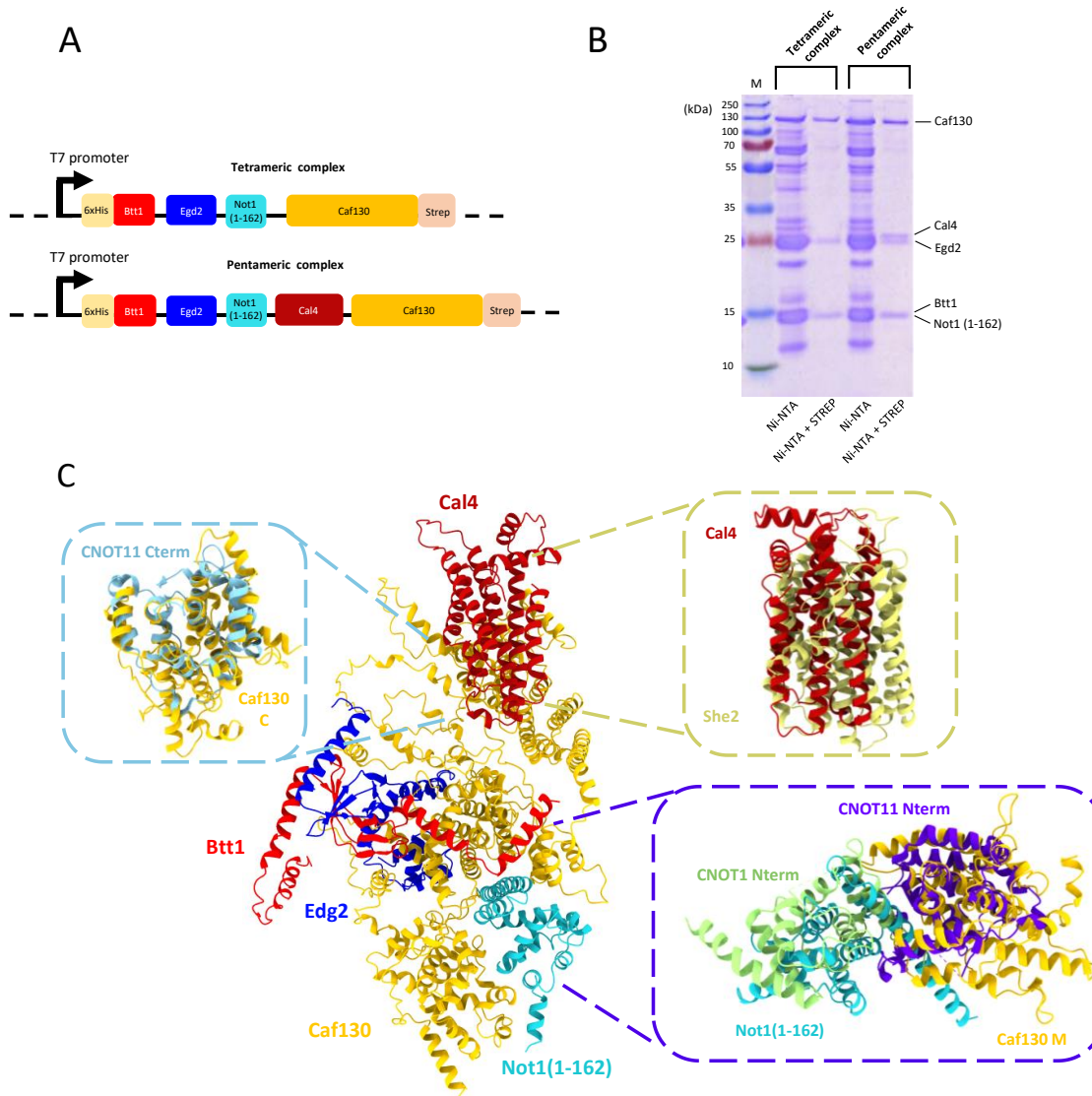
## **Validation and structural modelling of the Caf130 module of the *Saccharomyces cerevisiae* CCR4-NOT complex**

To validate that Caf130, Btt1, Egd2, Cal4, and residues 1-162 of Not1 (Not1<sub>N</sub>) form an independent structural module, we constructed operons to express these proteins recombinantly. Two plasmids were made either containing or excluding Cal4 (Figure 3A). In both cases, the Caf130 coding sequence was codon optimized, a 6His tag was appended to the N-terminus of Btt1, and a Strep tag at the C-terminus of Caf130. Proteins were purified from extracts derived from *E. coli* grown in auto-induction media by two successive steps of affinity chromatography. Proteins in the tetrameric complex (Caf130-Btt1-Egd2-Not1<sub>N</sub>) co-purify efficiently and stoichiometrically (Figure 3B). While a previous study suggested that Egd2 is not part of the Caf130 module, our TAP purification data and two-hybrid assay data with a yeast strain lacking Egd2, along with this result, confirms its presence within the module. When the Cal4 coding sequence was present, an additional band corresponding to the latter protein was detected (Figure 3B). The identity of all bands was confirmed by mass spectrometry analyses (Figure S4). Taken together, these observations demonstrate that

Caf130, Btt1, Egd2, Not1<sub>N</sub> and Cal4 interact directly and form a stable and soluble assembly. No other yeast protein appears to be required for the formation of this complex. In particular, Cal4 is not required for the association of the other partners in a stable entity.

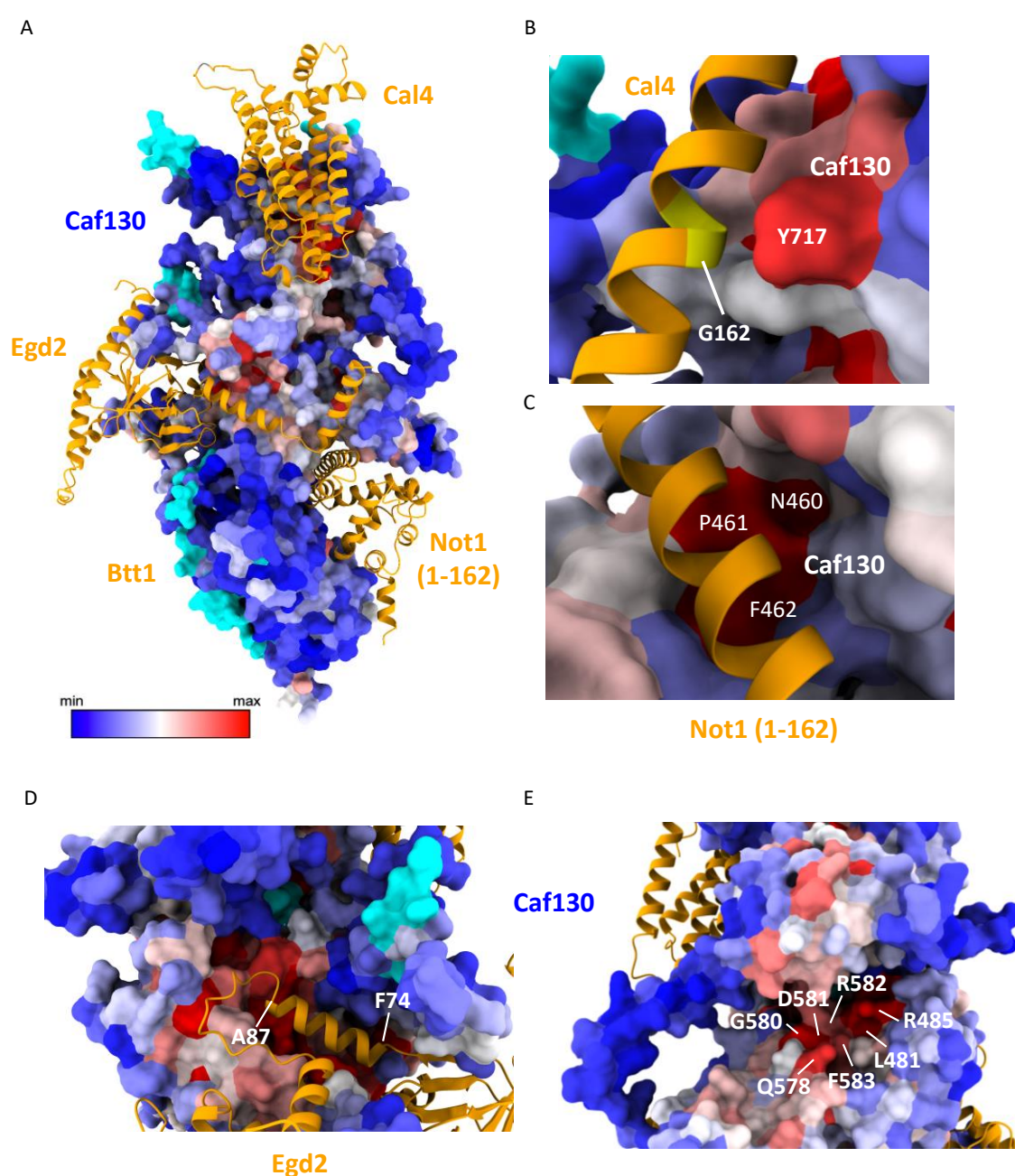
As Caf130, Btt1, Egd2, Not1<sub>N</sub> and Cal4 form a stable complex, we used AlphaFold3 (Abramson et al. 2024) to model its structure (Figure 3C). Consistent results were obtained and with significant scores for both intra-subunit and inter-subunit folds (Figure S5). The central core of the assembly was predicted with very high to high scores and only a limited number of peripheral elements had low or very low confidence. Caf130 appears nearly exclusively constituted of  $\alpha$  helices and essentially divided into 3 major domains: N, M and C, along the protein N to C axis. Not1<sub>N</sub> forms a globular domain that appears sandwiched between the N and M domains of Caf130 while Btt1-Egd2 adopt the previously known NAC complex structure. Both Btt1 and Egd2 contact the Caf130 M domain without interacting with Not1<sub>N</sub>. Interestingly, in this orientation, the residues of Btt1 identified to be required and sufficient for association with Caf130 contact directly the latter. Finally, Cal4 interacts with the Caf130 C domain without contacting other factors. Overall, this model is fully compatible with our TAP purification, two-hybrid interaction, and recombinant protein expression data.

Individual protein domains were used to find similar proteins in structural databases (Holm et Laakso 2016) while sensitive sequence similarity searches using Hidden Markov Model (HMM) (Eddy 1998) were performed to find related factors. This revealed that the Caf130 C domain sequence and fold resemble the recently described CNOT11 C-terminal domain (Mauxion et al. 2022) (Figure 3C). Moreover, the Caf130 M domain and associated Not1<sub>N</sub> were structurally similar to the human CNOT11 N-terminal domain and CNOT1 N-terminal domain, respectively (Figure 3C). Together, this indicates that yeast Caf130 and human CNOT11 are related, the yeast protein lacking the extended middle region of the human factor that associates with CNOT10 and containing an additional N-terminal domain without obvious counterpart in sequence or structural databases. In addition, comparison of the predicted structure of Cal4 revealed that it resembles the yeast She2 RNA binding protein (Figure 3C-S5). Overall, these observations reveal an unexpected evolutionary link between the Caf130 module of the yeast CCR4-NOT complex and the CNOT10-CNOT11 module of its metazoan counterpart.



**Figure 3: Assaying interactions between Caf130 and its partners for a structural study.** (A) Schematic representation of the organization of the two operons used for recombinant protein expression. The tetrameric complex consists of Btt1-STREP, Egd2, Not1(1-162) and codon-optimized Caf130x6His, while the pentameric complex includes the same factors with Cal4 in addition. (B) Coomassie-stained SDS-PAGE analysis of purifications of the tetrameric and pentameric complexes by two step affinity chromatography: first using Ni-NTA and subsequently STREP beads. Note that Egd2 (19 kDa) migrates aberrantly around 25 kDa. (C) AlphaFold3 prediction of the Caf130 module of yeast CCR4-NOT complex: Caf130 (orange), Not1<sub>N</sub> (cyan), Btt1 (red), Egd2 (dark blue) and Cal4 (dark red). Top left inset: The C-terminal domain of CNOT11 (330-510) (PDB : 8BFI, (Mauxion et al. 2022)) in light blue aligns with the C-terminal region of Caf130 (694-1021) (C) in orange, with an Root Mean Square Deviation (RMSD) on CA positions (or on all atom positions) of 0.71 Å. Top right inset: The predicted structure of Cal4 (dark red) shows alignment with the determined structure of an RNA-binding protein She2 (yellow) She2 (yellow) (PDB: 1XLY, (Niessing et al. 2004)), with an RMSD of 1.16 Å. Bottom right inset: The N-terminal domain of CNOT11 (56-280) in dark blue aligns with the middle region (M) of Caf130 (298-599) in yellow, along with the 1-162 region of CNOT1<sub>N</sub> (green) and Not1<sub>N</sub> (cyan), with an RMSD of 1.17 Å.

Plotting the evolutionary conservation of Caf130 on the predicted structure provides important information. In particular, contact sites between the different partners are usually conserved (Figure 4A-D). Intriguingly, a binding groove that accommodates an  $\alpha$  helix of Egd2 (Figure 4D) appears more conserved than the surface discriminating Btt1 from Egd1 (Figure 4A). This may suggest that Egd2 binding is the main contributor for the NAC<sup>Btt1</sup> complex binding to Caf130 while Btt1 would provide additional interaction energy as well as specificity. A few other Caf130 surfaces are also conserved and may bind transiently to other factors. Surprisingly, this includes an extensive area between the two sub-modules composing the complex (Figure 4E).



**Figure 4: Visualization of residue conservation across different yeast species within the Caf130 module and its interacting partners.** (A) The AlphaFold3 prediction of Caf130 module, annotated with residue conservation. A color gradient from the most conserved residue (red) to the least conserved (blue) represents conservation levels. The interacting partners of Caf130: Cal4, Btt1, Egd2, and Not1(1-162) are shown in orange. (B) The highly conserved residue Y717 of Caf130 (in red) is positioned opposite G162 (in yellow) on Cal4 (in orange), informing the choice of the G162V point mutation. (C) A conserved patch of Caf130, comprising residues N460, P461, and F462, is located near a helix of Not1(1-162) (in orange), supporting the selection of the point mutants N460A and P461A. (D) The second helix of Egd2 (in orange), spanning residues F74 to A87, fits into a highly conserved cavity of Caf130 (in light and dark red). (E) A highly conserved pocket in Caf130 (in light and dark red), composed of residues L481, R485, Q578, D580, D581, R582, and F583, may serve as a potential interaction region.

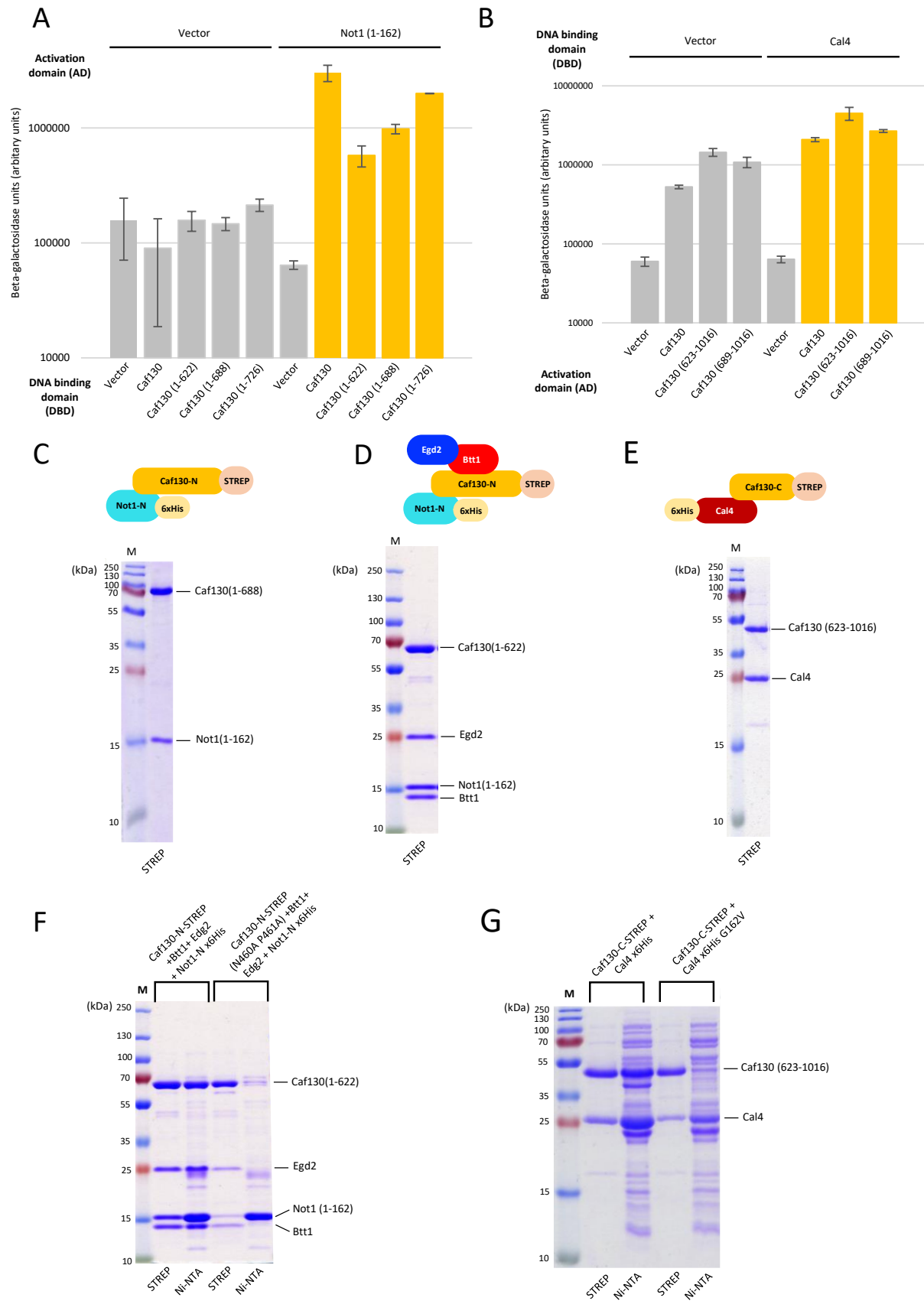
### Validating the AlphaFold predicted model of the Caf130 module

In the AlphaFold model, domains N and M of Caf130 contacts Not1<sub>N</sub> and Egd2-Btt1 while the C domain binds Cal4 (Figure 3C). To validate this prediction, we tested using the two-hybrid assay whether Caf130 can be subdivided in domains interacting with Not1<sub>N</sub> and Cal4. We observed indeed that constructs Caf130(1-622), Caf130(1-688) and Caf130(1-726) bind to Not1(1-622) while Caf130(689-1016) and Caf130 (623-1016) bind Cal4 (Figure 5A). Consistently, two-hybrid assays performed in the *Δegd2* host strain indicate that Not1<sub>N</sub> binds Caf130(1-622) or Caf130(1-688) but not Caf130(689-1016) and Caf130 (623-1016) while the reciprocal interaction was observed for Cal4 (Figure 2E).

To further strengthen the AlphaFold model, we constructed operons to express and purify the predicted sub-modules. A single-step Strep purification of proteins expressed from an operon encoding Caf130(1-688)-Strep and 6His-Not1<sub>N</sub> resulted in a stoichiometric heterodimeric complex (Figure 5C). When the coding sequences of Btt1 and Egd2 were added to this first construct, a complex containing the four proteins Caf130(1-688)-Strep, Btt1, Egd2 and 6His-Not1<sub>N</sub> was purified (Figure 5D). These results validate the existence of the corresponding sub-module and show further that Not1<sub>N</sub> binds Caf130(1-688) independently of the presence or absence of the NAC. Similarly, a single-step Strep purification of proteins expressed from a plasmid encoding Caf130(623-1016) and Cal4 recovered a stoichiometric heterodimeric complex (Figure 5E). Overall, the two-hybrid and recombinant proteins expression data support the AlphaFold predicted model including regions of interaction and independent binding of the different subunits.

To get more precise validation of the interaction sites predicted by AlphaFold, we tested whether amino acid substitutions in the predicted interaction areas reduce subunit

association. A highly conserved motif (N460, P461, F462) was identified in the N-terminal region of both CNOT11 and Caf130, forming a contact interface with CNOT1<sub>N</sub> and Not1<sub>N</sub> (Figure 4C). A double mutant N460A and P461A was introduced into the operon encoding the corresponding sub-module, 6His-Not1<sub>N</sub>-Btt1-Egd2-Caf130(1-688)-Strep and the resulting complex was purified by affinity chromatography using either Ni-NTA or STREP beads. Compared to the purifications of the wild-type construct that yielded roughly homogenous heterotetrameric complexes, purifications from the mutant construct with STREP beads recovered the mutated Caf130(1-688) with only reduced levels of Btt1, Egd2 and traces of Not1<sub>N</sub> (Figure 5F). Conversely, affinity purification with Ni-NTA media recovered essentially Not1<sub>N</sub> with only traces of the three other subunits. Altogether, these observations indicate that N460 and P461 of Caf130 are critical for Not1 binding. Further, reduced Not1 binding also decreased the co-purification of Btt1 and Egd2 suggesting that these factors may bind cooperatively possibly owing to the stabilization of the Caf130 M domain. To alter the Caf130-Cal4 interface, we substituted G162 in Cal4 with a valine in an operon encoding 6His-Cal4 and Caf130(623-1016)-Strep. The G162V was previously identified as inhibiting Cal4 function (Pillet et al. 2022). Proteins expressed from this construct and a wild-type control were purified either by Ni-NTA or STREP affinity chromatography. While heterodimeric complexes were recovered from cells containing the wild-type plasmid, proteins expressed from the mutant construct were enriched in the captured protein relative to its partner (Figure 5G) consistent with the G162V substitution impairing Cal4-Caf130 association. Taken together, the data obtained are fully consistent with the interaction scheme predicted in the structural AlphaFold model.



**Figure 5: Characterization of interaction domains between Caf130 and its binding partners.** (A) Two-hybrid assays indicate that the N-terminal region of Caf130 binds Not1<sub>N</sub>. Conditions were the same as in Fig. 2A. Positive signals were detected for Caf130, Caf130(1-622), Caf130(1-688) and Caf130 (1-726) (orange). (B) Two-hybrid assays indicate that the C-terminal region of Caf130 binds Cal4. Conditions were the same as in Fig. 2A. Positive signals were detected for Caf130, Caf130(623-1016) and Caf130 (689-1016) (orange). (C-D-E) Purification of recombinant sub-modules. At the top, schematic representations of the proteins expressed from each operon. Bottom, Coomassie-stained SDS-PAGE analyses of the single step affinity purified fractions. (C) STREP purification of Caf130 (1-688)-STREP and 6His-Not1<sub>N</sub>. (D) STREP purification of Caf130(1-688)-STREP, Btt1, Egd2 and 6His-Not1<sub>N</sub>. (E) STREP purification of Caf130(623-1016)-STREP and 6His-Cal4. (F-G) Purification of submodules carrying mutations in predicted interaction surfaces. Coomassie-stained SDS-PAGE analysis of the fraction recovered from independent Ni-NTA or STREP affinity purifications. (F) Comparison of profiles of fractions purified from operons encoding 6His-Not1(1-162)-Btt1-Egd2-Caf130(1-688)-STREP with either wild-type Caf130 or Caf130(N460A P461A). (G) Purifications of proteins expressed from an operon encoding 6His-Cal4(G162V) and Caf130 (623-1016)-STREP. Results obtained with the wild-type operon are shown as control.

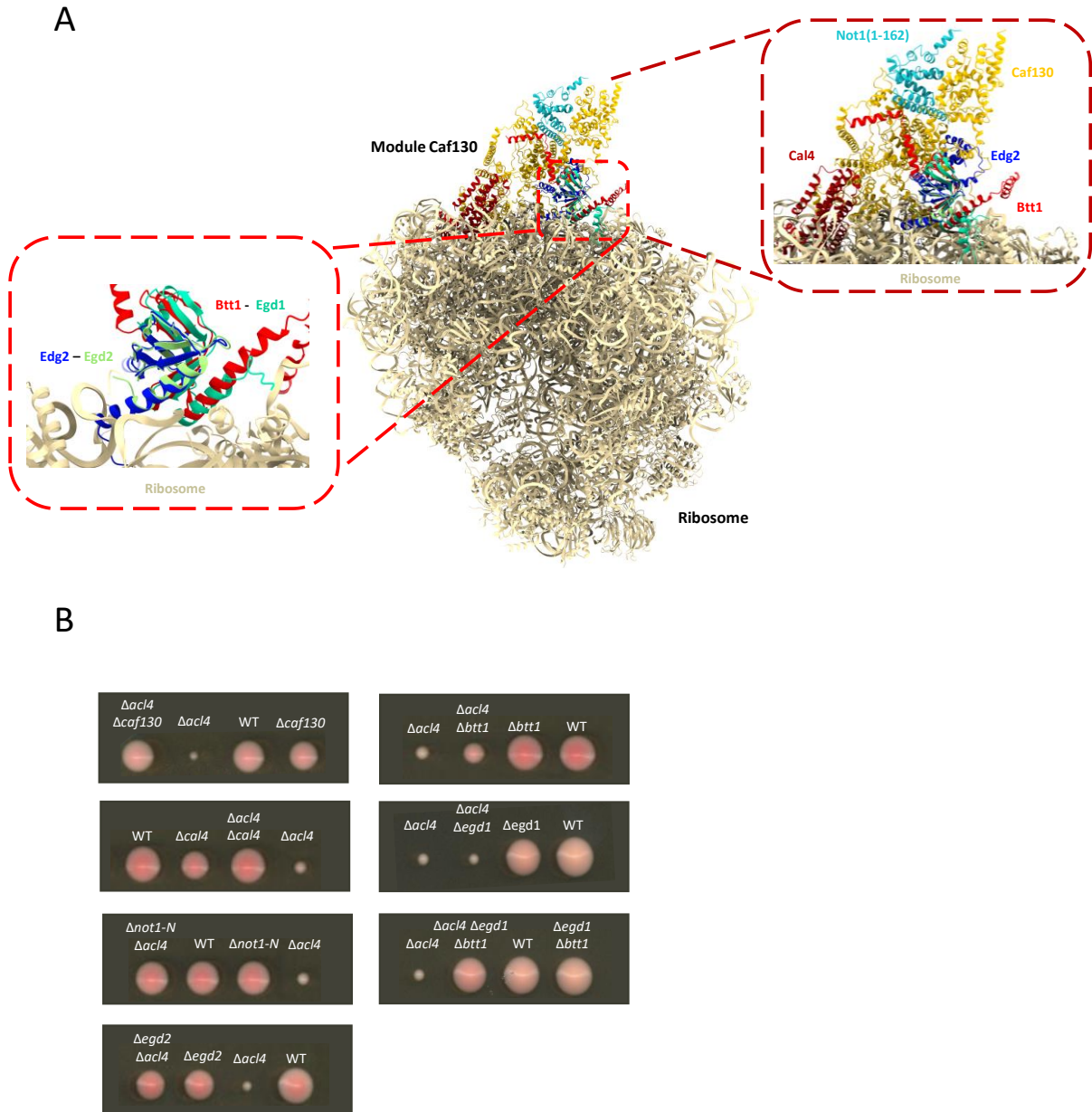
## Docking of the Caf130 module to ribosomes

The availability of a structural model of the Caf130 module containing the NAC<sup>Btt1</sup> complex allowed us to test how the module would dock to ribosomes. Superposing the conserved NAC complex core of the AlphaFold model onto the structure of a human ribosome bound to the NAC complex (Gamerding et al. 2023) reveals that the Caf130 module would position near the ribosome tunnel from which emerges the nascent protein (Fig. 6A). The Caf130 module covers a small surface area of the ribosome with limited steric clashes supporting the value of this model and further arguing that the positioning of the NAC<sup>Btt1</sup> on Caf130 is relevant. It also suggests that Cal4 might interact with ribosomal RNA and/or proteins (Fig. 6A).

## Assaying the Caf130 module function reveals overlapping roles of Btt1 and Egd1

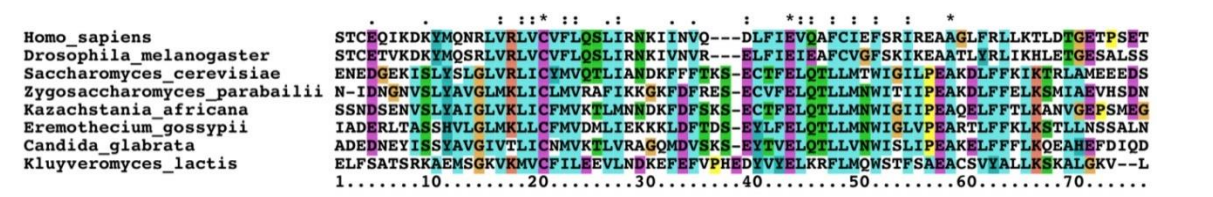
Functional analyses were performed using the suppression of the growth defect conferred by *acl4* inactivation that occurs when Caf130 is inactivated (Pillet et al. 2022). Consistent with the previous results, deletions of *caf130*, *cal4* or *not1<sub>N</sub>* almost completely suppressed the  $\Delta$ *acl4* growth defect while having themselves little impact on growth (Figure 6B). Even though Egd2 was reported not to be associated with the Caf130 module (Pillet et al. 2022), its deletion also rescued the  $\Delta$ *acl4* growth defect (Figure 6B). This supports its implication in the same biological pathway as its partners and strongly argues for its presence

in the Caf130 module, in agreement with affinity purification results and AlphaFold modeling. While inactivation of Egd1 had no suppressing effect as anticipated, deletion of *btt1* resulted in surprisingly only a partial suppression (Figure 6B). However, full suppression was detected when both Btt1 and Egd1 were inactivated (Figure 6B). This observation reveals overlapping roles of Btt1 and Egd1. This suggests that, in the absence of *btt1*, Caf130 can interact with the Egd1/Egd2 NAC complex albeit more weakly than with the Btt1/Egd2 complex. This interaction would still enable the CCR4-NOT complex to associate with ribosomes translating Rpl4, particularly when Rpl4 encounters folding difficulties. Several observations support this proposal including the strong similarity between the NAC<sup>Btt1</sup> and NAC<sup>Egd1</sup> complexes that would both associate to Caf130; the main contacts being provided by Egd2 while Egd1 or Btt1 would only modulate the final binding affinity.

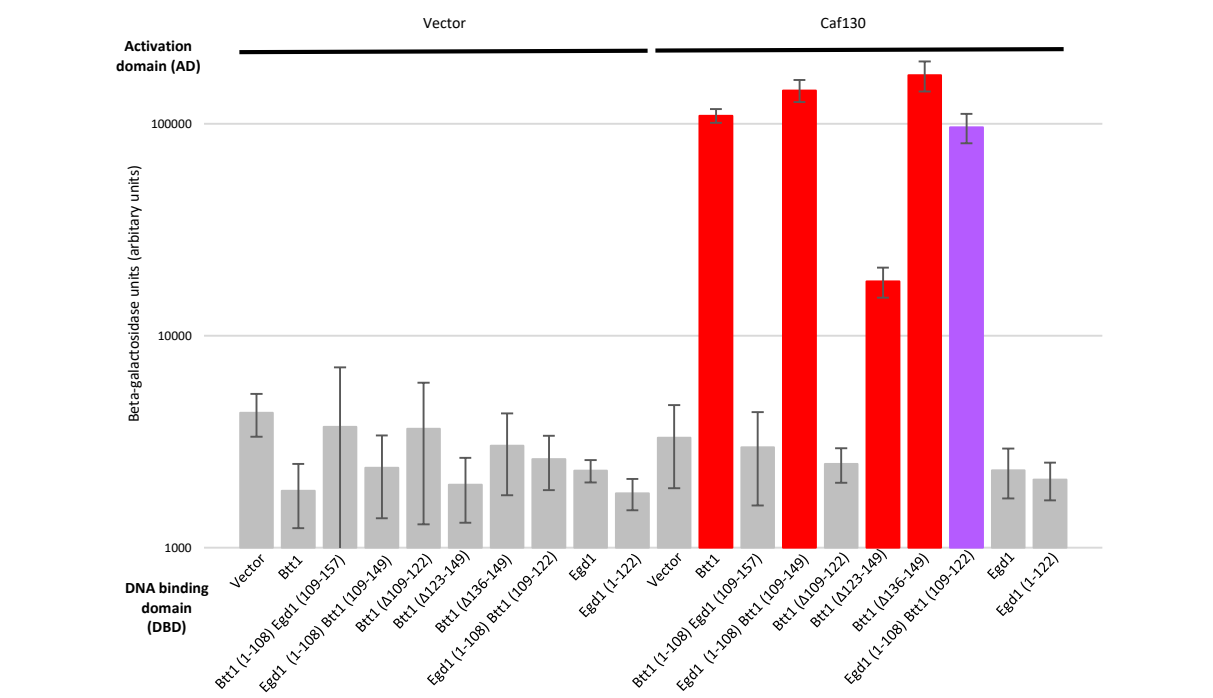


**Figure 6: Recruitment of the CCR4-NOT N-terminal module to the ribosome is maintained by Egd1 in the absence of Btt1.** (A) Docking of the Caf130 module, predicted by AlphaFold3, onto the experimentally determined ribosome structure associated to the human NAC complex (PDB : 8P2K, (Gamerding et al. 2023)). The ribosome is depicted in beige, with the human NAC complex (Egd1 (green) and Egd2 (light green)). The Caf130 module is visualized with Caf130 (orange), Btt1 (red), Egd2 (dark blue), Not1N (cyan) and Cal4 (dark red). (B) Suppression of the  $\Delta acl4$  mutation by mutants of the Caf130 module. Growth was monitored by following the size of colonies resulting from spored issues from the sporulation of heterozygous diploid cells on YPDA plates. Plate images were captured 5 days post-dissection.

Supplementary data



**Figure S1: Conservation between the C-terminal regions of human CNOT11 and yeast Caf130.** Sequence alignment of part of the C-terminal domain of CNOT11 (human) with Caf130 (*S. cerevisiae*) and other species, using CLUSTAL W software.



**Figure S2: Mapping of the region of Btt1 required for interaction with Caf130 using the two-hybrid assay.** Protein interactions were monitored by quantitating  $\beta$ -galactosidase activity (arbitrary units) in the two-hybrid assay. Three biological replicates were tested and average and standard error values were plotted on a logarithmic scale. A Kruskal-Wallis test rejected homogeneity with a P value lower than 0.0001. Positive signals were detected for Btt1 (red), for Egdl(1-108)-Btt1(109-149) (red), for Btt1(Δ123-149) (red), for Btt1(Δ136-149) (red) and for Egdl(1-108)-Btt1(109-122) (purple). Note that background absolute levels and signals (arbitrary units) varied from one experiment to another but that relative intensities were conserved.

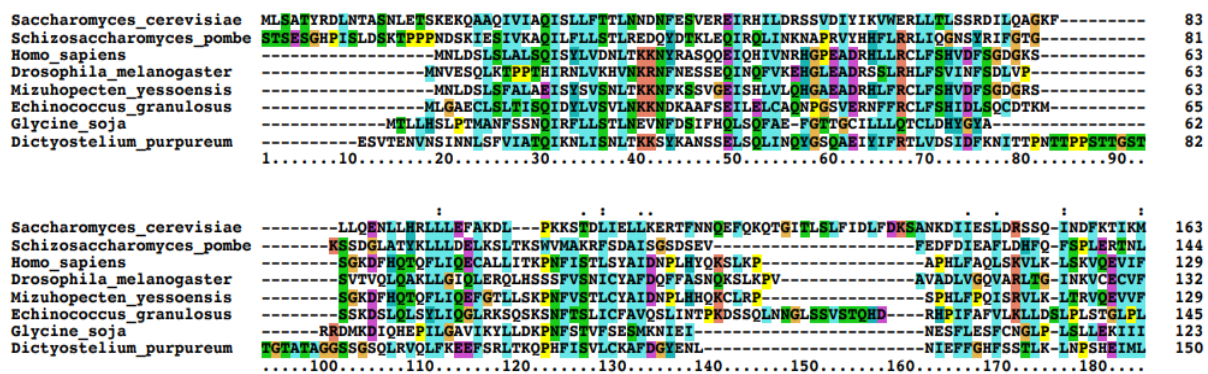
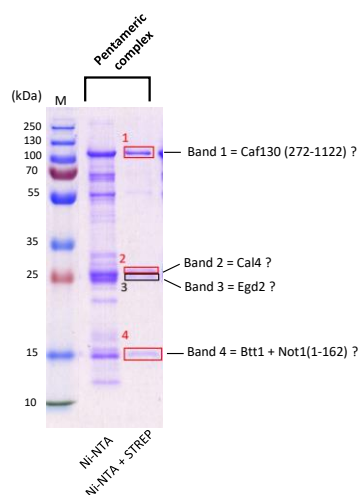
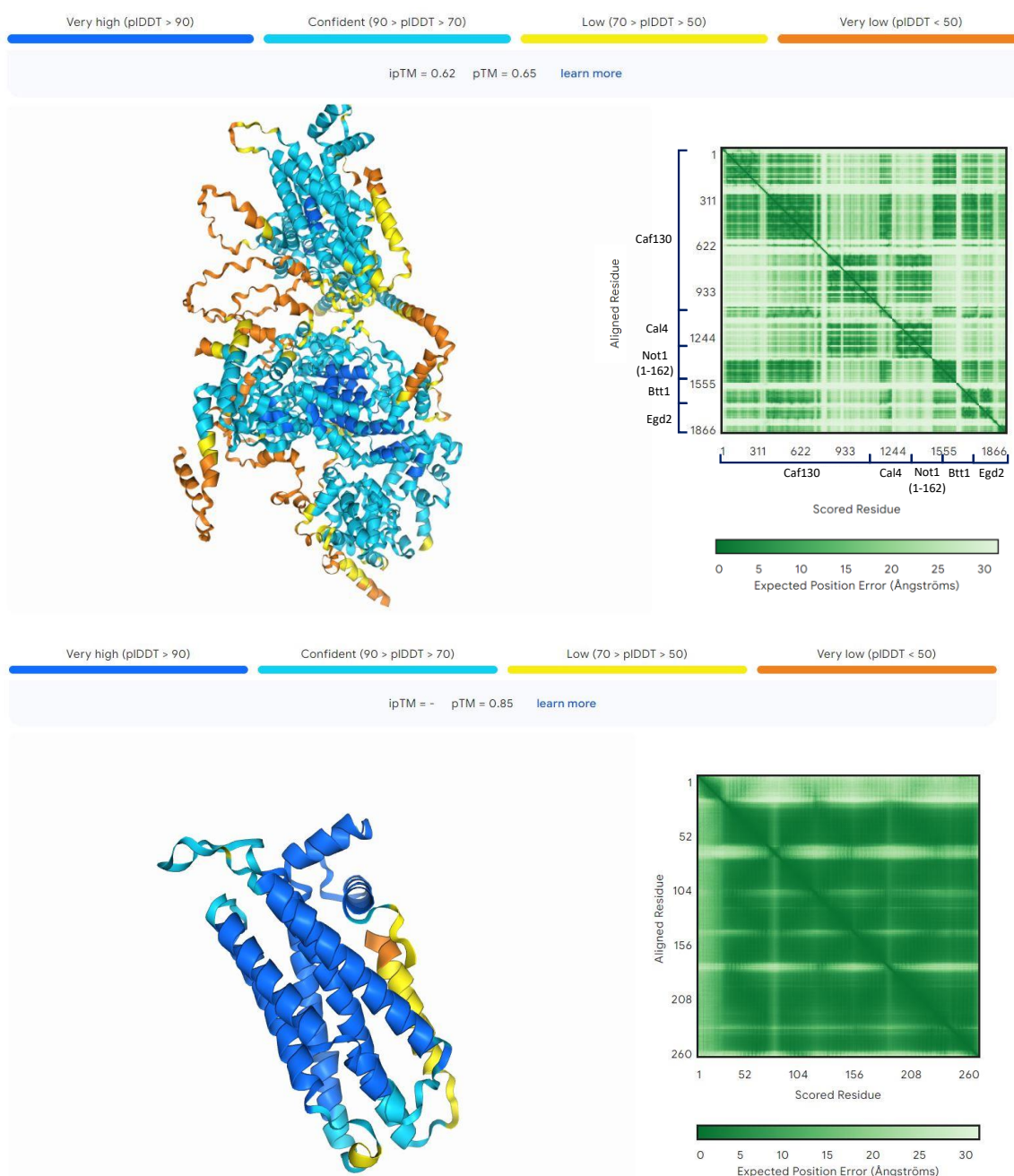


Figure S3: Sequence alignment of a part of the N-terminal region of Not1 (*S. cerevisiae*) with CNOT1 (human) and homologs from other species, generated using CLUSTALX software.



	Description	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs	MW [kDa]
1	BL21 seq3 : Caf130 (272-1122) x6His	70	52	242	98,5
	Chaperone protein DnaK OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=dnaK PE=1 SV=2	31	13	14	69,1
	Elongation factor Tu 2 OS=Escherichia coli (strain K12) OX=83333 GN=tufB PE=1 SV=1	35	11	11	43,3
	Description	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs	MW [kDa]
2	Uncharacterized protein YJR011C OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=YJR011C PE=1 SV=1	75	19	91	30,5
	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=EGD2 PE=1 SV=3	55	8	22	18,7
	General negative regulator of transcription subunit 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=CDC39 (=Not1) PE=1 SV=3	3	7	8	240,1
	Description	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs	MW [kDa]
3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=EGD2 PE=1 SV=3	55	8	27	18,7
	Uncharacterized protein YJR011C OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=YJR011C PE=1 SV=1	42	12	12	30,5
	General negative regulator of transcription subunit 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=CDC39 (=Not1) PE=1 SV=3	2	6	6	240,1
	Description	Coverage [%]	# Peptides	# PSMs	MW [kDa]
4	BL21 seq1 : Btt1-STREP	45	4	26	17,8
	General negative regulator of transcription subunit 1 OS=Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) OX=559292 GN=CDC39 PE=1 SV=3	3	6	7	240,1
	BL21 seq2 : Not1(1-162)	33	6	7	18,8

**Figure S4: Validation of protein identities within the purified Caf130 complete module.** The top panel shows a coomassie-stained SDS-PAGE analysis of purifications of the pentameric complex (Btt1-STREP, Egd2, Not1(1-162), Cal4 (the previous name of Cal4 is YJR011C), and Caf130(272-1122)-6xHis) by two steps of affinity chromatography: first using Ni-NTA and subsequently STREP beads. Egd2 (19 kDa) displayed aberrant migration, appearing around 25 kDa. Rectangles indicate excised bands sent to the IGBMC mass spectrometry platform for protein identity confirmation. Below, panels 1, 2, 3, and 4 correspond to bands 1, 2, 3, and 4, respectively, ranked by the average number of peptide spectrum matches (PSMs). Note that PSMs are influenced by protein length. Additional proteins, primarily of bacterial origin, were detected but are not shown here. Proteins belonging to the Caf130 module are highlighted in red. Certain proteins are identified as “BL21 seq” (1, 2, and 3), as only their sequences, not names, were provided to the platform.



**Figure S5: Confidence assessment of structural predictions generated by AlphaFold3.** The protein(s) sequence(s) was imported into AlphaFold3 software, and prediction quality was evaluated using the pLDDT score, which measures confidence at each atomic level on a scale from 0 to 100. High scores and blue coloration indicate high confidence, while low scores and orange coloration reflect very low confidence. The pTM (predicted template modeling) score suggests structural accuracy, with scores above 0.5 indicating that the protein fold resembles a real structure. (A) AlphaFold3 prediction of the Caf130 module, including Not1(1-162), Btt1, Egd2, and Cal4. The ipTM (interface predicted template modeling) score evaluates the accuracy of subunit positioning within a protein complex. An ipTM score above 0.8 indicates high reliability, a score between 0.6 and 0.8 suggests moderate but uncertain accuracy, and scores below 0.6 indicate low reliability. (B) AlphaFold3 prediction of the Cal4 protein. Both figures and various parameters were provided by AlphaFold3 (Abramson et al. 2024).

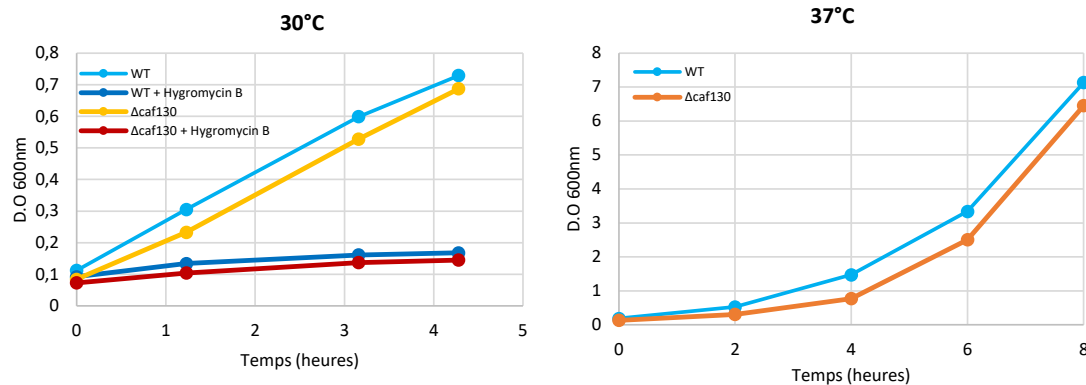
## Autres résultats

### 1. Recherche d'un phénotype thermosensible de *Δcaf130*

Une étude précédente a montré que l'élimination de *caf130* entraîne un phénotype de croissance à 37°C (Pillet et al. 2022). Pour valider ce phénotype et quantifier le retard de croissance correspondant, j'ai suivi la cinétique de croissance d'une souche sauvage et d'une souche *Δcaf130* à 30°C et 37°C (Figure R1). Les cellules ont été cultivées dans un milieu riche (YPDA) avec agitation pendant une nuit à 30°C de façon à obtenir une culture en phase exponentielle. Le matin, les cellules ont été diluées dans des milieux préchauffés et la densité optique a été mesurée à différents intervalles. Les levures ont été incubées en maintenant la densité optique à 600nm entre 0,5 et 1 par des dilutions dans du milieu préchauffé afin de conserver les cellules en phase exponentielle. Le phénotype de croissance à 37°C pour *Δcaf130*, observé dans des études antérieures, n'a pas été retrouvé en milieu liquide (Figure R1B).

En parallèle, j'ai évalué l'impact de l'hygromycine B (100μM), un composé induisant un mauvais repliement des protéines, sur la croissance de la souche sauvage et de la souche *Δcaf130* à 30°C (Figure R1A). La même stratégie a été suivie. Bien que l'hygromycine B ait fortement réduit leur croissance, l'effet observé est similaire pour les souches *Δcaf130* et sauvage.

Globalement, aucun phénotype de croissance marqué lié à la délétion de *caf130* n'a été observé. Ceci est surprenant car les observations rapportées dans la littérature (Pillet et al. 2022) ont été effectuées dans le même fond génétique (W303) que celui que nous utilisons. Il est difficile d'expliquer cette différence sauf à faire intervenir des paramètres difficiles à contrôler : composition exacte du milieu, lot de milieu, contaminant dans l'eau, durée de l'autoclavage, précision des températures d'incubation...



**Figure R1 : Test de croissance des souches  $\Delta\text{caf130}$  et WT en culture liquide.**

(A) Comparaison de la croissance en milieu liquide YPDA à 30°C des souches  $\Delta\text{caf130}$  et WT (sauvage) en présence ou absence d'hygromycine B (100  $\mu\text{M}$ ). (B) Comparaison de la croissance entre les souches  $\Delta\text{caf130}$  et WT en milieu YPDA liquide à 37°C. Pour les deux analyses, des D.O à 600nm ont été prises à différents moments pendant 8 heures et les D.O ont été tracées en fonction du temps.

## 2. Association de Caf130 aux ribosomes et aux polysomes

Les résultats de l'analyse de l'interactome de Caf130 par spectrométrie de masse révèlent la présence de nombreuses protéines ribosomales. Pour valider cette association de Caf130 aux ribosomes, j'ai utilisé la même souche que celle des analyses de spectrométrie de masse, BSY3711, contenant Caf130 étiqueté TAP en C-terminal, afin de déterminer si Caf130 se lie avec les ribosomes en cours de traduction (polysomes). Des extraits totaux ont été préparés à partir de culture en phase exponentielle de cette souche. Lors de la lyse, de la cycloheximide a été ajoutée pour bloquer les ribosomes en cours de traduction. Les polysomes ont été fractionnés à 4°C dans un gradient de sucrose (10-45%) et la sédimentation a été suivie en mesurant la densité optique à 254 nm, indicatrice de la présence d'ARN (et de protéines), principalement les ARNr. Plusieurs fractions d'un volume défini ont été collectées.

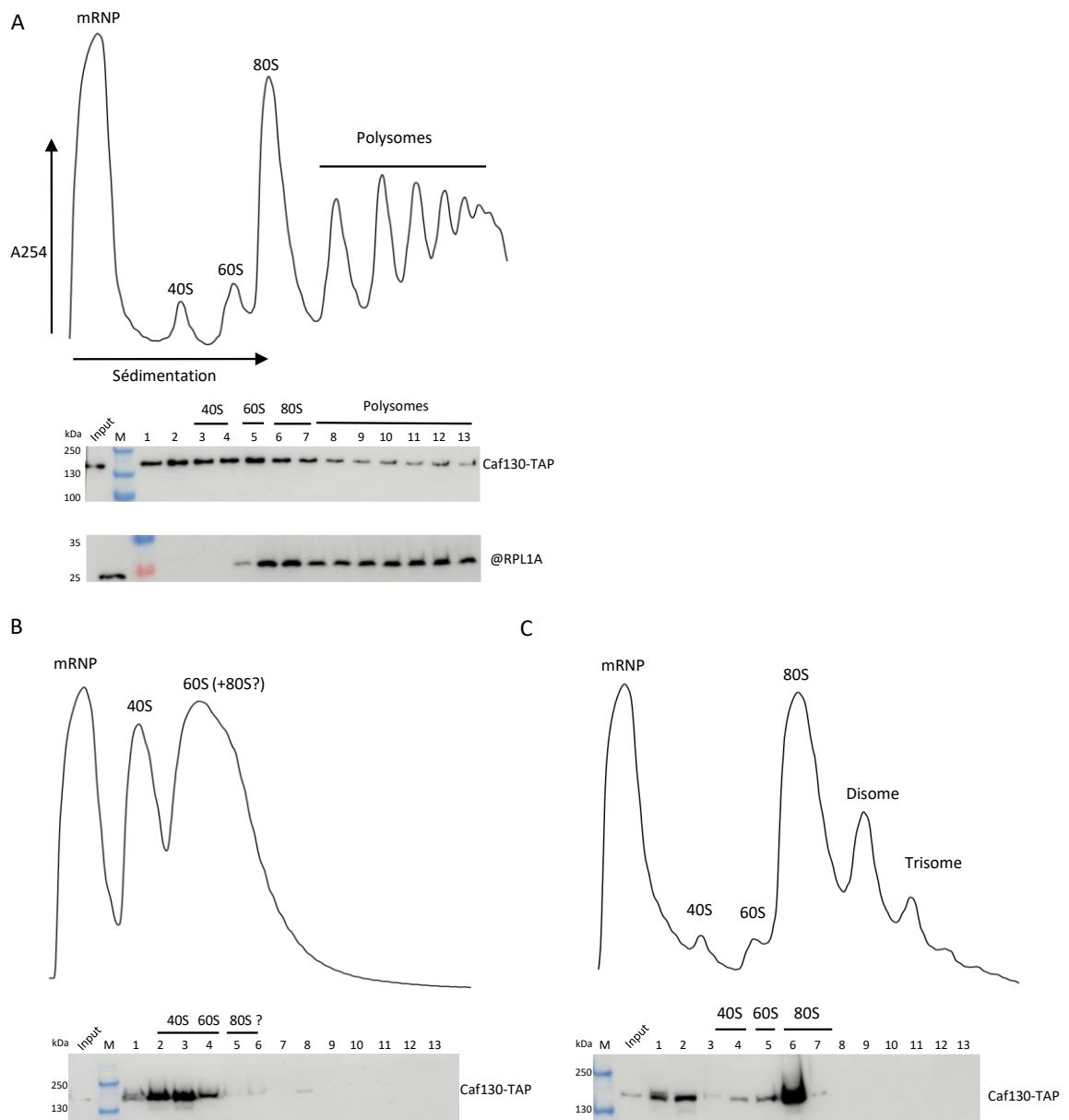
Les résultats obtenus (Figure R2A) indiquent que Caf130-TAP se lie aux ribosomes (80S) et aux polysomes, comme en témoigne sa co-sédimentation avec les fractions correspondantes (Figure R2A). Cependant, une portion de Caf130 se retrouve aussi en haut du gradient dans le pic correspondant aux mRNP, qui ne contient pas de ribosomes comme le montre le western blot contrôle détectant RPL1A (Figure R2A). Caf130 est également présente dans les pics correspondant aux deux sous-unités ribosomales 40S et 60S, soit du fait d'une interaction avec ces dernières. Il pourrait être attendu que Caf130 soit préférentiellement associée à la sous-unité 60S, en raison de son interaction avec la région de sortie du tunnel du

ribosome. L'association observée avec la sous-unité 40S pourrait résulter d'une interaction indirecte, médiée par le complexe CCR4-NOT, potentiellement via Not5.

Pour vérifier la spécificité de l'association de Caf130 aux ribosomes et à ses sous-unités, et exclure la simple présence d'agrégats, deux traitements distincts ont été réalisés :

- Le premier a consisté en l'ajout d'EDTA, un agent chélateur des ions magnésium, à l'extrait avant la sédimentation des polysomes. Comme le magnésium est essentiel au maintien de l'intégrité structurale des ribosomes, l'EDTA provoque la dissociation des sous-unités ribosomales. Le profil obtenu montre clairement que les ribosomes et les polysomes ont été dissociés (Figure R2B). Le western blot correspondant confirme que Caf130-TAP sédimente avec les sous-unités 40S et 60S (Figure R2B). Dans le cas où des agrégats avaient été présents, Caf130-TAP aurait conservé le profil observé initialement (Figure R2A).
- Le second traitement a fait appel à la RNase I, une enzyme qui dégrade les ARN. A faible concentration, les ARNm sont digérés sans que les ARNr soient fortement affectés ce qui entraîne la dissociation des polysomes. Le profil obtenu montre une réduction des polysomes, malgré la présence de disomes et de trisomes résiduels (Figure R2C). Pour obtenir uniquement des monosomes (80S), une durée de traitement plus longue ou une concentration plus élevée d'enzyme aurait pu être envisagées. Toutefois, la distribution des ribosomes diffère significativement de celle observée dans des extraits non-traités (Figure R2A et R2C) permettant de tester si la distribution de Caf130-TAP a aussi été modifiée. Le western blot indique un enrichissement de Caf130-TAP dans la fraction correspondant aux monosomes, validant ainsi la spécificité de son association avec les ribosomes. En accord avec les résultats précédents, une petite portion de Caf130 est aussi présente dans le pic correspondant aux mRNP résiduelles. Dans ce dernier cas, on notera que Caf130 est plus enrichie avec la sous-unité 60S qu'avec la sous-unité 40S.

Globalement, ces données indiquent qu'une majorité de Caf130 présent dans les cellules est spécifiquement associée aux ribosomes. Néanmoins, une petite portion de la protéine n'est pas associée à la machinerie de traduction. De manière intéressante, Cal4-TAP est également associé aux polysomes (Annexe 1).



**Figure R2: La spécificité d'interaction de Caf130-TAP aux ribosomes et aux polysomes.**

Analyse par sédimentation sur gradient de sucrose d'un lysat de levure exprimant Caf130-TAP. Caf130-TAP a été détectée par western blot sur des aliquotes de chaque fraction obtenue grâce à un collecteur de fraction couplé à un analyseur de gradients. Le réactif PAP a été utilisé pour détecter Caf130-TAP. (A) Analyse de l'association de Caf130 aux polysomes. La protéine ribosomique contrôle Rpl1a a été détectée avec un anticorps primaire anti-Rpl1a spécifique, suivi d'un anticorps secondaire GARPO (Goat anti-Rabbit PerOxidase). (B-C) Analyse de la spécificité d'interaction de Caf130 aux ribosomes/polysomes à partir du même lysat cellulaire. Après traitement du lysat (B) à l'EDTA (40mM) ou (C) à la RNase I (300U), le matériel a été fractionné sur gradient de sucrose puis le profil d'absorbance à 254 nm du gradient a été enregistré et la présence de Caf130-TAP dans les différentes fractions détectées par western blot.

### **3. Division du module Caf130 du complexe CCR4-NOT en sous-entités**

Afin de préciser l'organisation du module comprenant Caf130 et l'ensemble de ses partenaires et éventuellement d'en déterminer la structure, et devant les difficultés rencontrées avec l'analyse de cet assemblage dans son intégralité, nous avons décidé, sur la base de nos résultats de purifications en lot (présentés dans la figure 5 article), d'analyser les sous-entités qui le composent. Pour ce faire, nous avons initié l'optimisation de la production des entités : Caf130 C-terminal – Cal4 et Caf130 N-terminal – Not1(1-162), pour augmenter la quantité et la pureté du matériel obtenu et si possible de réaliser des essais de cristallographie de l'un et/ou l'autre de ces deux sous-complexes.

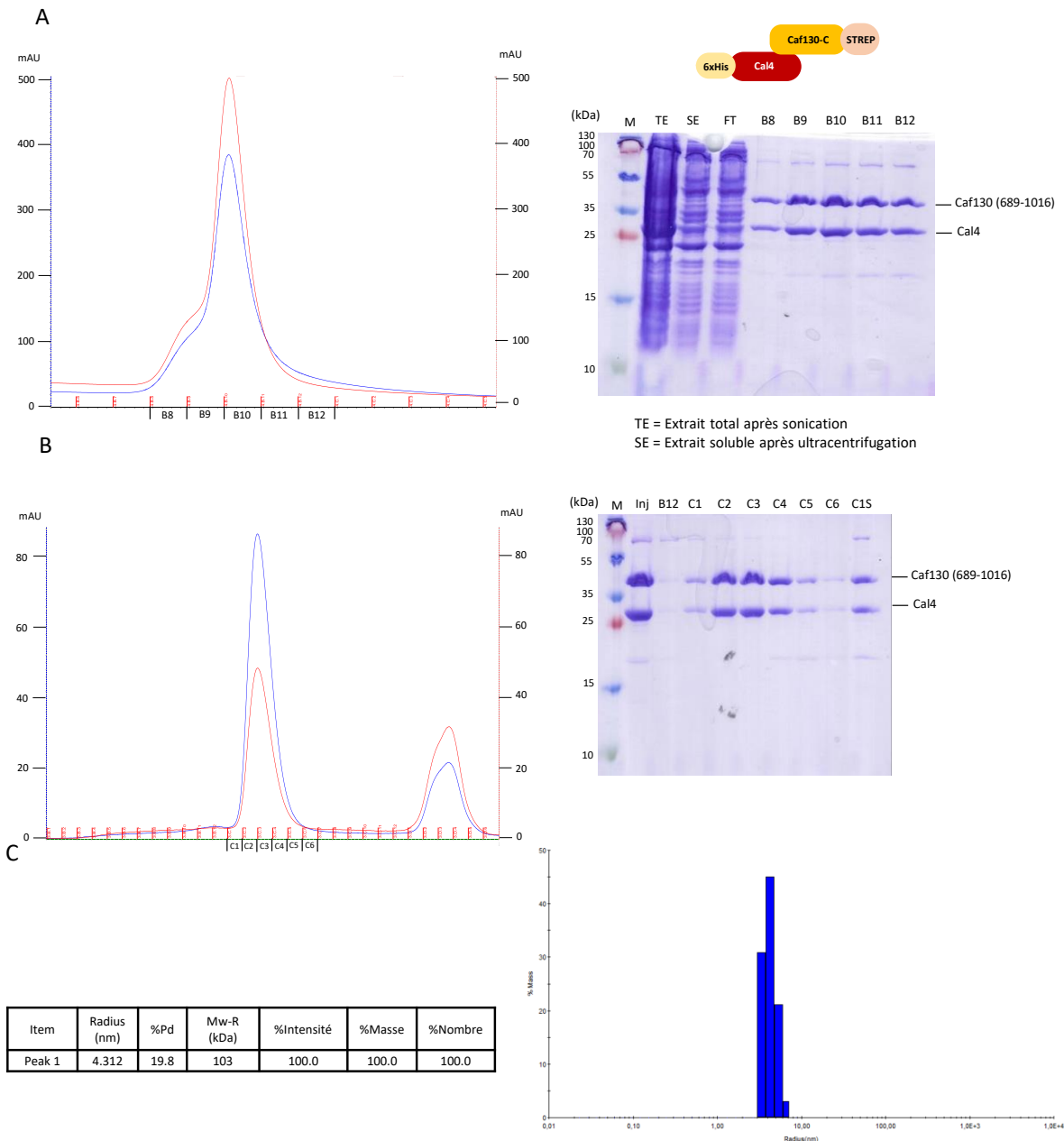
#### **3.1. Purification de l'entité Caf130 C-terminal - Cal4**

La purification de l'entité Caf130 C-terminal - Cal4 a été réalisée en collaboration avec la plateforme intégrée de biologie structurale de l'IGBMC. Pour ce faire, j'ai utilisé le plasmide pBS6637 codant une forme tronquée de la région C-terminale de Caf130 (Caf130-C) couvrant les acides aminés 689-1016 fusionnée à l'étiquette STREP en C-terminal et la protéine Cal4 complète avec une étiquette 6xHistidine en N-terminal. (Cette construction a été utilisée car un premier essai de purification de la construction initiale (plasmide pBS6580) utilisée en lot et codant Cal4-6xHis – Caf130-C (623-1016) n'avait pas donné de résultats satisfaisants, probablement en raison de la région 623-688 de Caf130, qui semble peu structurée dans les modèles AlphaFold, données non présentées).

Après surexpression à grande échelle dans *E. coli*, les protéines ont été purifiées sur une colonne StrepTactin-XT sur l'automate AKTA Avant. Le pic d'élution obtenu (Figure R3A) était compatible avec la présence d'une quantité substantielle de complexe malgré la présence d'un léger épaulement à gauche qui pourrait suggérer une hétérogénéité dans le complexe. Les fractions correspondantes ont donc été analysées par un gel SDS-PAGE (15%) pour tester la présence des protéines d'intérêt (Figure R3A). Cette validation étant positive, les fractions d'intérêt ont été regroupées, concentrées par ultrafiltration rapide, et les protéines soumises à une seconde étape de purification par chromatographie d'exclusion. Un pic d'élution compatible avec la taille d'un hétérodimère a été observé (Figure R3B) tout comme un pic secondaire qui correspond à des peptides contaminants et/ou des cofacteurs (nucléotides,

petits ARN...). Les fractions correspondant au pic principal ont été analysées sur un gel SDS-PAGE pour tester la présence des protéines d'intérêt (Figure R3B). Ces fractions ont ensuite été regroupées et concentrées. Ces expériences ont montré que les deux protéines s'expriment correctement, interagissent et sont produites avec des bons rendements et une pureté satisfaisante.

L'homogénéité du complexe purifié a été ensuite évaluée par diffusion dynamique de la lumière (DLS), technique fournissant des informations sur la taille, la stabilité, l'oligomérisation et la présence éventuelle d'agrégats dans l'échantillon. Les valeurs obtenues par la méthode des cumulants ont notamment montré un faible rayon de 4,312 nm. Un faible rayon est indicatif de l'absence d'agrégats. A l'inverse, une valeur élevée aurait suggéré leur présence. Le pourcentage de polydispersité (%Pd) inférieur à environ 20% reflète une distribution homogène des tailles (Figure R3C). La taille mesurée est de 103 kDa, alors que celle attendue pour notre complexe est de 66 kDa. Cette différence peut être expliquée par le fait que le DLS donne de meilleurs résultats avec des échantillons monodisperses, où les particules sont de tailles proches, qu'avec des échantillons polydisperses. En effet, si l'échantillon présente une polydispersité, c'est-à-dire avec des particules de tailles différentes, l'appareil peut surestimer la taille moyenne car les particules les plus grandes, bien que présentes en faible quantité, vont plus diffuser la lumière et leur réponse contribue au signal de manière disproportionnée. L'ensemble des résultats, confirmés par une représentation graphique, montre un échantillon pur, homogène et dépourvu d'agrégats (Figure R3C). Ce matériel a été utilisé pour des essais de cristallisation qui sont décrits dans la section 3.3.



**Figure R3 : Purification à grande échelle de l'entité Caf130 C-terminal - Cal4.**

(A) Purification sur colonne StrepTactin-XT à partir d'un opéron codant Caf130-Cter (689-1016) avec une étiquette STREP (en C-terminal) et Cal4 avec une étiquette 6xHis (en N-terminal). Le graphe à gauche présente le profil d'élution (en rouge : UV 260nm et bleu : UV 280nm), tandis que l'analyse des fractions du pic et des contrôles par SDS-PAGE (15%) et coloration au bleu de Coomassie est présentée à droite. TE : Extrait total après sonication, SE : Extrait soluble après ultracentrifugation, FT : Flowthrough. (B) Chromatogramme de chromatographie d'exclusion de l'entité Caf130 C-terminal - Cal4 (partie gauche). A droite, l'analyse SDS-PAGE avec coloration au bleu de Coomassie des fractions du pic et des contrôles. Inj : injection (ensemble des fractions d'intérêt de la purification STREP regroupées et concentrées), (C) Diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour l'analyse de la distribution de la taille des particules présentes dans les fractions purifiées : tableau résumant les résultats de la méthode des cumulants (à gauche) et représentation graphique (à droite).

### 3.2. Purification de l'entité Caf130 N-terminal – Not1(1-162)

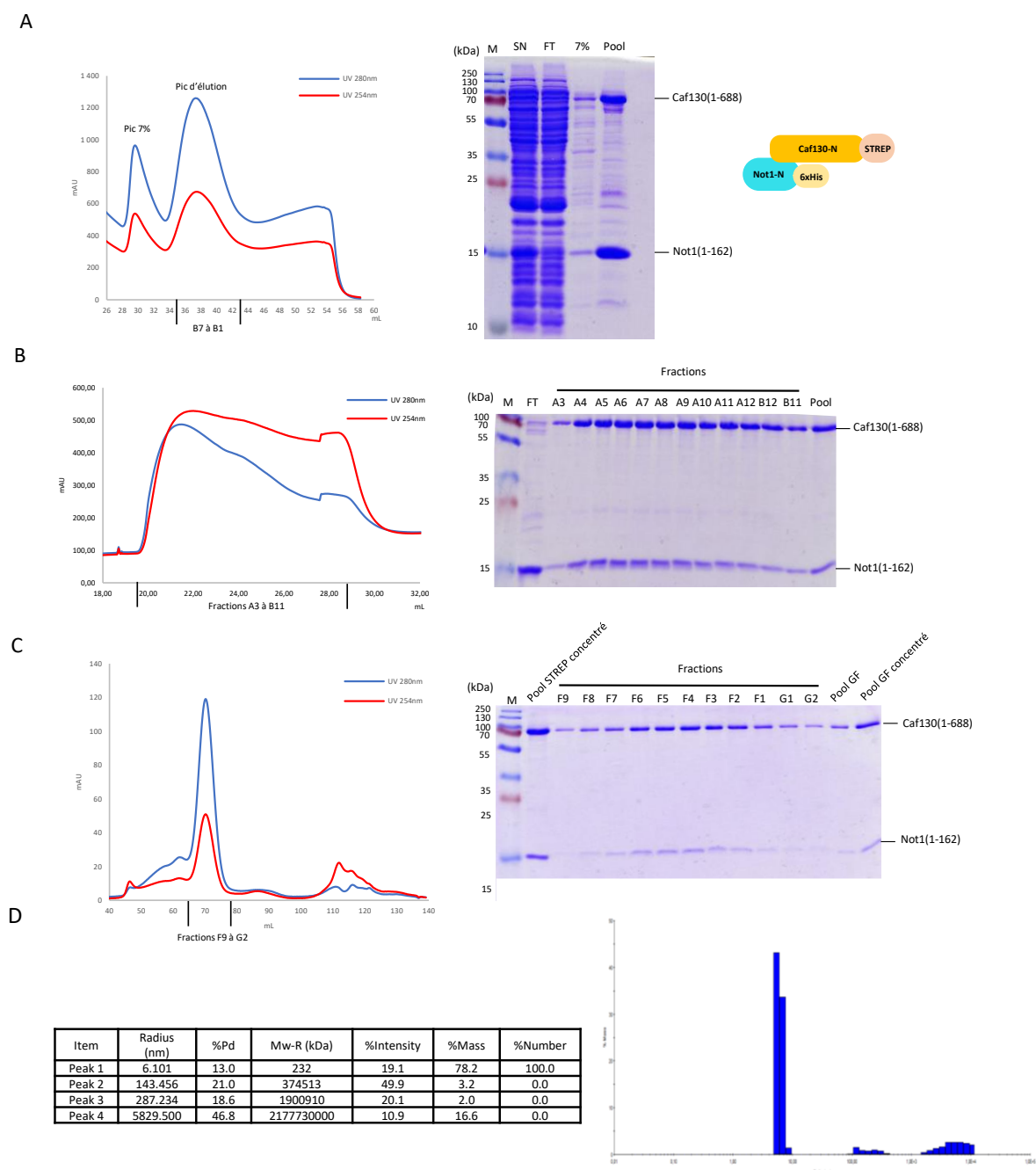
La purification de l'entité Caf130 N-terminal – Not1(1-162), exprimée à partir du plasmide pBS6607 codant Not1-N (1-162) avec une étiquette 6xHistidine en C-terminal et Caf130-N (1-688) avec une étiquette STREP en C-terminal, a été réalisée de manière indépendante (avec les conseils de la plateforme intégrée de biologie structurale de l'IGBMC). Le plasmide pBS6607 a servi pour sur-exprimer les protéines chez *E. coli*. Celles-ci ont été purifiées en plusieurs étapes. La première purification a été effectuée sur un automate AKTA Basic grâce à une colonne Hi-TRAP (Figure R4A). Le premier pic correspond à l'étape de lavage avec 7% du tampon d'élution qui permet d'éliminer la majorité des impuretés retenues sur la colonne. Le pic principal représente l'élution de la protéine d'intérêt. Les fractions correspondantes ont été analysées sur un gel SDS-PAGE pour tester la présence des deux protéines sur-exprimées (Figure R4A).

Cette vérification a confirmé la présence de quantité substantielle des protéines désirées en quantités approximativement stoechiométriques mais a aussi mis en évidence la présence de contaminants, justifiant une deuxième étape de purification à l'aide d'une colonne StrepTactin-XT afin d'améliorer la pureté et l'homogénéité (Figure R4B). Bien que le pic d'élution de cette deuxième purification ne soit pas symétrique et présente un épaulement important sur sa droite (Figure R4B), les fractions correspondantes ont été analysées par SDS-PAGE. Les résultats montrent une amélioration notable de la pureté du complexe.

Les fractions contenant les protéines d'intérêt ont ensuite été regroupées et concentrées par ultrafiltration rapide avant une dernière étape de purification par gel filtration. Un pic d'élution a été observé, cette fois-ci bien symétrique. Les profils protéiques des fractions d'intérêt ont de nouveau été contrôlés par SDS-PAGE (Figure R4C) et les protéines ensuite regroupées et concentrées par ultrafiltration rapide. A l'issue de ces trois étapes de purification, nous pouvons conclure que les protéines s'expriment correctement et avec des rendements satisfaisants.

La pureté du complexe a également été évaluée par diffusion dynamique de la lumière (DLS) avec l'aide de la plateforme intégrée de biologie structurale de l'IGBMC. Les valeurs obtenues par la méthode des cumulants, suivies de la régularisation associée, indiquent que l'échantillon est hétérogène, avec la présence de plusieurs pics correspondant à des agrégats présentant des poids moléculaires anormalement élevés, de plusieurs milliers de kDa (Figure

R4D). Cependant, le pic principal (pic numéro 1), correspondant à notre complexe, présentait un rayon satisfaisant de 6,1 nm et une taille de 232 kDa. Etant donné que la taille attendue du complexe était de 95 kDa, et en tenant compte des limitations de l'appareil pour les échantillons polydisperses, la présence d'un hétérodimère est possible. Pour pouvoir réaliser des essais de cristallisation (décrits dans la section 3.3), les agrégats ont été en partie éliminés par centrifugation.



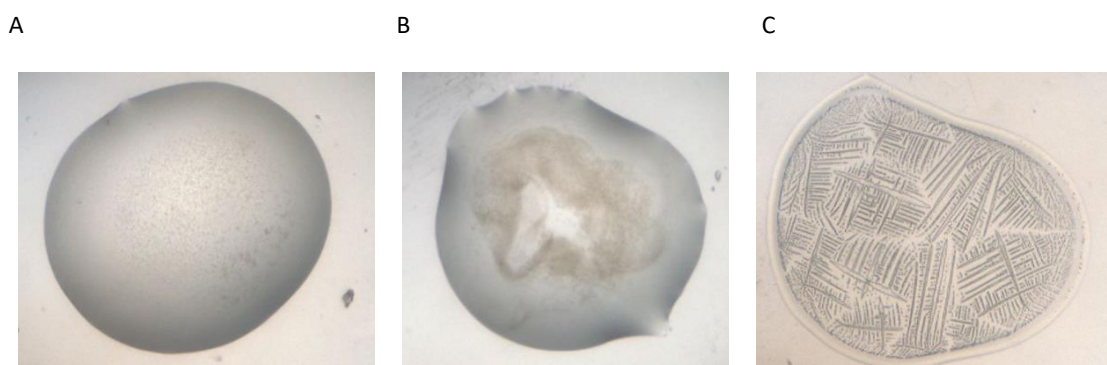
**Figure R4 : Purification à grande échelle de l'entité Caf130 N-terminal – Not1(1-162)**

(A) Purification sur colonne Hi-TRAP à partir d'un opéron codant Caf130-Nter (1-688) fusionné à une étiquette STREP en C-terminal et Not1-Nter (1-162) avec une étiquette 6xHis en C-terminal. L'agrandissement du graphe à gauche montre la zone d'élution avec le pic correspondant à l'étape de lavage 7% à gauche et le pic d'élution à droite. L'analyse par SDS-PAGE (15%) et coloration au bleu de Coomassie est présentée à droite. SN : Extrait soluble après centrifugation, FT : Flowthrough, 7% : étape de lavage avec 7% du tampon d'élution, Pool : regroupement des fractions B7 à B1. (B) Purification sur colonne StrepTactin-XT à partir du regroupement des fractions issues de la première purification. A gauche, l'agrandissement du graphe représente la zone d'élution et à droite, l'analyse par SDS-PAGE (15%) et coloration au bleu de Coomassie. (C) Chromatogramme de gel filtration du

module N-terminal de Caf130 à gauche. A droite, l'analyse SDS-PAGE (15%) avec coloration au bleu de Coomassie. Pool STREP concentré : regroupement des fractions de la purification STREP après concentration, pool GF : regroupement des fractions après la chromatographie d'exclusion, pool GF concentré : pool GF après concentration. (D) Diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour l'analyse de la distribution de la taille des particules : tableau résumant les résultats de la méthode des cumulants (à gauche) et représentation graphique (à droite).

### 3.3. Essais de pré-cristallisation

Des essais de pré-cristallisation ont été réalisés à partir des deux échantillons correspondant aux entités contenant les régions N- et C-terminales de Caf130. Ces essais ont été menés en collaboration avec la plateforme intégrée de biologie structurale de l'IGBMC. Plusieurs criblages de cristallisation ont été réalisés dans des plaques de cristallographie, en utilisant différents sels, tampons et agents de précipitation, et en présence de nos échantillons protéiques (séparément). L'évolution des précipités et la formation d'éventuels cristaux ont été suivies quotidiennement pendant plusieurs semaines. La figure R5 illustre plusieurs photos de gouttes, montrant un exemple de précipité granulaire, potentiellement micro-cristallin et susceptible de donner des cristaux, un précipité de mauvaise qualité, et un cas plus rare où des cristaux ont été obtenus mais ceux-ci correspondaient à des cristaux de sels. En conclusion, nous n'avons malheureusement pas réussi à obtenir de cristaux de nos deux complexes protéiques. Globalement, cette approche par cristallographie a été infructueuse mais le matériel préparé dans ce cadre a aussi été utilisé pour d'autres analyses décrites en section 4.



**Figure R5 : Essais de cristallisation du module Caf130.**

Représentations de plusieurs exemples de photos de gouttes résultant des essais de pré-cristallisation à partir des échantillons N-terminal et C-terminal du module de Caf130. (A) Un précipité susceptible de donner des cristaux, (B) un précipité de mauvaise qualité et (C) cristaux de sels.

#### 4. Organisation du module entier de Caf130

Pour explorer l'organisation du module de Caf130 complet, nous avons initié une collaboration avec Jérôme Basquin, membre de l'équipe d'Elena Conti (MPI Munich, Allemagne), afin de déterminer la structure du complexe par cryo microscopie électronique (Cryo EM). Sur la base de nos résultats de la purification du complexe en lot (présentés dans la figure 3B article), nous avons envoyé à notre collaborateur le plasmide pBS6406 codant pour l'opéron entier, comprenant Caf130 complet avec une étiquette 6xHistidine en N-terminal, Btt1 avec une étiquette STREP en C-terminal, Egd2, Not1(1-162), et Cal4.

Comme pour nos purifications antérieures, le plasmide a été exprimé dans des cellules d'*E. coli* par notre collaborateur. Les protéines ont ensuite été purifiées sur une colonne Hi-TRAP, suivie d'une StrepTactin-XT, et une gel filtration a été réalisée. Un pic d'élution a été observé, et les fractions correspondantes ont été analysées par SDS-PAGE (figure R6A générée par notre collaborateur).

Des tests d'analyses du complexe par Cryo EM ont été réalisés à l'aide d'un microscope Glacios Cryo-TEM. Les résultats obtenus ont justifié la poursuite de l'analyse sur le microscope Titan Kryos G4 K3, qui a généré un grand nombre de données. Celles-ci ont été collectées et traitées pour générer une classification 2D (Figure R6B générée par notre collaborateur). Cette classification a ensuite permis de générer une reconstruction 3D qui a pu être superposée à notre modèle AlphaFold (Figure R6C générée par notre collaborateur). Les premiers résultats sont prometteurs et corroborent globalement le modèle prédit. Cependant, bien que notre modèle AlphaFold de la partie N-terminale du module du complexe CCR4-NOT (incluant la partie N-terminale de Caf130, Btt1, Egd2 et la partie N-terminale de Not1) se superpose relativement bien avec la reconstruction 3D obtenue par Cryo EM, la partie C-terminale (région C-terminale de Caf130 et Cal4) ne s'aligne pas avec une même précision. Cela suggère la présence d'une région flexible, réduisant ainsi la résolution obtenue. De nouveaux opérons codant des protéines recombinantes dépourvues de cette région ont été construits et les complexes produits sont actuellement en cours d'analyse par Cryo EM.



## 5. Définition des modes d'interaction des partenaires de CNOT11

La détection d'une similarité structurale entre les régions C-terminales de CNOT11 humain et de Caf130 de levure (Figure 3C article) suggère une conservation fonctionnelle de cette région. Etant donné nos résultats établissant le mode d'interaction de la région C-terminale de Caf130 avec Cal4, nous avons cherché à déterminer si des partenaires humains se lient de la même façon à cette région de CNOT11 (Annexe 2). Il a été établi que la région C-terminale de CNOT11 chez l'humain joue un rôle d'antenne, facilitant l'interaction avec divers partenaires, tels que GGNBP2 et SCAPER, afin de recruter le complexe CCR4-NOT pour différentes fonctions (Mauxion et al. 2022; Höpfler et al. 2023). De nouveaux candidats partenaires du C-terminal de CNOT11 ont été identifiés au laboratoire par immunoprécipitation suivie de spectrométrie de masse (AP-MS). Ainsi, au cours de mon projet, en lien avec ce rôle d'antenne que pourrait également avoir Caf130, j'ai utilisé la méthode de double hybride pour valider le mode d'interaction de CNOT11 avec différents partenaires : GGNBP2, FAM193A et GPBP1L1.

Des modèles AlphaFold-Multimer ont servi de base pour déterminer les mutations ponctuelles du domaine C-terminal de CNOT11, M2 : L427R S430R et M3 : L451R V454R, pouvant bloquer l'interaction avec les protéines GPBP1L1 et FAM193A respectivement (Figure R7A). Une autre mutation, M1 : A476E F491R, déjà connue pour bloquer l'interaction entre CNOT11 et GGNBP2 (Mauxion et al. 2022), a aussi été utilisée. J'ai généré les mutants ponctuels M2 et M3 par mutagénèse dirigée dans un vecteur de double-hybride codant la protéine CNOT11 complète fusionnée au domaine d'activation de la transcription. (La mutation M1 = A476E F491R dans ce vecteur était déjà disponible au laboratoire.) J'ai aussi construit les combinaisons M1-M2 et M1-M3 ainsi que le triple mutant M1-M2-M3. Pour les tests double hybride, la protéine CNOT10 qui interagit avec une région centrale de CNOT11 (Mauxion et al. 2022) ) a été utilisée comme contrôle. J'ai ensuite co-transformé dans la souche BSY2528 de levure les plasmides codant pour les protéines CNOT11 (sauvage et mutantes), fusionnées au domaine d'activation de la transcription (AD) de Gal4, avec des vecteurs codant les différents partenaires fusionnés au domaine de liaison à l'ADN (DLA) de LexA. L'interaction entre les protéines a été quantifiée en mesurant la production de  $\beta$ -galactosidase avec des triplicats biologiques.

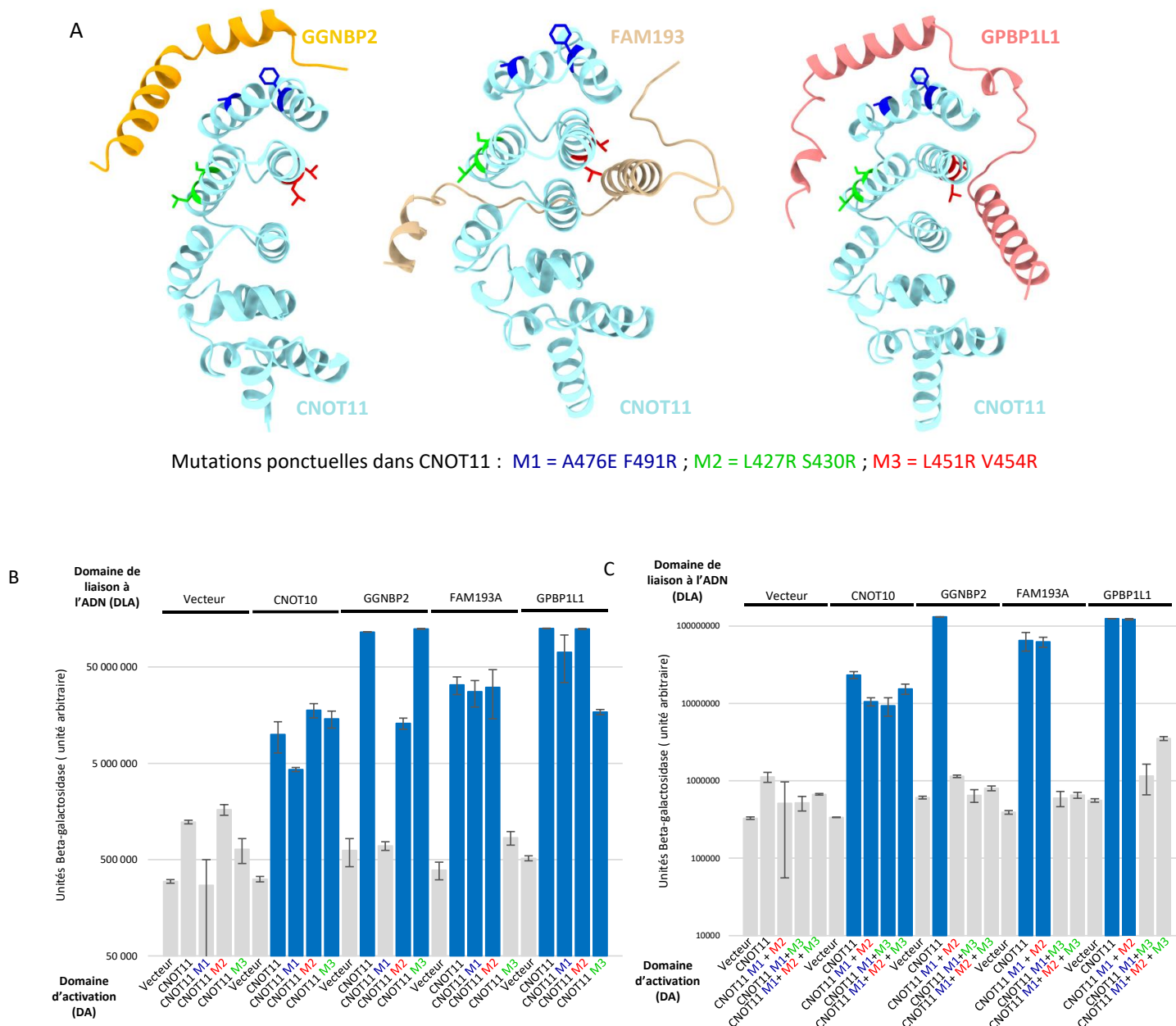
Les résultats des tests pour les simples mutants sont présentés dans la figure R7B et pour les doubles et triples mutants dans la figure R7C. Dans l'ensemble, de faibles niveaux de  $\beta$ -galactosidase ont été détectés pour les co-transformations impliquant des vecteurs vides, ce qui indique que les protéines seules n'ont pas la capacité intrinsèque d'activer la transcription du gène rapporteur. Par contre, des activités  $\beta$ -galactosidase élevées ont été observées lorsque CNOT11 est exprimée avec ses partenaires CNOT10, GGNBP2, FAM193A ou GPBP1L1 (Figure R7B et R7C). En accord avec les données structurales et biochimiques disponibles (Mauxion et al. 2022), les mutants M1, M2 et M3 du domaine C-terminal de CNOT11, seuls ou en combinaison, n'affectent pas l'interaction avec CNOT10 (Figure R7B et R7C). Ces observations démontrent que toutes les protéines sont exprimées et fonctionnelles.

L'interaction entre GGNBP2 et CNOT11 est bloquée par le mutant M1 (Figure R7B), confirmant les données initiales (Mauxion et al. 2022). En accord avec ce résultat, la combinaison des mutants M1-M2, M1-M3 et M1-M2-M3 de CNOT11 empêche aussi l'interaction avec GGNBP2 (Figure R7C).

Concernant FAM193A, un signal élevé a été détecté avec les mutants M1 et M2, tandis que la mutation M3 (L451R V454R) provoque une forte diminution du signal (Figure R7B), de même que les associations M1-M3 et M1-M2-M3 (Figure R7C). Ceci confirme que les résidus L451 et V454 sont essentiels pour l'interaction de FAM193A avec CNOT11 en accord avec le modèle AlphaFold (Figure R7A).

Les mutants M1, M2, M3 et l'association M1-M2 n'empêchent pas l'interaction de CNOT11 avec GPBP1L1 (Figures R7B et R7C), qui est par contre affectée par les combinaisons M1-M3 et M1-M2-M3 (Figure R7C). Ces résultats sont compatibles avec le modèle AlphaFold qui suggère des interactions multiples de GPBP1L1 avec CNOT11.

En conclusion, ces données confirment que les différents partenaires de CNOT11 utilisent des modes d'interaction différents, ce qui ouvre de façon intéressante la possibilité que certains puissent interagir avec CNOT11 de manière simultanée. Ces résultats, associés à des alignements de structures entre CNOT11-C (avec ses différents partenaires) et Caf130-C (avec Cal4) (données non montrées), indiquent que la région d'interaction de Caf130-C pour Cal4 diffère de celle de CNOT11 avec ses partenaires, y compris SCAPER.



**Figure R7 : Interaction entre CNOT11 sauvage ou mutants avec ses différents partenaires.**

(A) A gauche, la structure déterminée expérimentalement de CNOT11 (bleu clair) avec GGNBP2 (orange) (PDB : 8BFJ), prédictions AlphaFold des interactions de CNOT11 (bleu clair) avec FAM193A (beige) dans la structure du milieu, et GPBP1L1 (rose) dans celle de droite. Les mutations ponctuelles prédites sont indiquées en vert M2 : L427R et S430R, et en rouge M3 : L451R V454R. La mutation M1 en bleu : A476E F491R affecte l'interaction de CNOT11 et GGNBP2. (B et C) Test d'interaction entre CNOT11 sauvage et mutants simples (B) ou doubles et triples mutants (C) avec les différents partenaires. La levure hôte a été co-transformée avec divers plasmides exprimant des protéines fusionnées au domaine de liaison à l'ADN (DLA) de LexA et au domaine d'activation (DA) de Gal4. M1, M2, M3 correspondent aux mutations indiquées dans la partie (A). Des triplicats biologiques ont été testés et les valeurs moyennes avec l'erreur standard sont représentées sur une échelle logarithmique.

## Discussion

Plusieurs criblages protéomiques à grande échelle (Ito et al. 2001; Krogan et al. 2006; Cui et al. 2008) et des analyses d'interactions réalisées au sein de l'équipe ont révélé une association entre Caf130, sous-unité du complexe CCR4-NOT, et Btt1, une des sous-unité  $\beta$  du complexe NAC. Des recherches de supprimeurs du phénotype de croissance lente résultant de l'inactivation d'Acl4 chez la levure (Pillet et al. 2022) publiées peu après que j'ai initié ma thèse ont conforté cette interaction. Ces observations ont établi un lien physique inattendu entre la traduction avec la sortie du peptide naissant du ribosome et la dégradation de l'ARNm, initiée par la déadénylation. Cependant, l'organisation et la fonction de l'ensemble des facteurs impliqués dans ce mécanisme restent mal comprises.

Afin d'approfondir ces résultats préliminaires, j'ai initialement entrepris d'identifier les partenaires de Caf130 en purifiant cette protéine par la méthode TAP (Tandem Affinity Purification), suivie de l'identification des protéines co-purifiées par spectrométrie de masse. Cette approche a permis de détecter plusieurs partenaires attendus mais aussi certains inattendus (Figure 1A article). Ainsi, la quasi-totalité des sous-unités du complexe CCR4-NOT ont été retrouvées (Not1, Not3, Not4, Not5, Caf130, Caf40, CCR4 et Caf1), à l'exception de Not2. Cette dernière n'ayant pas non plus été détectée dans l'extrait, sa petite taille jouant probablement en sa défaveur, cette absence n'est pas informative. La présence de Not2 pourrait être testée en purifiant le complexe à partir de Not2 fusionnée à l'étiquette TAP puis en évaluant la présence de Caf130 dans la fraction purifiée (par western blot si elle est étiquetée et/ou par spectrométrie de masse). Les sous-unités Not3, Not4 et Not5 ont été retrouvées, mais plus faiblement que les autres sous-unités. Il est possible que certaines des sous-unités CCR4-NOT aient été perdues durant la purification. En soutien à cette hypothèse, une étude antérieure a rapporté la dissociation du complexe CCR4-NOT lors de l'étape de purification par calmoduline (Nasertorabi et al. 2011). Dans le cas présent, comme elles interagissent à l'extrémité C-terminale de Not1, loin du site où cette protéine lie Caf130, il est plus probable de perdre ces facteurs en cas de dégradation protéiques limitées lors de la purification ou en cas de dissociation partielle. Pour minimiser ce risque, nous aurions pu

utiliser un gradient de glycérol doux lors de la seconde étape de purification TAP, pour préserver la stabilité du complexe (Nasertorabi et al. 2011).

Le système de double hybride a confirmé l'interaction entre Caf130 et Not1 (Figure 2A article). Bien que cela ne démontre pas une interaction directe, cette observation suggère que Caf130 se lie soit directement à Not1, soit qu'elle se lie à une autre sous-unité du complexe CCR4-NOT. Des analyses effectuées sur une version tronquée de Not1 ont révélé que les acides aminés 1-162 sont suffisants pour permettre la liaison avec Caf130 (Figure 2D article). Le fort signal positif détecté avec Not1 (1-162) est particulièrement instructif, car cette région est relativement petite et n'est pas connue pour lier d'autres sous-unités du complexe CCR4-NOT. Cela renforce l'hypothèse d'une interaction directe de Caf130 avec Not1. Mes études biochimiques avec des protéines recombinantes, ainsi que l'obtention du modèle AlphaFold, ont confirmé cette interaction directe (Figures 3, 5 article et Figure R4). De plus, une autre analyse par double hybride, visant à cartographier les régions d'interaction de Caf130 avec ses différents partenaires, a révélé que Not1(1-162) interagissait avec la partie N-terminale de Caf130, pouvant être réduite aux acides aminés 1 à 622 (Figure 5C article). Ces résultats donnent encore plus de détails sur l'interaction entre ces protéines. Par ailleurs, l'alignement des séquences des parties N-terminales de la structure expérimentale de CNOT11 et CNOT1 (Mauxion et al. 2022) avec celles de Caf130 et Not1, de notre modèle AlphaFold, a révélé une similitude d'interaction entre les complexes CCR4-NOT humain et de levure (Figure 3C article). Cette conservation se manifeste également par une région conservée entre la partie C-terminal de CNOT11 et une autre région de Caf130 (Figure 3C article). Ces observations suggèrent que la partie N-terminale des complexes CCR4-NOT chez l'humain et chez la levure ont une origine évolutive commune et pose la question de leur similarité fonctionnelle.

La région C-terminale de CNOT11 a été décrite comme jouant un rôle d'antenne, facilitant l'interaction de la partie N-terminale du complexe CCR4-NOT avec de nombreux partenaires, dont GGNBP2 (Mauxion et al. 2022), ainsi que SCAPER, ce dernier étant impliqué dans un mécanisme de contrôle qualité similaire à celui de Caf130 (Höpfler et al. 2023). Ainsi, une partie de mon projet a consisté à confirmer les interactions entre le domaine C-terminal de CNOT11 et de nouveaux partenaires potentiels, tels que FAM193 et GPBP1L1. L'interaction

entre des mutants ponctuels de CNOT11 avec ses partenaires a été étudiée par double hybride. Mes résultats confirment l'identité des régions impliquées et valident les résidus critiques pour ces associations, démontrant la spécificité d'interaction de CNOT11, et par conséquent du complexe CCR4- NOT, avec ces nouveaux partenaires (Figure R7). Ces résultats renforcent l'importance de la région d'interaction de CNOT11 avec ses différents partenaires et suggèrent un rôle similaire pour Caf130. Cette analyse a d'autre part écarté la possibilité qu'un ou des partenaires de CNOT11 interagissent avec cette dernière de façon similaire à l'interaction de Cal4 avec Caf130. D'autres partenaires du domaine C-terminal de Caf130 pouvant présenter le même mode d'interaction que les partenaires de CNOT11 humain n'ont pas encore été identifiés.

L'interactome de Caf130 a révélé la présence d'un nouveau partenaire de fonction inconnue, Cal4 (Figure 1A article). Ce dernier a de manière indépendante été identifié lors d'une recherche de suppresseurs du phénotype de croissance lente résultant de l'inactivation d'Acl4 (Pillet et al. 2022). Une souche exprimant Cal4 fusionnée à l'étiquette TAP a été construite, ce qui a permis d'identifier ses partenaires après purification TAP. L'interactome de Cal4 s'est révélé largement similaire à celui de Caf130 (données non montrées). Les résultats de tests double hybride confirment l'interaction entre Caf130 et Cal4 et montrent que la région C-terminale de Caf130, pouvant être réduite aux acides aminés 689 à 1016, interagit avec Cal4 (Figure 2 et 5 article). La co-purification des deux protéines Caf130<sub>623-1016</sub> et Cal4 a confirmé que cette interaction est directe (Figure 5E article et Figure R3). Ces données confirment que Cal4 est un partenaire authentique de Caf130 et mettent également en évidence la conservation du rôle du domaine C-terminal de CNOT11 dans le recrutement de partenaire. Ainsi, Cal4 apparaît comme une nouvelle sous-unité du complexe CCR4-NOT. Il serait intéressant de vérifier si Cal4 co-purifie avec le complexe CCR4-NOT en utilisant diverses méthodes, telles que la sédimentation sur gradient de glycérol. Par ailleurs, de manière intéressante, une analyse de similarité de séquences hautement sensible (HMM) a révélé une similarité entre Cal4 et une protéine liant l'ARN nommée She2. Cette similitude a été confirmée par l'alignement de la structure expérimentale de She2 avec le modèle de Cal4, générée par AlphaFold (Figure 3C article). Ceci pourrait suggérer que Cal4 a aussi la capacité de lier l'ARN. Pour explorer ce potentiel rôle, des analyses telles que des gels-retard pourraient

être réalisées en testant différents ARN cibles, tels que les ARNm codant RPL3/RPL4A ou RPL4B mais également, comme discuté plus loin, des ARN ribosomaux.

Mes analyses protéomiques ont confirmé la présence du NAC<sup>Btt1</sup> dans l'interactome de Caf130, tout en suggérant que le complexe NAC<sup>Egd1</sup> est sous-représenté (Figure 1A article). Le fait qu'Egd1 soit 20 fois plus abondant que Btt1 renforce cette conclusion (Breker, Gymrek, et Schuldiner 2013; Dénervaud et al. 2013). Les résultats de double hybride confirment que l'interaction de Caf130 avec Btt1 est spécifique, avec au mieux un faible signal détecté pour Egd1 (Figure 2 article). Ce signal différentiel, combiné à la grande similarité entre Btt1 et Egd1, a facilité la création de chimères, ce qui a permis de cartographier une région critique de Btt1 requise pour la liaison avec Caf130. Des tests double hybride réalisés avec des troncations et des chimères ont identifié la région 109-122 de Btt1, comme étant nécessaire et suffisante pour l'interaction avec Caf130 dans le contexte d'un squelette NAC  $\beta$  permettant l'association avec NAC  $\alpha$  (Figure 2 , S2 article).

Les tests double hybride n'ont pas produit de signaux suggérant une interaction entre Egd2 et Caf130. Dans les contextes du signal observé entre Btt1 et Caf130 dans les tests double hybride, des résultats de la purifications TAP, des productions de complexes recombinants et du modèle structural, nous aurions pu nous attendre à ce qu'un signal positif soit également détecté entre Caf130 et Egd2. Cependant, les tests double hybride peuvent s'avérer négatif pour de nombreuses raisons. Ainsi, il est possible que les fusions contenant Egd2 ne soient pas bien exprimées, inefficacement transportées dans le noyau, bloquent l'activation transcriptionnelle, ou soient titrées par Egd1. En accord avec des difficultés spécifiques, mes autres analyses par double hybride, visant à étudier les interactions entre Egd1-Egd2 ainsi que Btt1-Egd2, ont montré à plusieurs reprises que lorsque qu'Egd2 était liée au domaine de liaison à l'ADN, cela entraînait une absence d'interaction avec Btt1 (bien qu'un signal positif soit observé dans l'autre sens) et un faible signal pour Egd1 (avec un signal négatif dans l'autre direction avec Egd1) (données non montrées). En conclusion, même si les tests double hybride ne révèlent pas d'interaction entre Egd2 et Caf130, mes autres données argumentent fortement pour cette association.

Les auteurs de l'étude des supprimeurs du phénotype de croissance lente conférée par la mutation *acl4* ont remis en question la présence d'Egd2 au sein du module Caf130 (Pillet et al. 2022). Dans ce contexte, j'ai cherché à valider l'interaction directe en reconstituant l'intégralité du module dans un opéron : Btt1(STREP)-Egd2-Not1<sub>N</sub>-Cal4-Caf130(6xHis), exprimé dans un système bactérien, suivi d'une double purification. Cette méthode nous permet de démontrer une interaction directe entre l'ensemble des protéines du module, en éliminant les cofacteurs éventuels présents chez la levure qui peuvent interférer avec les analyses double hybride (Figure 3B article). Les résultats montrent que l'ensemble des protéines, y compris Egd2, co-purifient efficacement et de manière stœchiométrique. L'identité des protéines a été confirmée par spectrométrie de masse (Figure S4 article). Ces résultats, combinés aux données de l'interactome de Caf130 (Figure 1) et aux données de double hybride dans la souche de levure dépourvue d'*egd2* (Figure 2E), nous permettent d'affirmer qu'Egd2 fait bien partie du module.

Cette méthode de purification, les données de doubles hybrides ainsi que notre modèle AlphaFold, nous ont également permis de cartographier plus précisément la région d'interaction de Caf130 pour le complexe NAC. En effet, la co-purification du complexe Caf130<sub>1-622</sub>(STREP)-Btt1-Egd2-Not1<sub>N</sub>(6xHis) a révélé que les résidus 1 à 622 de Caf130 sont suffisants pour l'interaction avec le complexe NAC, et que cette interaction est améliorée en présence de Not1<sub>N</sub> (Figure 5D article). Par ailleurs nos résultats de spectrométrie de masse avec la souche Caf130-TAP Not1 ( $\Delta N$ -terminal) a révélé une diminution de l'association de Btt1 et Egd2 à Caf130 par rapport à la souche Caf130-TAP (sauvage) (Figure 1B article). Ces résultats argumentent dans le sens d'un rôle de la région N-terminale de Not1 pour favoriser ou stabiliser l'interaction de Caf130 avec le complexe NAC.

Des premières modélisations structurales du module complet ont été initialement effectuées avec le logiciel AlphaFold2 (données non montrées). Les 25 prédictions obtenues ont été superposées, révélant que les positions relatives de Cal4 et Not1<sub>N</sub> étaient constantes dans le complexe. En revanche, deux orientations distinctes avaient été observées pour Btt1 et Egd2. Dans la première, l'hélice correspondante à la région 109-122 de Btt1 (nécessaire à l'interaction avec Caf130) se trouvait au contact de Caf130, tandis que dans la seconde orientation, cette hélice pointait vers l'extérieur. Nous avons conclu que la première

orientation était correcte, ce qui nous a permis de définir plus précisément la région de contact entre Caf130 et Btt1. Nous avons réitéré nos prédictions avec le logiciel AlphaFold3 : dans ce cas, seule la bonne orientation est désormais prédite. La véracité de ces prédictions a été validée grâce aux données de tests double hybride et à l'analyse des complexes recombinants (Figure 5 article).

AlphaFold représente une avancée révolutionnaire dans la prédiction des structures protéiques, ayant émergé pendant ma thèse. Son utilisation a grandement simplifié l'analyse de l'organisation du module de Caf130. Cependant, bien que les résultats soient impressionnants, il est crucial d'adopter un regard critique. En effet, les prévisions dépendent des données d'entrée et peuvent ne pas toujours refléter les interactions biologiques spécifiques. De plus, une compréhension approfondie des mécanismes sous-jacents reste nécessaire pour valider ces structures dans des systèmes biologiques réels. Ainsi, bien qu'AlphaFold soit un outil puissant, il doit être utilisé en complément d'autres approches expérimentales afin de confirmer les prédictions obtenues.

Pour mieux identifier certaines régions d'interactions et confirmer notre modèle, des mutants ponctuels ont été générés dans les deux entités constituant le module Caf130. Pour l'entité contenant la partie C-terminale de Caf130 et Cal4, des mutants ont été obtenus lors de l'analyse de suppresseurs de la mutation *acl4* (Pillet et al. 2022). Ces derniers sont essentiellement situés dans la région d'interaction entre ces deux protéines ou affectent probablement leurs repliements. Les autres surfaces n'ont pas été affectées. Des mutations ponctuelles ont été introduites dans les plasmides contenant la séquence codante pour la partie C-terminale de Caf130 (R712G et E836K), ainsi que dans Cal4 (G162V et L208P), et les protéines recombinantes correspondantes ont été purifiées. Parmi les mutations testées, seule la mutation G162V de Cal4 a eu un impact significatif sur sa co-purification avec le domaine C-terminal de Caf130, en accord avec son positionnement en face d'une région conservée de Caf130 dans la structure prédite du complexe (Figure 4B et 5G article). Les autres mutations R712G et E836K dans Caf130 et L208P dans Cal4 n'ont pas affecté l'interaction des protéines recombinantes, mais nous ne pouvons pas exclure que leur affinité ait changé ou que d'autres paramètres soient modifiés *in vivo*. Finalement, dans certains cas, la protéine mutée ne s'exprimait plus, suggérant un effet de la mutation sur la stabilité de la protéine

(données non montrées). Afin de finaliser la validation de cette région d'interaction, l'association entre les deux protéines purifiées séparément, Caf130<sub>C</sub> et Cal4, ou Cal4 G162V, pourra être testée par ITC et/ou Nano-DSF.

Pour l'entité composée de Caf130<sub>N</sub>-Not1<sub>N</sub>-Btt1-Egd2, une analyse de la conservation évolutive a révélé que trois acides aminés N460, P461 et F462 dans la région N-terminale de Caf130 forment une région d'interaction avec Not1 et que cette interface est conservée dans le complexe CNOT11-CNOT1 humain (Figure 4C). Par conséquent, j'ai muté deux de ces résidus, N460A et P461, dans le plasmide codant pour Caf130<sub>N</sub>-Not1<sub>N</sub>-Btt1-Egd2 et purifié les protéines recombinantes produites. Les résultats montrent que cette mutation réduit significativement l'interaction entre Caf130 et Not1, validant ainsi la région d'interaction (Figure 5F article). Par ailleurs, cette réduction de l'interaction entre Not1 et Caf130 s'accompagne d'une diminution de l'interaction entre Caf130 et le NAC (Figure 5F article), ce qui est en accord avec l'effet de la délétion de la région N-terminale de Not1, qui réduit également l'interaction entre le NAC et Caf130 *in vivo* (Figure 1B article).

Afin d'obtenir des données structurales expérimentales, nous avons initié une collaboration avec Jérôme Basquin de l'équipe d'Elena Conti (MPI, Allemagne). Les résultats préliminaires en cryo EM sont encourageants et montrent une bonne superposition avec notre modèle AlphaFold du module Caf130 pour l'entité Caf130<sub>N</sub>-Not1<sub>N</sub>-Btt1-Egd2 du complexe CCR4-NOT (Figure R6). Cependant, l'absence de correspondance pour l'entité Caf130<sub>C</sub>-Cal4 suggère la présence d'une région flexible entre les deux parties (Figure R6), ce qui réduirait la résolution. Comme le modèle AlphaFold du module Caf130 suggère des contacts entre les deux entités qui le composent, je les ai purifiés indépendamment grâce à leurs étiquettes Strep puis j'ai mélangé ces fractions et effectué une seconde purification grâce à l'étiquette 6xHis présente uniquement sur l'un d'entre eux. Mes résultats n'ont pas mis en évidence de co-purification des deux entités (données non montrées). Ce résultat négatif peut suggérer que les deux entités n'interagissent pas ou uniquement avec une faible affinité. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que des conditions techniques différentes auraient permis de révéler une interaction.

Un nouvel opéron codant uniquement pour l'entité Caf130<sub>N</sub>-Not1<sub>N</sub>-Btt1-Egd2 a été construit, exprimé et purifié (Figure 5D article). Il est actuellement en cours d'analyse par cryo EM par notre collaborateur. Par ailleurs, l'entité contenant la région C-terminale de Caf130 associé à Cal4, qui s'exprime correctement, est également en cours d'analyse par cryo EM par notre collaborateur. Des essais de pré-cristallographie des deux entités (Caf130<sub>C</sub> – Cal4 et Caf130<sub>N</sub> – Not1<sub>N</sub>) ont été réalisés en parallèle au sein de notre laboratoire mais n'ont pas donné de cristaux. Plusieurs paramètres, notamment liés à l'expression des protéines, à la purification et aux conditions de cristallographies, pourraient être optimisés pour améliorer les chances de cristalliser ces complexes.

Outre les complexes CCR4-NOT et NAC<sup>Btt1</sup>, nous avons identifié de nombreuses protéines ribosomales dans l'interactome Caf130 (Figure 1A article). Les protéines ribosomales manquantes étant de faible poids moléculaire et riches en arginine et lysine (et donc digérées en plus petits fragments par la trypsine lors de la préparation des échantillons), leur absence peut s'expliquer par des problèmes d'identification car ces protéines génèrent peu de peptides « identifiables ». Compte tenu de cet élément, il est probable qu'un ribosome complet ait été co-purifié avec Caf130. L'utilisation de plusieurs protéases pour digérer des peptides à partir de fractions purifiées pourrait aider à vérifier ce point. Les taux d'enrichissement des ribosomes dans la fraction purifiée avec Caf130 n'étaient pas très élevés mais ceci peut résulter du fait que Caf130 ne soit associé qu'à une partie des ribosomes. Aussi, certains ribosomes/polysomes ont pu être perdus lors de la purification du fait de leur grande taille. Pour valider l'association spécifique de Caf130 avec des ribosomes, j'ai utilisé une approche directe à l'aide de gradient de polysomes (Figure R2). Cette observation a été confirmée par une analyse de l'association de Cal4 aux polysomes (Annexe 1). Globalement, les informations recueillies argumentent pour une interaction du module Caf130 avec les ribosomes et un modèle de cette interaction peut être proposé en superposant le modèle AlphaFold que nous avons généré avec une structure de ribosome associé au NAC (Figure 6A article). Cette superposition a été possible grâce à la forte similarité entre les NAC humain et de levure, accentuée par la conservation de deux hélices  $\alpha$ , l'une provenant d'Egd1 (et de Btt1 chez la levure) et l'autre d'Egd2. Ces hélices sont orientées vers le ribosome, permettant une interaction au niveau de la sortie du tunnel. Dans cette configuration, le module Caf130 est

positionné précisément à la sortie du tunnel peptidique du ribosome, prêt à interagir avec les peptides naissants. Ce positionnement du module sur le ribosome étaye fortement le modèle initialement décrit où Btt1 se lie à la protéine Rpl4 qui émerge du tunnel du ribosome et recrute le complexe CCR4-NOT pour que l'ARNm correspondant soit dégradé, lorsque sa chaperonne est absente ou pas en assez grande quantité (Figure D1). Ainsi, pour confirmer ce modèle, la résolution de la structure du module de Caf130, incluant le NAC associé au ribosome pourrait être réalisée. Cela permettrait de fournir de nombreuses informations supplémentaires sur ce mécanisme de contrôle qualité. Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans ce modèle Cal4 se trouve à proximité de l'ARN ribosomale 28S. Comme mentionné précédemment, une similarité entre Cal4 et She2, connue pour lier l'ARN, a été détectée. Cela suggère que Cal4 pourrait potentiellement interagir avec l'ARN ribosomale 28S. Il serait pertinent de tester cette hypothèse à l'aide de techniques telles que la technique de gel-retard mais également par RIP-PCR ou CLIP-seq.

La détection du complexe Pbp1 (Pbp1, Mkt1, Pbp4 et Lsm12) parmi les protéines associées à Caf130 est également intéressante (Figure 1A article), car il contribue à la modulation de la longueur de la queue poly(A) et à la régulation de la traduction (Mangus, Amrani, et Jacobson 1998). Des analyses complémentaires seront nécessaires pour déterminer un éventuel rôle biologique de cette interaction ou conclure que cette co-purification résulte uniquement de l'association aléatoire de ces facteurs aux mêmes ARNm.

Les études précédentes (Giaever et al. 2002; Mulder, Winkler, et Timmers 2005) n'ont pas mis en évidence de phénotype fort résultant de la délétion de Caf130, à l'exception d'une réduction de la croissance à 37°C observée sur boîte (Auesukaree et al. 2009; Pillet et al. 2022). Dans mes mains, la quantification du taux de croissance en milieu liquide à 37°C du mutant de délétion Caf130 et d'une souche de type sauvage n'a pas révélé de différences significatives (Figure R1). Il est possible que la délétion de Caf130 n'affecte que la période transitoire pendant laquelle les cellules s'adaptent à la nouvelle température. Ces observations pourraient laisser penser que Caf130 n'a pas de fonction critique. Cependant, la conservation de Caf130 parmi les levures suggère plutôt que les conditions dans lesquelles la fonction de Caf130 est importante n'ont pas encore été identifiées. La détermination de ces conditions faciliterait grandement son étude fonctionnelle. A cette fin, j'ai testé si l'ajout d'hygromycine

B, qui perturbe le repliement des protéines liées à la traduction, pouvait révéler une altération (Figure R1A). Les résultats se sont avérés négatifs. Il serait intéressant de répéter l'expérience avec un panel plus large de composés chimiques, particulièrement ceux affectant la traduction.

Afin d'explorer les conséquences biologiques et physiologiques des différents facteurs, nous avons adapté un test phénotypique : la fonctionnalité du module Caf130 a été évalué en mesurant son impact sur la croissance de levures dépourvues d'Acl4, la chaperonne spécifique de Rpl4. En effet, la délétion du gène codant pour *ACL4* entraîne une réduction significative de la croissance végétative des levures. Toutefois, ce défaut de croissance est supprimé lorsque le gène de *CAF130* est également délété (Pillet et al. 2022). Cette suppression s'explique par le fait qu'en absence simultanée d'Acl4 et de Caf130, le niveau d'ARNm de RPL4 augmente permettant une synthèse accrue de cette dernière protéine. L'absence du recrutement du complexe CCR4-NOT quand Caf130 est absent, entraîne cette augmentation (probablement suite à une diminution de la déadénylation), ce qui conduit à une synthèse accrue de la protéine ribosomique Rpl4, et par conséquent, une meilleure production de la sous-unité ribosomique 60S, favorisant ainsi une meilleure croissance des cellules (Figure D1).

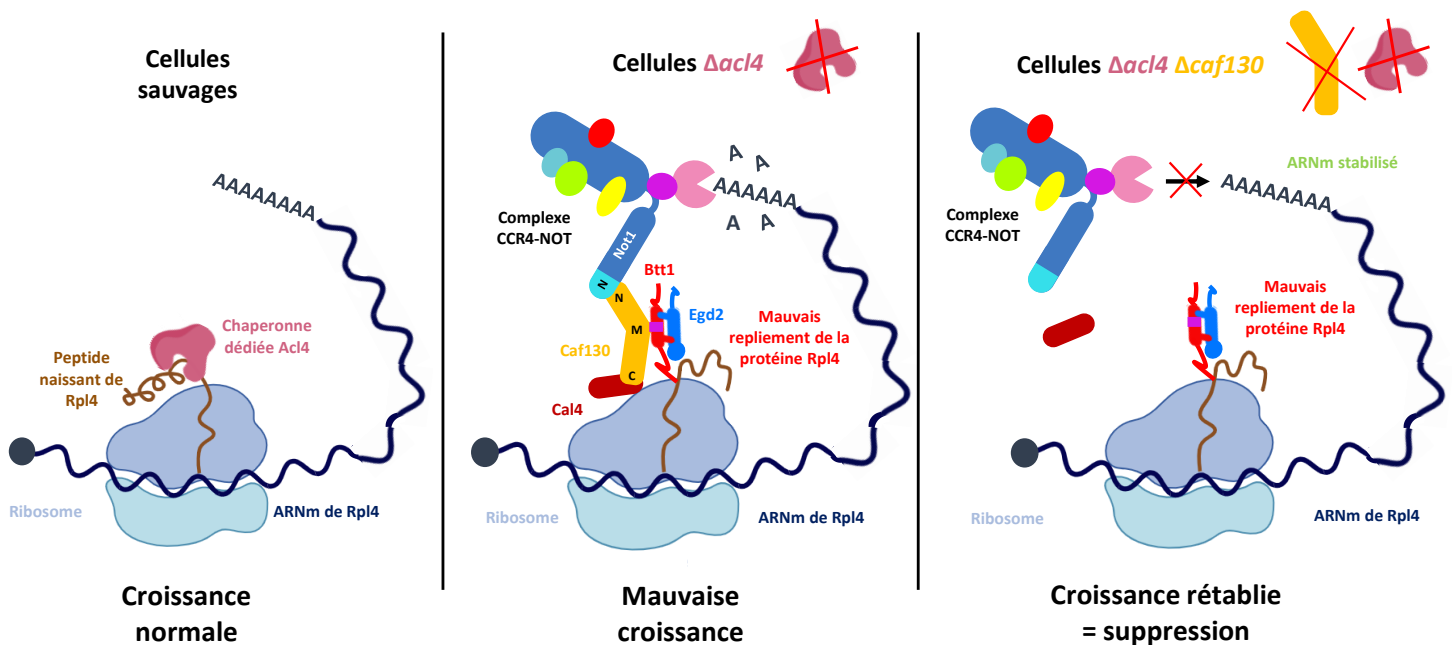


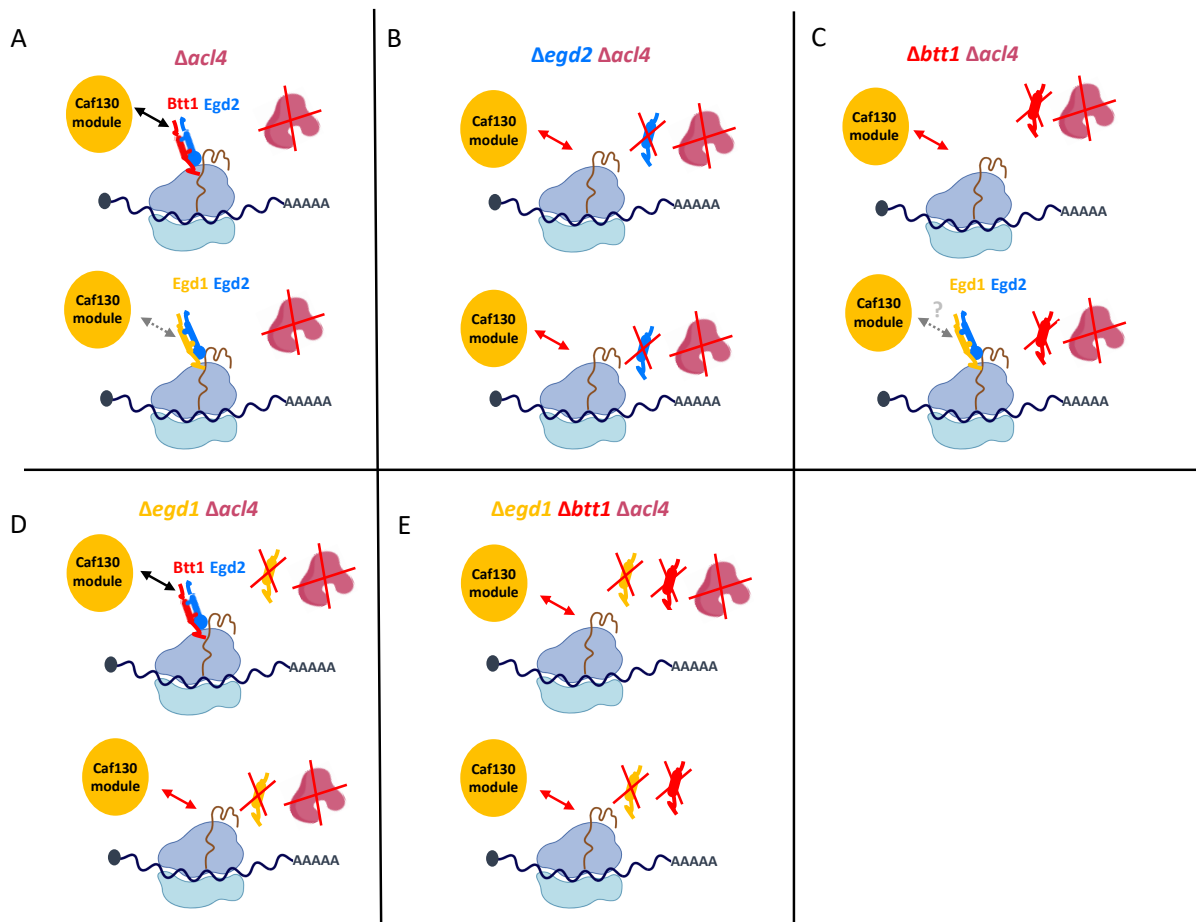
Figure D1 : Représentation schématique du module montrant les effets de la délétion d'Acl4 seule ou en combinaison avec Caf130.

Dans le panel de gauche, en conditions normales, la protéine Rpl4 est correctement repliée grâce à sa chaperonne Acl4 (présente en quantités suffisantes) et est acheminée vers le site d'assemblage du pré-60S dans le noyau (Pillet et al. 2015). Dans la panel central, l'absence (ou l'insuffisance) d'*acl4* entraîne une dégradation co-traductionnelle de l'ARNm de Rpl4, initiée par le complexe CCR4-NOT recruté via le module Caf130. Dans le panel de droite, l'absence de *caf130* supprime le phénotype de croissance associé à l'absence d'*acl4* et bloque le recrutement du complexe CCR4-NOT, stabilisant ainsi les niveaux de l'ARNm de Rpl4.

Cette stratégie nous a permis d'évaluer les phénotypes des différents partenaires du module de Caf130. Nos résultats montrent que l'absence de Caf130, Cal4, Not1<sub>N</sub> et Egd2 entraîne une suppression presque complète du phénotype de croissance lié à l'absence d'Acl4 (Figure 6B article). En revanche, nous avons observé que l'absence de Btt1 ne supprime ce phénotype que partiellement, suggérant que Btt1 a un rôle limité dans le mécanisme. La délétion de son paralogue, Egd1, n'affecte pas le phénotype de croissance associé à l'absence d'Acl4. Cependant, les délétions conjointes de *btt1* et d'*egd1* suppriment totalement le phénotype de croissance. Cette observation suggère qu'en l'absence de *btt1*, Caf130 peut interagir avec Egd1-Egd2, bien que plus faiblement qu'avec Btt1-Egd2, permettant ainsi le maintien du recrutement du complexe CCR4-NOT, via Caf130, aux ribosomes traduisant Rpl4, lorsque son repliement est lent (Figure D2). Ce résultat argumente en faveur de l'hypothèse d'une interaction entre Caf130 et Egd1. Des résultats de tests double hybride sont aussi compatibles avec ce modèle. Ainsi, ces données expliquent pourquoi la délétion d'Egd2 provoque une suppression complète du phénotype : son absence empêche Caf130 de se lier à la fois à Btt1 et à Egd1, bloquant ainsi le recrutement du complexe CCR4-NOT aux ribosomes traduisant la protéine RPL4 (Figure D2).

Ainsi, le couplage traduction-dégradation est bénéfique pour les cellules car il permet une régulation rapide de la quantité de certaines protéines, surtout en conditions de stress ou de dysfonctionnement. Ce mécanisme est essentiel pour gérer les protéines mal repliées et/ou potentiellement délétères, qui peuvent perturber la fonction cellulaire. En éliminant les protéines mal repliées, les cellules évitent leur accumulation, réduisant ainsi le risque de formation d'agrégats et assurant un contrôle de qualité, tout en économisant les ressources en empêchant leur accumulation inutile.

Afin de poursuivre l'investigation du rôle du complexe CCR4-NOT dans ce mécanisme de contrôle qualité, il serait pertinent de vérifier si l'inhibition de l'activité de la déadénylase principale Ccr4 (Caf1 n'ayant qu'un rôle marginal dans la catalyse de la déadénylation chez *S. cerevisiae*) sur l'ARNm codant RPL4 supprime aussi le phénotype de  $\Delta acf4$ . Des mutants ponctuels de Not1 connus pour bloquer l'interaction avec Caf1/Ccr4, ont été identifiés précédemment au laboratoire (Basquin et al. 2012). Pour tester si ceux-ci suppriment la mutation  $\Delta acf4$  sans affecter l'ensemble de la déadénylation, ces mutants insérés dans une version complète de Not1 pourraient être introduit dans une souche  $\Delta acf4$  contenant une version tronquée Not1 ( $\Delta N$ -terminal). La forme de Not1 sans son domaine N-terminal et donc incapable de se lier à Caf130 sera impliqué dans la déadénylation générale tandis que Caf130 agira au travers de la forme mutante de Not1 complet à laquelle il se lie.



**Figure D2 : Représentation schématique des effets de la délétion conjointe d'Acl4 avec les différents membres du module de Caf130.**

Dans chaque panel, le schéma du haut illustre le recrutement du module Caf130 par le NAC<sup>Btt1</sup> au ribosome, tandis que le schéma du bas montre celui du complexe NAC<sup>Egd1</sup>. (A) La délétion d'*acl4* entraîne le recrutement du module Caf130 majoritairement par le complexe NAC<sup>Btt1</sup> (illustré par une flèche noire), et plus faiblement par le NAC<sup>Egd1</sup> (indiqué par une flèche grise). (B à E) La flèche rouge indique l'absence de recrutement du module Caf130 par les deux NAC. (B) La délétion d'*egd2* supprime le phénotype de croissance de l'absence d'*acl4*, (C) tandis que l'absence de *btt1* le supprime partiellement. (D) L'absence d'*egd1* n'a pas d'impact sur l'effet phénotypique lié à *acl4*. (E) La délétion simultanée de *btt1* et *egd1*, en plus d'*acl4*, supprime l'effet phénotypique

Le test de suppression de  $\Delta acl4$  permettrait aussi de tester si les mutations N460 et P461 introduite dans Caf130, ou de valider que la mutation G162V introduite dans Cal4 (déjà montré par (Pillet et al. 2022) sont fonctionnelles.

Il serait aussi intéressant de déterminer si les suppressions révélées par le test phénotypique sont corrélées à la longueur de la queue poly(A) des ARNm codant pour les protéines Rpl4A et/ou Rpl4B. Par exemple, dans la souche  $\Delta acl4$  les queues polyA de *RPL4A* ou *RPL4B* devraient être raccourcies par rapport à la souche  $\Delta acl4/\Delta caf130$ , où le recrutement du complexe CCR4-NOT et donc des déadénylases, est perdu. Pour tester cette possibilité, une adaptation à la levure de la technique de RACE-PAT (Rapid Amplification of cDNA Ends combined with Poly(A) Test) initialement développée pour les ARNm de cellules humaines dans l'équipe (Mauxion et Séraphin 2024) a été effectuée. Des premiers tests ont été réalisés, mais les résultats ne n'ont pas été assez concluants. Une poursuite de l'optimisation de cette méthode devra être réalisée.

De manière intéressante, la conservation de séquences des protéines Caf130 représentée sur la structure de cette protéine prédite par AlphaFold montre une région hautement conservée (Figure 4D article). Cette région forme un sillon dans lequel s'insère une hélice d'Egd2. Ceci suggère fortement la possibilité d'un contact direct et important entre ces deux protéines. Cette observation suggère que Btt1 ne fait qu'accroître l'affinité du NAC pour Caf130 par rapport à l'affinité du NAC composé d'Egd2 et Egd1. Elle est en accord avec les phénotypes de suppressions observé pour  $\Delta egd2$ ,  $\Delta btt1$ ,  $\Delta egd1$  et  $\Delta btt1\Delta egd1$  (Figure 6B article). Il serait intéressant de générer des mutants ponctuels, à la fois dans la région conservée de Caf130 et dans l'hélice d'Egd2 adjacente, afin de tester si l'interaction entre Caf130 et le NAC est encore maintenue. Une fois les mutants validés par des tests

d'interactions, ils pourront, selon le même principe que pour les mutants précédents (Caf130 N460, P461 et Cal4 G162V), être validés fonctionnellement à l'aide du test phénotypique.

L'analyse de la conservation de Caf130 reportée sur sa structure a révélé la présence d'une autre région conservée, située à l'écart des autres régions d'interactions avec les différents partenaires de Caf130 (Figure 4E article). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées quant à la fonction de cette région. La première hypothèse est qu'elle pourrait permettre le recrutement de Caf130 au ribosome. Pour tester cela, des mutations ponctuelles dans cette région pourraient être introduites, suivies d'analyses de polysomes pour vérifier si Caf130 est toujours recrutée aux ribosomes/polysomes. La deuxième hypothèse suggère que cette région pourrait interagir avec une ou plusieurs autre(s) protéine(s) encore inconnue(s). Divers candidats issus de nos analyses de l'interactome de Caf130 pourraient être testés pour explorer cette possibilité.

Nos données, ainsi que celles publiées, corroborent l'importance du complexe CCR4-NOT, non seulement pour son activité de déadénylase, mais aussi pour les fonctions de ses différentes sous-unités. Ces dernières lui confèrent un rôle essentiel dans divers processus cellulaires, notamment dans la régulation co-translationnelle de certaines protéines ribosomiques, comme décrite dans cette étude. Le complexe CCR4-NOT peut ainsi s'adapter aux besoins spécifiques des cellules, en orientant son activité ou ses interactions pour maintenir l'équilibre des processus cellulaires.

Ma thèse a permis d'identifier, de cartographier et de valider l'organisation du module Caf130 du complexe CCR4-NOT de levure qui comprend la région N-terminale de Not1 associée aux protéines Caf130, Cal4, Btt1 et Egd2. Un modèle structural généré par AlphaFold a été superposé à une structure du ribosome associé au NAC, étayant le modèle de contrôle qualité initialement décrit. Ce modèle sert également de base pour orienter une étude structurale par cryo EM. En parallèle, l'utilisation d'un test phénotypique a confirmé que ce module est primordial dans ce mécanisme de contrôle qualité. Dans l'ensemble, mes données renforcent ce modèle de ciblage des ARNm codant pour des protéines potentiellement délétères lorsqu'elles sont exprimées de manière non contrôlées.

# Matériel et méthodes

## 1. Analyses *in silico*

### 1.1. Recherches de similarité

La détermination de similarité entre CNOT11 et Caf130 mais également entre Cal4 et She2 ont été réalisés par des analyses de similarité de séquences hautement sensibles, basées sur le modèle de « Hidden Markov Model » (HMM) (Jackhmmer), pour identifier des séquences protéiques conservées, comme des motifs spécifiques, à travers différentes espèces. En complément, des analyses DALI, focalisées sur la comparaison des structures 3D des protéines par alignement structurel, ont également été effectuées.

### 1.2. Alignement de séquences multiples

Les séquences protéiques des protéines d'intérêt de différents organismes (dont l'homme et la levure) ont été extraites de plusieurs bases de données (Uniprot, SGD, etc.). Les fichiers FASTA extraits ont ensuite été rassemblés, puis alignées par le logiciel ClustalX.

### 1.3. AlphaFold

Nos premières prédictions structurales ont été effectuées avec AlphaFold 2, qui a généré 25 prédictions. Cependant, elles ont été refaites suite à l'apparition d'AlphaFold 3. Dans cette nouvelle version, la (ou les) séquence(s) protéique(s) est (sont) importée(s) dans le logiciel AlphaFold3, qui génère 5 prédictions. Divers paramètres permettant d'évaluer la confiance des prédictions sont également fournis. Le score pLDDT estime la confiance de prédiction au niveau de chaque atome sur une échelle de 0 à 100, une valeur élevée indiquant une forte confiance. Un score pTM (predicted template modeling) supérieur à 0,5 suggère que le repliement de la protéine est similaire à une structure réelle.

Le logiciel peut être aussi utilisé pour prédire les interactions entre deux ou plusieurs protéines. Dans ce contexte, il génère plusieurs prédictions avec les mêmes indicateurs de confiance, auxquels s'ajoute le score ipTM (interface predicted template modeling). Ce dernier évalue la précision des positions relatives des différentes sous-unités du complexe

protéique modélisé : une valeur supérieure à 0,8 indique une grande fiabilité ; une valeur comprise entre 0,6-0,8 suggère une prédiction correcte mais avec des incertitudes qui subsistent ; en dessous de 0,6, la prédiction est considérée comme peu fiable.

## **2. Souches et milieux**

### **2.1. Milieux pour bactéries**

Les cellules bactériennes ont été cultivées soit en milieu liquide, soit sur des boîtes d'agar, en fonction du but expérimental. Le milieu de culture le plus couramment utilisé pour la culture bactérienne est le LB (Lysogeny Broth): 10 g/L bactotryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L NaCl (Sigma L3022). Le milieu d'auto-induction Terrific Broth composé de : 12 g/L tryptone, 24 g/L d'extrait de levure, 3.3 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 6.8 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7.1 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 g/L glucose, 2 g/L α-lactose, 0.15 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.03 g/L (Formedium AIMTB0210), a été utilisé pour l'expression de protéines.

En fonction du marqueur de sélection présent sur le plasmide transformé dans des bactéries, le milieu liquide ou les boîtes d'agar sont supplémentés avec l'antibiotique approprié à une concentration définie : ampicilline (100 µg/mL), kanamycine (50 µg/mL), gentamycine (30 µg/mL).

### **2.2. Souches bactériennes et plasmides**

La souche d'*Escherichia coli* MH1 (araD39, ΔlacX74, galE, galK, hsr, rpsL) a été utilisée pour la transformation et l'amplification d'ADN. La souche d'*Escherichia coli* BL21 CodonsPlus-RIL (F- ompT hsdS (rB - mB -) dcm+ Tetr gal λ endA Hte [argU ileY leuW CamR]) a été employée pour l'expression de protéines. Sauf indication contraire, les cultures bactériennes ont été incubées à 37°C et agitées à 170 rpm pour les cultures liquides.

### **2.3. Milieux pour levure**

Les cultures de levures ont été réalisées sur milieu liquide et solide, incubées à 30°C, à l'exception pour les souches thermosensibles incubées à 25°C. Les cultures liquides ont été

agitées à 170 rpm. Le milieu le plus couramment utilisé pour la culture des levures est le YPDA (Yeast Peptone Dextrose Adenine): 10 g/L yeast extract, 30 g/L bacto peptone, 20 g/l glucose, 40 mg/L adenine sulfate (Formedium CCM1010). En fonction des marqueurs génétiques des différentes souches de levures, des milieux minimum CSM (MP Biomedicals) ont été utilisés pour la sélection, ainsi que des marqueurs de résistance, tels que G418 et l'hygromycine, employés dans cette étude.

## **2.4. Souches de levure**

Toutes les souches utilisées dérivent de la souche W303 (MATa ; ade2-1; his3-11,-15 ;leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1), et sont présentées dans le tableau en Annexe 2.

## **3. Méthodes de biologie moléculaire**

### **3.1. Isolation d'ADN à partir d'*E.coli***

Pour obtenir de grandes quantités d'ADN plasmidique, des bactéries ont été cultivées dans 100 mL de milieu LB supplémenté avec l'antibiotique approprié. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation à 5 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Eppendorf 5804 R. L'extraction de l'ADN a été effectuée à l'aide du kit MACHEREY-NAGEL® NucleoBond®Xtra Midi, conformément aux instructions du fabricant. Les concentrations finales d'ADN ont été mesurées avec un spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000.

Pour des quantités plus petites, le kit MACHEREY-NAGEL® NucleoSpin®Xtra Plasmid EasyPure a été utilisé, selon les recommandations du fabricant. Ces petites préparations d'ADN plasmidiques ont également pu être réalisées à l'aide du robot epMotion 5075 (Eppendorf).

### **3.2. Réaction en chaîne par Polymérase (PCR)**

La PCR a été utilisée pour amplifier des fragments d'ADN. Les réactions PCR ont été réalisées à partir de 100 à 200 ng de matrice d'ADN, dans un volume total de 50 µL d'un « mix PCR » contenant : 1X de Buffer Phusion HF ; 0,5 µM de chaque amorce, 0,2 mM dNTP et 1 U

de Phusion HF (Haute-Fidélité) (Thermo Scientific). Les amorces utilisées sont détaillées en Annexe 7. Les échantillons ont d'abord été dénaturés pendant 3 min (minutes) à 95°C, puis soumis à 30-35 cycles PCR comprenant une dénaturation à 95°C pendant 5-10 sec (secondes), une hybridation entre 45-72°C (selon le  $T_m$  des amorces), durant 10 à 30 sec et une élongation à 72°C pendant 15 à 30 sec pour 1kb d'ADN à amplifier. Une élongation finale de 5 à 10 min à 72°C, conclut la réaction.

Pour les PCR de vérification, la Taq DNA polymérase (Biolabs) a été utilisée dans un volume total de 25  $\mu$ L : 1X Buffer Taq, 0,2 mM dNTP, 0,2  $\mu$ M de chaque amorce, 1,25 U Taq DNA polymérase, 1 à 10 ng d'ADN matrice. Les paramètres thermiques suivants ont été choisis: dénaturation initiale à 95°C durant 30sec à 1min, 30-35 cycles de PCR : (95°C durant 15 à 30 sec, 45 à 68°C (selon le  $T_m$  des amorces) pendant 15 à 60 sec et 68°C durant 1 minute pour 1kb d'ADN à amplifier, et une élongation finale de 5 minutes à 68°C.

Ensuite, 5  $\mu$ L des produits PCR obtenus ont été additionnés à 1  $\mu$ L de tampon de charge (6X DNA Loading Dye, Thermo Scientific) puis analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, dans du tampon 0.5x Tris-borate-EDTA (TBE) contenant 0.25  $\mu$ g/ml de bromure d'éthidium. Les produits ont été visualisés à l'aide d'un transilluminateur UV (NuGenius).

### **3.3. Digestion par enzyme de restriction**

Ce protocole a été utilisé dans divers protocoles, tels que pour la préparation de clonage (section 3.5), la vérification des clonages, la génération de mutants ponctuels (en cas d'insertion ou de suppression d'un site de restriction), ainsi que pour la vérification des produits de PCR. A partir des conditions recommandées par le fabricant, comme New England Biolabs, les paramètres ont été ajustés en fonction du volume final et des enzymes de restrictions utilisées, incluant le choix du tampon approprié, ainsi que la durée et la température d'incubation. Par exemple, pour un volume final de 50  $\mu$ L, 1  $\mu$ g d'ADN a été supplémenté avec 5  $\mu$ L de tampon 10X de l'enzyme (concentration finale à 1X) et 10 unités d'enzyme de restriction étaient généralement suffisantes pour digérer 1  $\mu$ g d'ADN. Les produits de digestion sont ensuite extraits de la manière décrite dans le paragraphe 3.4.

### **3.4. Extraction par Phénol Chloroforme Isoamyle (PCI) et précipitation à l'éthanol**

Après les réactions PCR et les digestions par des enzymes de restrictions, les acides nucléiques ont été extraits puis précipités. Pour ce faire, ils ont été additionnés d'un volume équivalent de phénol chloroforme isoamyle (PCI) (25:24:1), afin de dénaturer et précipiter les protéines, les séparant ainsi des acides nucléiques. Afin de réaliser cette extraction, le volume de l'échantillon doit être d'au moins 100 µL, si nécessaire, il a été ajusté avec du tampon TE (Tris-EDTA). L'échantillon a ensuite été vortexé pendant 1 minute, puis centrifugé à 14 000 rpm pendant 5 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf 5417 C. Trois phases ont été obtenues: une phase aqueuse (en haut) contenant l'ADN et/ou l'ARN, une interface contenant souvent les protéines précipitées et une phase organique (en bas) renfermant également des protéines et d'autres contaminants. La phase aqueuse a été soigneusement récupérée (sans perturber l'interface) puis complétée avec pour 100µL de phase aqueuse (ajustée pour les volumes plus importants) dans l'ordre : 11 µL de NaOAc (0,3M finale) et 275 µL d'éthanol (2,75 volumes) (-20°C). L'ensemble a été mélangé par inversion, puis incubé au moins 1 heure à -20°C. L'ADN précipité a ensuite été centrifugé pendant 20 minutes à 14 000 rpm à 4°C dans une centrifugeuse Eppendorf 5417 C, puis lavé avec 1 mL d'éthanol 70% (-20°C), puis centrifugé à nouveau dans les mêmes conditions durant 10 minutes. Le surnageant a été retiré, et le culot a été séché avant d'être resuspendu dans un volume désiré de tampon TE (Tris-EDTA).

### **3.5. Ligation dans un gel d'agarose**

Dans un premier temps, une digestion du ou des plasmides vecteur avec le ou les produits PCR d'intérêt, préalablement digérés (avec les mêmes enzymes de restrictions que pour le plasmide), a été réalisée. Après vérification des digestions sur gel, ceux-ci ont été extraits par PCI et précipité à l'éthanol, comme expliqué dans la section 3.4. Ensuite, un fractionnement sur gel d'agarose Low-melting SeaPlaque GTG (Lonza), pour les grands fragments (1-20 kb) et/ou sur gel d'agarose Low-melting Nusieve GTG (Lonza), pour les petites fragments (0,1- 1,5 kb), a été effectué dans du tampon de migration Tris-acétate (TA) 1X (10mM Tris ; 0,3% acide acétique). Le pourcentage d'agarose de chaque gel a également été adapté en fonction de la

taille des fragments (0.5% à 3% au cours de ma thèse). La polymérisation du gel s'est faite durant 1 heure à température ambiante puis sa température a été mise à équilibrer à 4°C durant 1-2 heures. Les échantillons ont été repris dans du tampon de charge 1X et chargés sur le gel choisis. La migration été effectuée dans un tampon TA 1X, à 4°C et à raison de 5V/cm (soit 60V avec la taille de nos cuves d'électrophorèse) durant 4 à 5 heures. Le gel a ensuite été coloré dans un bain de 50 mL de tampon TA 1X, contenant 0.5 à 1 µg/ml de BET, sous agitation et à l'obscurité pendant 30 minutes. Les bandes ont été visualisées sur une plaque à lumière bleue Safe Imager™ 2.0 Blue-Light Transilluminator (Thermo Fisher Scientific), puis coupées avec des scalpels stériles et transférées dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL. Les bandes d'ADN ont été ensuite fondues à 68°C pendant 10 minutes, vortexées, puis maintenues à 42°C sous forme liquide.

Ensuite, la ligation permet d'insérer des fragments d'ADN dans des vecteurs. Pour ce faire, (dans le cas d'une ligation à deux fragments) un mélange d'un volume de fragment PCR (5 µL) avec d'un volume de vecteur (5 µL), et deux volumes de tampon de ligation (10 µL) comprenant 0,25 U T4 DNA ligase New England BioLabs ainsi que le tampon commercial correspondant (2X). Deux contrôles ont été également réalisés : un avec seulement le vecteur (sans insert) et un autre avec uniquement l'insert, avec un volume de tampon de ligation. Les réactions ont ensuite été placées à 16°C pendant une nuit. Les réactions de ligations ont été fondues à 68°C pendant 10 minutes, puis maintenues à 42°C. La moitié de chaque réaction de ligation a été transférée dans un tube contenant 50 µL de CaCl<sub>2</sub> à 50 mM, préchauffé au préalable à 42°C, pour effectuer une transformation bactérienne, en suivant le protocole décrit ci-dessous.

### **3.6. Transformation bactérienne**

Pour les transformations bactériennes et l'amplification de l'ADN, la souche MH1 d'*E.coli* a été utilisée. Les bactéries ont été préalablement rendues compétente en les traitant avec 50 mM de CaCl<sub>2</sub>. 100-250 ng de plasmides ont été ajoutés à 100 µl de cellules compétentes, puis incubés sur glace pendant 20-30 minutes. Un choc thermique de 90 secondes à 42°C a été appliqué, suivi d'une incubation sur glace pendant 2-3 minutes. Après cela, 1 mL de LB a été ajouté aux tubes, qui ont ensuite été incubés à 37°C pendant 45 minutes.

Enfin, 200  $\mu\text{L}$  ont été étalés sur un milieu sélectif contenant l'antibiotique approprié, et les boîtes de transformation ont été incubées à 37°C durant la nuit.

### **3.7. Mutagénèse dirigée**

La mutagénèse des différents plasmides a été réalisée selon les instructions du protocole QuikChange II-E (Agilent). Plusieurs paramètres ont été pris en compte pour la conception des oligonucléotides: une taille entre 25 et 45 pb avec entre 10 à 15 nucléotides autour de la région à muter, un pourcentage de GC d'au moins 40%, et une terminaison par un C ou G. Idéalement, un site de restriction a été ajouté ou supprimé à l'endroit de la mutation.

La mutation a été introduite au sein de la matrice d'intérêt par une amplification par PCR. Les échantillons ont été préparés dans un volume total de 25  $\mu\text{L}$  : 2,5  $\mu\text{L}$  du tampon de réaction 10 $\times$  (Agilent), 0,5  $\mu\text{L}$  d'ADN matrice (50 ng/ $\mu\text{L}$ ), 0,5  $\mu\text{L}$  de chaque oligonucléotide (10 $\mu\text{M}$ ), 0,625  $\mu\text{L}$  de dNTP (10mM) et 0,5  $\mu\text{L}$  of PfuUltra II Fusion HotStart DNA polymerase (Agilent), complété à 25  $\mu\text{L}$  avec l'eau ultrapure. Les paramètres thermiques suivants ont été choisis: dénaturation initiale à 95°C durant 3 min, suivie de 30 cycles de PCR : (95°C durant 30 sec, 55°C pendant 30 sec et 72°C durant 2 minute), puis d'une élongation finale de 5 min à 72°C.

Les produits de PCR obtenus ont ensuite été directement supplémentés avec 1  $\mu\text{L}$  de l'enzyme DpnI (Biolabs) afin de sélectionner les produits ayant intégré la mutation. Cette digestion s'est effectuée durant 1h30 à 37°C. 1  $\mu\text{L}$  de l'échantillon digéré a ensuite été directement transformé avec 100 $\mu\text{L}$  de bactéries MH1, en suivant le même protocole décrit dans la section 3.6. Les clones obtenus ont été mis en culture, puis l'ADN a été extrait avec un kit de préparation plasmidique en petite quantité (comme expliqué dans la section 3.3). Les différents clones ont été digérés à l'aide du site de restriction inséré ou supprimé pour vérifier la présence de la mutation (selon la section 3.3), puis confirmés par séquençage (Eurofins Genomics).

## **4. Manipulation de la levure**

### **4.1. Transformation d'ADN dans la levure**

La veille de la transformation, 2  $\mu$ L d'une souche d'intérêt issue d'une pré-culture poussée à saturation a été inoculée dans 50 mL de milieu de culture et incubée pendant la nuit à 30°C (ou 25°C pour les souches thermosensibles) avec agitation à 170 rpm. Lorsque la densité optique (DO) à 600nm de la culture a atteint 0,8-1,0, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 5 000 rpm pendant 5 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Eppendorf 5804 R. Le culot a été lavé avec 50 ml de TrisCl 10mM (pH 7,5). Après une nouvelle centrifugation, le culot a été resuspendu dans 25 mL de solution LiT (10 mM Tris-HCl, 100mM LiOAc), supplémenté à 1mM DTT, puis incubé pendant 40 minutes à température ambiante. Pendant cette incubation, des tubes de transformation ont été préparés avec 50  $\mu$ L de LiT, 5  $\mu$ L d'ADN carrier (ADN de sperme de saumon soniqué à 10 mg/ml) dénaturé 10 min à 95°C, et 0.5 à 1  $\mu$ g de chaque plasmide désiré (1-10  $\mu$ L en fonction de la concentration initiale). Un contrôle sans ADN ainsi qu'un contrôle positif de transformation ont également été réalisés. Après l'incubation, les cellules ont été récoltées comme précédemment, puis resuspendues dans 750  $\mu$ L de LiT et 1 mM de DTT. Ensuite, 100  $\mu$ L de ces cellules compétentes ont été ajoutés aux tubes de transformation, qui ont été incubés pendant 10 minutes à température ambiante. Après cela, 300  $\mu$ L de solution de PEG (2 mL LiT, 2 g PEG 4000) ont été ajoutés, puis les échantillons ont été incubés pendant 10 minutes à température ambiante, suivis de 15 minutes à 42°C. Les cellules ont été récoltées par centrifugation à 14 000 rpm durant 10 secondes dans une centrifugeuse Eppendorf 5417 C, puis re-suspendues dans 1 mL de milieu YPDA et régénérées pendant 1 heure à 30°C sous agitation douce. Après régénération, les cellules ont été à nouveau centrifugées à 14 000 rpm pendant 1 minute dans une centrifugeuse Eppendorf 5417 C, et resuspendues dans 100  $\mu$ L de TrisCl 10 mM (pH 7,5) avant d'être étalées sur un milieu sélectif. Les boîtes de transformation ont été incubées à 30°C pendant 48 heures (ou 25°C pendant 72 heures pour les souches thermosensibles).

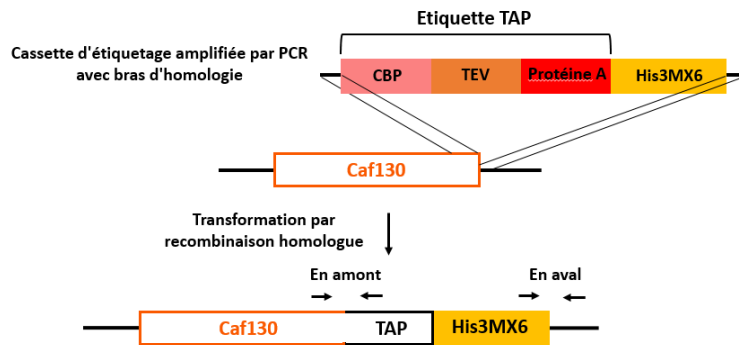
## **4.2. Construction de souche**

### **4.2.1. Génération de constructions génomiques marquées par une étiquette TAP à l'extrémité C-terminale**

Les souches étiquetées TAP ont été construites par intégration de la cassette codant celle-ci en C-terminal, en aval et en phase avec la séquence codante d'intérêt, par recombinaison homologue dans des souches de levure haploïdes (Figure M1). Dans un premier temps, des oligonucléotides ont été conçus pour amplifier la séquence codante de l'étiquette C-TAP ainsi que le marqueur de sélection HIS3, à partir du plasmide pBS2602 (TAP-T7-HIS3). Ces oligonucléotides comportaient chacun 45 nucléotides de la séquence génomique correspondante, permettant ainsi de diriger la recombinaison homologue. Les produits d'amplification ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les produits PCR ont ensuite été extraits avec du phénol chloroforme isoamyle (PCI), puis précipités avec de l'éthanol 100% avant d'être remis en suspension dans du tampon TE. Ils ont ensuite été transformés dans les souches cibles selon le protocole décrit précédemment.

Les transformants ont été ensuite sous-clonés sur une boîte assurant la même sélection, afin d'éliminer les cellules résiduelles non transformées. Les clones isolés ont été disposés sur une boîte YPDA, incubée à 30°C pendant 1 jour, avant d'être répliqués sur différents milieux pour confirmer la présence des marqueurs attendus. L'ADN des transformants positifs a été extrait, et l'intégration correcte de la cassette TAP a été vérifiée par deux réactions PCR couvrant les deux sites d'intégration. Une étape d'extraction rapide de l'ADN a également pu être réalisée en plaçant directement les colonies dans des barrettes PCR, suivie d'un passage de 1 minute au micro-onde (500W) avant de procéder à la PCR de vérification.

Enfin, la présence et l'expression de l'étiquette TAP ont été vérifiées par Western-Blot (décrit dans une prochaine section 5.4.2). Les souches validées ont été stockées à -80°C dans 30% de glycérol stérile.

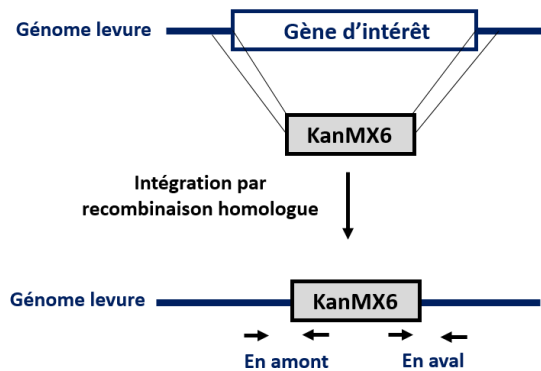


**Figure M1 : Schéma de l'intégration de l'étiquette TAP en C-terminal de la protéine d'intérêt (exemple : Caf130).**

#### **4.2.2. Délétion d'un gène de levure**

Pour la construction des souches mutantes par délétion, une stratégie similaire à celle décrite précédemment a été adoptée, à la différence que les oligonucléotides (tableau disponible en Annexe 7) ont été conçus pour diriger l'élimination complète de la séquence codante du gène cible sans affecter les séquences codantes adjacentes (Figure M2). Différents marqueurs de sélection ont été utilisés pour remplacer les gènes ciblés. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé :

- pBS2379 pour le marqueur KanMX6, conférant une résistance à l'antibiotique G418 ;
- pBS2381, contenant le gène HisMX6, complétant le gène his3 de levure et conférant une auxotrophie à l'histidine ;
- pBS4929 qui confère une résistance à l'hygromycine ;
- pBS2380, contenant le gène TRP1, complétant le gène trp1 de levure et conférant une auxotrophie au tryptophane.



**Figure M2 : Schéma illustrant la délétion d'un gène d'intérêt chez la levure, remplacé par un marqueur de sélection (exemple ici avec KanMX6).**

#### 4.2.3. Dissection

Pour la combinaison de mutations ou de variants génétiques, des croisements de mutants préexistants ont été réalisés. Les souches concernées ont été croisées sur milieu YPDA afin d'obtenir des diploïdes. Ces derniers ont été sélectionnés à l'aide de marqueurs génomiques ou plasmidiques introduits au préalable. Après validation et éventuelle perte de plasmide, les diploïdes ont été incubés plusieurs jours à 30°C (sauf indication contraire) sur un milieu de sporulation afin de générer des tétrades. Les levures sporulées ont été resuspendues dans 50 µL de mélange Zymolyase/SCE (1M sorbitol, 0,1M NaCitrates pH7) et incubées pendant 8 minutes pour digérer la paroi de l'asque. La réaction a été stoppée par l'ajout de 500 µL d'eau stérile, puis un aliquote des cellules a été déposé sur boîte YPDA.

La dissection de tétrades a été réalisée à l'aide du système MSM de Singer Instrument. La boîte de dissection a été incubée à 30°C (sauf indication contraire) pendant deux à cinq jours. Les cellules provenant des différentes spores ont été disposées sur une boîte « Master » YPDA, puis répliquée sur divers milieux de sélection pour déterminer les génotypes et vérifier la ségrégation des marqueurs. Des croisements avec des souches testrices ont permis de déterminer le type sexuel de chaque spore. Si nécessaire, un génotypage par PCR a été utilisé pour vérifier la ségrégation d'allèles spécifiques.

L'utilisation de la technique de dissection nous a également permis de réaliser nos tests fonctionnels (détaillé dans la section 4.4) mais aussi à introduire des mutants qui ne sont pas des délétions de gènes comme la souche Not1--ΔN (BSY3851).

#### **4.2.4. Extraction rapide de protéines chez la levure**

Ce protocole a été basé sur celui décrit par (Kushnirov,2000). Les cellules ont été cultivées dans 2 mL de milieu YPDA jusqu'à obtenir une D.O d'environ de 1, puis elles ont été récoltées par centrifugation à 14 000 rpm pendant 2 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf 5417 C. Les culots ont été re-suspendus dans 100 µL d'eau stérile, 100 µL NaOH (200Mm), suivis d'une incubation durant 5 minutes à température ambiante. Les échantillons ont de nouveau été centrifugés à 14 000 rpm pendant 5 minutes dans la même centrifugeuse que précédemment, et les culots ont été re-suspendus dans 50 µL de tampon de chargement de protéines ((Bleu de bromophénol 0.006%, 2-mercaptoethanol 15%, glycerol 30%, SDS 6%, Tris-HCl 0.187 M). Ces échantillons ont ensuite été analysés par Western-blot, comme décrit dans une prochaine section 5.4.2.

### **4.3. Double hybride**

#### **4.3.1. Clonage Gateway**

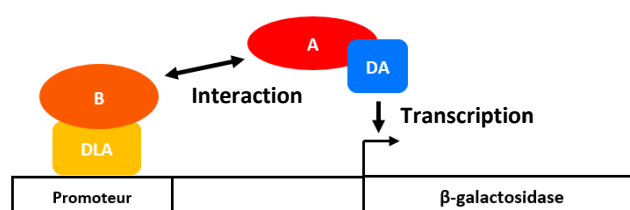
Le clonage Gateway a été utilisé pour construire des plasmides destinés aux tests de double hybride. Les séquences codantes d'intérêt ont été amplifiées par PCR à partir de plasmides ou d'ADN génomique de levure, en utilisant des oligonucléotides spécifiques (Annexe 7). Ces séquences ont ensuite été insérées dans le vecteur pDONR221 conformément au protocole du manuel "Gateway Technology " (Invitrogen). Après transformation, les clones ont été vérifiés par digestion de la mini-préparation d'ADN, et l'absence de mutations indésirables a été confirmée par séquençage réalisé par la société Eurofins Genomics. Les inserts corrects ont été transférés dans des vecteurs contenant le domaine de liaison à l'ADN (DLA) et le domaine d'activation (DA) par des réactions Gateway LR selon les indications du manuel " Gateway Technology " (Invitrogen), à l'exception du temps de réaction éventuellement raccourci à 1h ou pour les inserts problématiques (par exemple très court) étendu à toute une nuit. Après transformation, les clones ont été vérifiés par digestion des mini-préparation d'ADN. Les clones validés ont été stockés dans 15% de glycérol à -80°C. L'ensemble des plasmides construits est répertorié dans le tableau situé en Annexe 4.

### 4.3.2. Transformation chez la levure de plusieurs plasmides

Afin d'introduire les plasmides de double hybride codant les différentes protéines dans la souche de levure MAV203 (Invitrogen), une transformation a été réalisée selon la méthode décrite ci-dessus excepté le fait que les cellules ont été remises en suspension dans 200  $\mu$ L de TrisCl 10 mM pH 7.5, avant d'être étalées sur des boîtes de milieu CSM -Trp, -Leu. Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 48 heures. Les plasmides utilisés pour les tests de doubles hybrides sont listés dans le tableau en Annexe 4.

### 4.3.3. Analyse des niveaux de $\beta$ -galactosidase à l'aide du système de dosage $\beta$ -glo

Le système de dosage  $\beta$ -glo (Promega) permet de mesurer les niveaux d'activité de la  $\beta$ -galactosidase à l'aide d'un test luminescence. Ce test a été effectué selon les recommandations du fabricant. Brièvement, 3 clones transformés ont été inoculés en triplicat dans 3 mL de milieu CSM -Leu, -Trp, puis incubés sous agitation à 30°C pendant au moins 18 heures. La culture est ensuite diluée au dixième dans une plaque de 96 puits, où une mesure de la D.O à 600nm a été effectuée à l'aide d'un lecteur multi-mode (SYNERGY|HTX). Un volume de 50  $\mu$ L de cette dilution a été mélangé à 50  $\mu$ L de réactif  $\beta$ -glo (contenant de la 6-O- $\beta$ -galactopyranosyl-luciférine ; de la luciférase et du magnésium) dans une plaque blanche de 96 puits. Celle-ci a été incubée à l'obscurité pendant 1 heure. La lumière émise a ensuite été mesurée à l'aide du luminomètre Centro XS LB 960 (Berthold Technologies). Le principe du double hybride est illustré dans la figure M3.



**Figure M3 : Principe du test à double hybride.**

Les protéines d'intérêt sont fusionnées soit au domaine de liaison à l'ADN (DLA) du facteur de transcription Gal4, soit à son domaine d'activation (DA). En cas d'interaction entre les deux protéines, la transcription du gène rapporteur lacZ, codant pour la  $\beta$ -galactosidase, est activée. Cette enzyme clive un substrat spécifique fourni dans le kit  $\beta$ -glo (Promega), permettant ainsi à la luciférase de produire de la lumière, détectée à l'aide d'un luminomètre

#### **4.4. Test phénotypique de l'activité du module Caf130 du complexe CCR4-NOT**

La fonction du module Caf130 du complexe CCR4-NOT a été testée en se basant sur la suppression lorsqu'il est inactivé de la croissance lente résultant de l'absence d'*Acl4* (Pillet et al. 2022). Pour ce faire, plusieurs souches ont été générées en croisant la souche  $\Delta acl4$  avec des souches contenant des mutations des différents membres du module de Caf130. Alternativement, des mutations ont été construites dans une souche diploïde hétérozygote  $\Delta acl4/+$ . Les souches à tester ont été mises à sporuler puis disséquer selon la méthode décrite dans la section 4.2.3. La taille des colonies a ensuite été suivie durant 5 jours, avec des prises d'images quotidiennes à partir du troisième jour d'incubation. La ségrégation de  $\Delta acl4$  et des délétions des différents gènes codant les partenaires de Caf130 a été analysée en vérifiant les marqueurs de sélections spécifiques à chaque mutant. Dans le cas de *Not1-ΔN*, qui ne contient pas de marqueur de sélection, la ségrégation de cet allèle a été vérifiée par PCR avec les oligonucléotides OBS9672 et OBS9673 (présenté dans l'Annexe 7) situés en amont et aval de la région de *Not1* délétée.

### **5. Méthode biochimique pour l'analyse de protéines**

#### **5.1. Purifications de protéines chez la bactérie**

##### **5.1.1. Expression des protéines et extraction (en lot (« batch »))**

Des cellules compétentes d'*Escherichia coli* BL21 CodonsPlus-RIL ont été transformées avec le plasmide désiré, conformément au protocole de transformation décrits dans le paragraphe 3.6. Les plasmides utilisés pour l'expression des protéines recombinantes sont listés dans le tableau en Annexe 6. Trois colonies transformées ont été inoculés dans 100 mL de milieu d'auto-induction Terrific Broth, supplémenté par 50 µg/mL de kanamycine. Les cultures ont été incubées à 37°C à 170 rpm pendant 6 heures, puis à 25°C pendant 14 heures. Le lendemain, les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 5 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Eppendorf 5804 R. Les cellules ont été réparties en quatre culots de 25 mL. Ces culots ont été conservés à -80°C ou utilisés directement pour la purification.

### **5.1.2. Purification de protéines étiquetées 6xHis en lot**

Ce protocole a été utilisé uniquement pour les purifications à partir de petits volumes et pour les protéines étiquetées 6xHis. Un culot correspondant à 25 mL de culture a été resuspendu dans 1 mL de tampon BB+ (10mM imidazole, 300mM NaCl, 0,1% NP40, PBS 1X) supplémenté avec 1X PIC (Cocktail d'inhibiteurs de protéases) (Roche) et 0.1mM PMSF. Les culots ont été transférés dans un tube Falcon de 5 mL. Les cellules ont ensuite été lysées par ultrasonication (Vibra cell BioBlock Scientific, sonde CV26) pendant 60 sec (cycle pulse ON 2 sec, cycle pulse OFF 2 sec, amplitude 30%), en maintenant les échantillons dans la glace. Toutes les étapes suivantes ont été réalisées en chambre froide.

Les lysats cellulaires ont été transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL et centrifugés à 14 000 rpm pendant 15 minutes dans une centrifugeuse Eppendorf 5417 C. Le surnageant a été récupéré et un aliquot surnommé «SN» (surnageant) a été conservé puis congelé à -80°C. Ce surnageant a ensuite été ajouté à 40 µL de billes Ni-NTA (Qiagen), préalablement lavées deux fois avec 1 mL de tampon BB (10mM imidazole, 300mM NaCl, 0,1% NP40, PBS 1X), puis laissé sur une roue tournante à 4°C pendant 1h. Les billes ont été centrifugées à 500 x g durant 2 minutes, et un aliquot « FT » (flow through) a été prélevé. Après élimination du surnageant restant, les billes ont été lavées trois fois avec 1 mL de tampon BB+, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation à 500 x g pendant 2 minutes. Les protéines liées aux billes ont été éluées en ajoutant 80 µL de tampon EB+ (200mM imidazole, 300mM NaCl, 0,1% NP40, PSB 1X), supplémenté avec 4µL PIC 25X/mL, 0.1mM PMSF, et incubé durant 5 minutes sur une roue tournante. Après centrifugation à 500 x g pendant 2 minutes, un aliquot "E" (élution) a été récupéré. Tous les échantillons ont été rapidement congelés, puis stockés à -80°C.

### **5.1.3. Purification de protéines étiquetées STREP en lot**

La purification des protéines étiquetées STREP a été réalisée de manière similaire celle étiquetées 6xHis (section 5.1.2), avec quelques différences : 40 µL de billes STREP Tactin XT 4Flow (IBA) ont été utilisées, et les tampons différaient de ceux utilisés pour la purification 6xHis. Le tampon W (IBA) (100 mM Tris Cl pH8, 150 mM NaCl, 1mM EDTA pH8) a été utilisé pour la resuspension du culot et les lavages, et le tampon BXT (IBA) (100 mM Tris Cl pH8, 150

Mm NaCl, 1mM EDTA pH8, 50 mM biotine) a été utilisé pour l'élution, avec un volume de 120  $\mu$ L. Tous les échantillons ont été rapidement congelés puis stockés à -80°C.

#### **5.1.4. Double purification (STREP/6xHis) en lot**

Les doubles purifications en lot ont été réalisées de deux manières : soit avec les billes Ni-NTA en première étape, puis avec les billes STREP en seconde étape, soit dans l'ordre inverse. Dans le premier cas (Ni-NTA puis STREP), les premières étapes sont strictement similaires à celle de la section précédente, sauf qu'après l'élution, un aliquot « E1 » (élution 1) a été prélevé, et le reste de l'élution a été transféré dans un tube Eppendorf contenant 400  $\mu$ L de tampon W et 40  $\mu$ L de billes STREP Tactin XT 4Flow préalablement lavées. Les étapes suivantes correspondent à celles d'une purification en une seule étape, et après la deuxième élution, un aliquot « E2 » (élution 2) a été récupéré. Dans le second cas (STREP puis Ni-NTA), la resuspension du culot a été effectuée dans 1 mL de tampon W. Après la première élution avec le tampon BXT, un aliquot « E1 » a été prélevé, et le reste du surnageant a été déposé dans un nouveau tube Eppendorf contenant cette fois-ci 400  $\mu$ L de tampon BB+ et 40  $\mu$ L de billes Ni-NTA. Les étapes restantes sont identiques à celles décrites précédemment pour la seconde purification.

#### **5.1.5. Induction de protéines et extraction à grande échelle**

La transformation bactérienne a été réalisée de façon similaire à celle décrite dans la section 3.6. A partir des boîtes, 30 colonies transformées ont été inoculées dans 1L de milieu d'auto-induction Terrific Broth, supplémenté de 50  $\mu$ g/mL de kanamycine. Les cultures ont été incubées à 37°C et à 170 rpm durant 6 heures, puis à 25°C pendant 14 heures. Le lendemain, les bactéries ont été centrifugées à 6 000 rpm pendant 20 minutes à 4°C dans le rotor JS-7.5 (Beckman). Les culots bactériens ont été lavés avec 20 mL d'eau froide, puis centrifugés à nouveaux. Les culots lavés ont été ensuite stockés à -80°C.

#### **5.1.6. Purification de protéines étiquetées 6xHis sur colonne**

Ce protocole a été utilisé avec des cultures de grand volume afin d'effectuer des purifications sur un système AKTA Basic. La colonne utilisée pour les protéines étiquetées 6xHis est une colonne Hi-TRAP FF Crude de 1 mL (Amersham). Pour l'extraction des protéines, un culot bactérien correspondant à 1L de culture a été décongelé sur glace puis resuspendu dans 40 mL de tampon de lyse L (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.1% NP40), supplémenté avec 0.1mM PMSF, 1mM DTT et 1 pastille cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC), puis homogénéisé à l'Ultra-Turrax (IKTA T25). Les cellules ont ensuite été lysées par sonication (Sartorius Labsonic P) avec 4 cycles de 30 sec ON et 30 sec OFF à 60% d'amplitude, avec un cycle de 0.5. Le lysat cellulaire a été ultracentrifugé dans un rotor Ti 50.2 (Beckman) à 30 000 rpm pendant 45 minutes à 4°C. Les étapes suivantes ont été effectuées en chambre froide. Le surnageant a été récupéré puis chargé dans une superloop (Cytiva) de 50 mL ; un aliquot « SN » (surnageant) a été prélevé. Le programme de purification utilisé était le suivant : chargement de l'extrait soluble à un débit de 1 mL/min, lavage de la colonne avec 10 volumes colonne (10 CV) de tampon A (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.1 mM PMSF), suivi d'un lavage avec 7% de tampon B (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 300 mM NaCl, 300 mM imidazole, 0.1 mM PMSF)/93% de tampon A de 5CV. Ensuite, un gradient de 7% à 100% de tampon B a été appliqué sur 20 CV. Des fractions de 1 mL ont été collectées, avec détection à 254 nm et 280 nm. Des aliquots des différentes étapes (extrait soluble (SE), du flow-through (FT), de l'étape à 7% (7%)) ont été prélevés, rapidement congelés, puis stockés à -80°C.

Après l'analyse des fractions par SDS-PAGE pour vérifier la présence des protéines d'intérêt, les fractions du pic d'élution ont été regroupées et leur concentration déterminée par la méthode de Bradford (Bio-Rad Protein Assay Die Reagent Concentrate) ou au NanoDrop. Les protéines purifiées ont ensuite été concentrées à l'aide d'un Amicon 0.5 mL – 30kDa (Merck), selon les instructions du fabricant.

#### **5.1.7. Purification de protéines étiquetées STREP sur colonne**

Comme pour la purification des protéines 6xHis, ce protocole a été utilisé avec des cultures de grand volume avec un système AKTA Avant ou Basic. Les colonnes employées pour les

protéines étiquetées STREP étaient la colonne de 1 mL Strep-Tactin™ Superflow™ high capacity (IBA) et la colonne de 1 mL Strep-Tactin XT 4Flow high capacity (IBA). La lyse et l'extraction des protéines ont été réalisées comme dans la section précédente, à l'exception de la resuspension du culot dans 40 mL de tampon L (0.1 M Tris pH 8, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA, 1 PIC, 3 µl BaseMuncher 25 000 U). Les étapes suivantes ont été réalisées en chambre froide. Le programme de purification comprenait le chargement de l'extrait soluble à 0.5 mL/min, suivi d'un lavage de colonne avec 15 CV de tampon W (0.1 M Tris pH 8, 0.15M NaCl, 1 mM EDTA) à 1 mL/min, puis d'une élution à 12 CV de tampon BXT (0.1 M Tris pH 8, 0.15M NaCl, 2.5 mM Desthiobiotine). Des fractions de 0.5 mL ont été collectées, avec détection à 254 nm et 280 nm. Des aliquots des différents échantillons (extrait total (TE), extrait soluble (SE), flow-through (FT) et des fractions correspondantes au pic d'élution) ont été récupérés, congelés rapidement, puis stockés à -80°C. Après l'analyse des fractions par SDS-PAGE, le reste des fractions correspondant au pic a été rassemblé dans un tube et dosé par la méthode Bradford afin de déterminer la concentration en protéines de l'échantillon. Les protéines purifiées ont été ensuite transférées dans un tube Amicon 0.5 mL – 30kDa (Merck) afin de concentrer l'échantillon, selon les recommandations du fabricant.

#### **5.1.8. Chromatographie par gel filtration**

Ce protocole a été utilisé afin d'augmenter la pureté des échantillons en séparant les protéines en fonction de leur taille, après une première étape de purification sur colonne (ou une double purification). Les colonnes utilisées étaient la Superdex 200 16/300 (Cytiva) et la Superdex 200 16/600 (Cytiva). La colonne a été préalablement équilibrée avec un tampon GF (20 mM Tris pH8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA). Les fractions correspondantes au pic d'élution ont été collectées et analysées par SDS-PAGE, puis regroupées et concentrées.

### **5.2. Analyse structurale**

#### **5.2.1. DLS**

Afin d'évaluer la pureté du complexe purifié, les échantillons ont été analysés par diffusion dynamique de la lumière (DLS), une technique fournissant de nombreuses informations telles

que la taille, la stabilité, l'oligomérisation et la présence éventuelle d'agrégats. Pour cela, 50  $\mu\text{L}$  de l'échantillon sont transférés dans une cuve, puis celle-ci est placée dans l'appareil DynaPro NanoStar (Wyatt), où les mesures sont effectuées à 20°C.

### **5.2.2. Essais de pré-cristallisation**

Pour déterminer la concentration idéale de notre protéine avant de faire les criblages de cristallographie, un essai de pré-cristallisation a été réalisé. Quatre tampons différents ont été utilisés : A : 2M sulfate d'ammonium, 0,1M Tris pH 8.5 ; B : 30% PEG4000, 0,1M Tris pH 8.5, 0,2M chlorure de magnésium ; C : 1M sulfate d'ammonium, 0,1M Tris pH 8.5 ; D : 15% PEG4000, 0,1M Tris pH 8.5, 0,2M chlorure de magnésium. Dans une boîte VDX, 500  $\mu\text{L}$  de chaque tampon a été déposés. Sur une lamelle, 1  $\mu\text{L}$  de notre protéine et 1  $\mu\text{L}$  de chaque tampon ont été ajoutés, puis la lamelle a été placée sur la boîte VDX. Les différents précipités ont été observés immédiatement au microscope LEICA IC80 HD, puis une à deux heures plus tard, afin d'identifier si la concentration protéique testée était optimale en fonction du type de précipité obtenu.

### **5.2.3. Criblage de cristallisation**

Pour nos essais, nous avons utilisé plusieurs criblages contenant différents sels, tampons et précipitants : Top96 (Molecular Dimensions), Berkeley (préparé par la plateforme de biologie intégrative de l'IGBMC selon (Pereira et al. 2017)), Crystal screen (Hampton Research), JCSG+(Molecular Dimensions), Wizard I&II (Rigaku). Pour chaque criblage, une plaque de cristallographie à 96 puits a été utilisée, dans laquelle 50  $\mu\text{L}$  des tampons correspondants ont été déposés à l'aide de l'appareil Liquidator 96 (METTLER TOLEDO). Ensuite, 100 nL de protéines ont été ajoutés dans les puits de cristallisation à l'aide de l'appareil Mosquito. Les plaques ont ensuite été étiquetées puis placées dans l'appareil RockImager 1000 (Formulatrix), où des photos ont été prises quotidiennement, puis à des intervalles plus espacés pendant 2 à 3 mois, afin de suivre l'évolution des précipités et de la formation potentielle de cristaux.

### **5.3. Analyses des protéines chez la levure**

#### **5.3.1. Purification par la méthode TAP**

La purification par affinité en tandem (TAP) repose sur deux étapes de purification successives : la liaison de la protéine A aux billes d'IgG, suivie par la liaison aux billes de calmoduline en présence de calcium. Entre ces étapes, la protéine est éluée avec la protéase TEV. Le complexe est récupéré après la dernière étape par une élution à l'EGTA (Puig et al. 2001) .

Les souches contenant les protéines d'intérêt marquées TAP ont été cultivées dans 2L de milieu YPDA. Lorsque la culture a atteint une D.O à 600 nm conséquente (environ 2), les cellules ont été recollectées par centrifugation à 5 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C dans le rotor JLA 8.1 (Beckman). Le culot est resuspendu dans 20 mL d'eau froide, puis centrifugés de nouveau à 5 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C dans le même rotor. Le culot a été remis en suspension dans un volume de tampon A équivalent à leur poids (10 mM K-HEPES pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 mM Benzamidine, 1 mM Leupeptine, 2 mM Pepstatin A, 4 mM Chymostatin, 2,6 mM Aprotinin), puis les cellules ont été lysées à 4°C à l'aide d'un casseur de cellules Constant System. Du KCl 2 M a ensuite été ajouté jusqu'à obtenir une concentration finale de 0,2 M KCl dans le lysat. Ce dernier a été ultracentrifugé à 20 500 rpm pendant 30 minutes à 4°C dans un rotor 50.2 Ti (Beckman) pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant a été transféré dans un tube de dialyse et dialysé pendant 3 heures à 4°C dans le tampon D (20 mM K-HEPES pH 7.9, 50 mM KCl, 0.2 mM EDTA pH 8.0, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 2 mM Benzamidine, 20% Glycerol). L'extrait dialysé a été récupéré et conservé à -80°C (ou utilisé directement).

L'extrait a été ajusté pour 10 mL d'extrait avec 50 µL de Tris-CL 2M pH8 (10 mM), 200 µL de NaCl 5M (150mM) et 100 µL de NP40 10% (0,1%). L'échantillon a ensuite été chargé dans une Econocolonne (Bio-Rad) contenant 200 µL de billes d'agarose IgG (Sigma), préalablement lavées avec 5 mL de tampon IPP150 (10 mM Tris-Cl pH8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP40). La liaison a eu lieu pendant 2 heures à 4°C, sur une roue tournante. Après trois lavages successifs avec 10 mL de tampon, un dernier lavage avec 10 mL de tampon de clivage TEV (10 mM Tris-Cl pH8.0, 150 mM NaCl, 0.1% NP40, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT) a été réalisé. L'échantillon a ensuite été incubé avec 1 mL de tampon de clivage TEV et 100 unités d'enzyme TEV (GIBCO

BRL) pendant 2 heures à 16°C sur une roue tournante. Pendant ce temps, une colonne contenant 200 µl de billes de Calmoduline (STRATAGENE) a été lavée avec 5 mL de tampon de liaison à la Calmoduline IPP150 (10 mM β-mercaptoethanol, 10 mM Tris-Cl pH8.0, 150mM NaCl, 1 mM Mg-acetate, 1 mM imidazole, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40). Les protéines libérées par le clivage TEV ont été éluées par gravité dans la colonne contenant les billes de calmoduline, en ajoutant 1 mL de tampon de liaison à la calmoduline IPP150 et 1 µL de CaCl<sub>2</sub> 1M pour saturer l'EDTA résiduel. L'échantillon a été incubé sur une roue tournante, pendant 1 heure à 4°C. Après trois lavages successifs avec 10 mL de tampon de liaison à la Calmoduline IPP150, l'élution du complexe a été réalisée en 5 fractions de 200 µl avec du tampon d'élution de la Calmoduline (10 mM β-mercaptoéthanol, 10 mM Tris-Cl pH8.0, 150 mM NaCl, 1 mM Mg-acétate, 1 mM imidazole, 2 mM EGTA, 0.1% NP40). Une sixième fraction a été réalisée avec 200 µl de SDS 1% pour élution finale. Les protéines récupérées ont été stockées à -80°C.

Pour les analyser, les échantillons ont ensuite été lyophilisés à l'aide d'un Speed Vac afin de réduire le volume de la fraction et les concentrer. Les échantillons lyophilisés ont ensuite été soit resuspendus dans 3 µL tampon de charge (3X) et 6 µL d'eau ultrapure et étaient analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie ou soit directement resuspendu dans 100 µL d'eau ultrapure, avant une analyse par spectrométrie de masse.

### **5.3.2. Analyse de polysomes**

Les souches d'intérêts ont été mises en culture dans 100 mL de milieu YPDA jusqu'à ce que la DO mesurée à 600 nm soit d'environ 0.8. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la cycloheximide à une concentration finale de 100 µg/mL, puis collectées directement par centrifugation à 6 000 rpm pendant 15 minutes à 4°C dans le rotor JLA-16.250 (Beckman). Les cellules ont été lavées avec 10 mL de PLB (10 mM Tris-Cl pH7,5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM DTT, 100 µg/ml cycloheximide) puis centrifugées dans les mêmes conditions. Cette étape de lavage a été réalisée une seconde fois. Le culot a ensuite été resuspendu dans 500 µL de PLB et transféré dans un tube Corex contenant environ 500 µL de billes de verre. Les cellules ont été lysées par 5 cycles de vortex d'une minute, avec une minute de pause sur glace entre chaque cycle. Les billes de verre ont été centrifugées à 4343 g pendant 6 minutes à 4°C dans le rotor JS-7.5 (Beckman), et le surnageant a été centrifugé à deux répétitions à 14 000 rpm durant 10 minutes à 4°C dans une centrifugeuse Eppendorf 5417 C. La DO à 260 nm a été

mesurée et un volume correspondant à environ 15 DO à 260 nm (correspondant à 150-200 µL d'extrait) a été chargé sur un gradient de sucrose 10-45% dans du PLB1x (préparé avec l'appareil Gradient Master Base Unit (Biocomp) selon les recommandations du fabricant). Les gradients ont ensuite été centrifugés pendant 2 heures à 40.000 rpm à 4°C dans un rotor SW41 (Beckman). Les gradients ont ensuite été analysés avec une lecture d'absorbance à 254 nm, et les fractions ont été collectées à l'aide d'un collecteur de fractions, puis stockées à -80°C. L'analyse des fractions a été effectuée par Western-Blot pour détecter les protéines d'intérêt ou après extraction des ARN de chaque fraction au Phénol-Chloroforme suivi d'une précipitation à l'éthanol et d'un fractionnement sur gel pour détecter les ARN ribosomiques.

### **5.3.3. Validation de la spécificité d'interaction de la protéine d'intérêt aux ribosomes et polysomes**

Pour s'assurer de la spécificité de l'interaction d'un facteur avec les ribosomes et/ou polysomes, ceux-ci ont été dissociés avant le fractionnement sur des gradients de sucrose. Brièvement, l'un, l'autre ou les deux traitements suivants ont été appliqués avant le chargement des extraits sur les gradients. Le premier traitement consistait en l'ajout de 40 mM d'EDTA, suivi d'une incubation de 30 minutes à 400 rpm à température ambiante. Le second traitement impliquait l'ajout de 300U de RNase I, avec une incubation aux mêmes conditions de durée et de température. Comme contrôles l'extrait conservé au froid et l'extrait incubé dans les mêmes conditions ont été utilisés. Après les traitements, les extraits ont été chargés sur des gradients de sucrose, puis analysés comme décrit précédemment.

## **5.4. Analyse des protéines**

### **5.4.1. SDS-PAGE et analyse par coloration au bleu de Coomassie**

Les protéines ont été re-suspendues avec du tampon de chargement de protéines 3X (Bleu de bromophénol 0.006%, 2-mercaptoethanol 15%, glycerol 30%, SDS 6%, Tris-HCl 0.187 M) et chauffées à 95°C pendant 3 minutes. Une centrifugation brève a éliminé les éléments insolubles. Le pourcentage de polyacrylamide pour la phase de séparation variait entre 8% et 15% (selon la taille des protéines) dans un tampon de séparation (1,5M Tris-HCl, pH 8.8). Le

gel de concentration contient 6% de polyacrylamide dans du tampon de concentration (0.5 M Tris-HCl pH 6.8). La migration s'est effectuée avec du tampon Tris-Glycine (50 mM Tris, 500 mM glycine, 0.1% SDS) et en deux étapes : à 100V pour la migration du bleu de bromophénol dans la phase de concentration puis à 150V pour la phase de résolution. Selon les besoins, les gels étaient soit colorés au Coomassie pour l'analyse des purifications, soit transférés sur membrane pour un Western-blot (section 5.4.2). Pour visualiser les protéines, une coloration au bleu de Coomassie brillant R-250 (Sigma Aldrich) (0,1% dans une solution de 40% éthanol et 10% d'acide acétique) a été utilisée. Le gel a été coloré pendant 10 secondes au micro-ondes (500W) puis sous agitation pendant 30 minutes, avant d'être décoloré pendant une à deux heures dans une solution de 40% éthanol et 10% acide acétique. Lorsque la détection des protéines au bleu de coomassie était difficile, une coloration à l'argent a pu être réalisée à l'aide du kit SilverQuest (Invitrogen), selon les recommandations du fabricant.

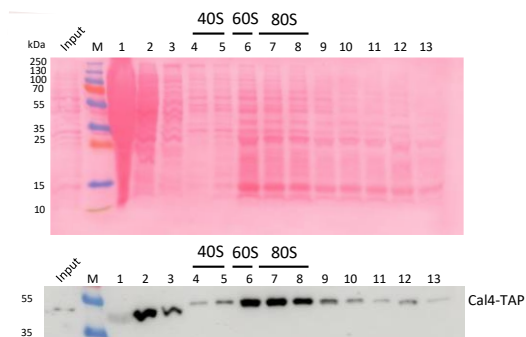
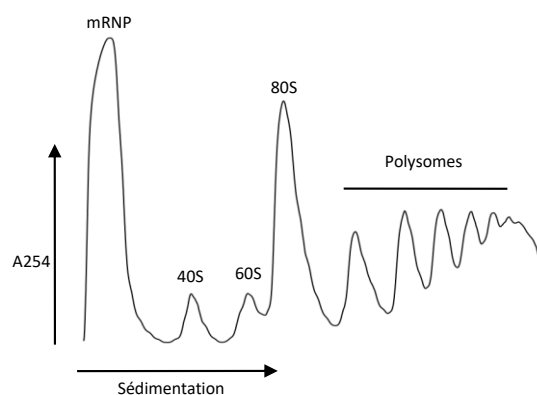
#### **5.4.2. Western-blot**

Les protéines ont été transférées du gel SDS-PAGE sur une membrane de nitrocellulose Protran (Cytiva) à l'aide d'une cuve de transfert contenant un tampon de transfert (25 mM Tris-Base, 190 mM glycine et 20% éthanol). Le transfert a été réalisé à 80V pendant 2h à 2h30 en chambre froide avec agitation. La membrane a ensuite été rincée avec du PBS (Phosphate Buffered Saline), puis colorée au rouge Ponceau afin de vérifier l'efficacité et l'homogénéité du transfert. Après avoir lavé la membrane à nouveau avec du PBS pour éliminer le rouge ponceau, elle a été incubée pendant 1 heure à température ambiante (ou sur la nuit à 4°C) dans 20 mL d'une solution qui contient 5% de lait dilué dans du PBS et 0.3% de Tween. La membrane a ensuite été lavée deux fois avec du PBS-Tween (PBS-0.3% Tween) avant d'être incubée pendant une heure avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine ou l'étiquette d'intérêt (tableau des anticorps en Annexe 8) ou le complexe peroxydase-antiperoxydase pour l'étiquette TAP (Sigma P1291-1mL) dilué dans 5% de lait PBS-0.3% Tween. Après 4 lavages supplémentaires avec du PBS-Tween, la membrane a été incubée (si nécessaire) pendant une heure avec un anticorps secondaire reconnaissant l'anticorps primaire et couplé à la peroxydase, suivi de nouveaux lavages. Un réactif de chemiluminescence Immobilon® Crescendo Western HRP Substrate (Millipore) a été appliqué sur la membrane pendant 5 minutes, puis le signal a été visualisé à l'aide de l'appareil ImageQuant 800 (Cytiva).

#### **5.4.3. Spectrométrie de masse**

Pour l'analyse par spectrométrie de masse, les échantillons ont été fournis soit sous forme liquide, soit sous forme solide (bandes de gels). Les échantillons liquides sont d'abord concentrés par lyophilisation, puis resuspendus dans un volume approprié. Quant aux bandes de gels colorées au bleu de Coomassie, elles ont été découpées puis analysées par spectrométrie de masse. Toutes les analyses ont été réalisées par LC-MS/MS par la plateforme Protéomique de l'IGBMC.

# Annexe



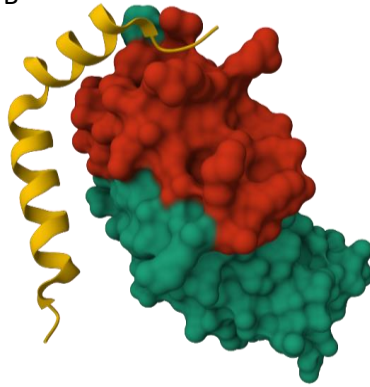
## Annexe 1 : Interaction de Cal4-TAP avec les ribosomes et les polysomes.

L'association de Cal4 aux polysomes a été analysée par sédimentation sur un gradient de sucrose à partir d'un lysat de levure exprimant Cal4-TAP. Le profil d'absorbance à 254 nm a été enregistré le long du gradient, et des aliquotes de chaque fraction ont été récupérées grâce à un collecteur de fractions couplé à un analyseur de gradients. Un contrôle de charge par coloration au rouge ponceau a été réalisé, et la présence de Cal4-TAP a été détectée par western blot en utilisant le réactif PAP.

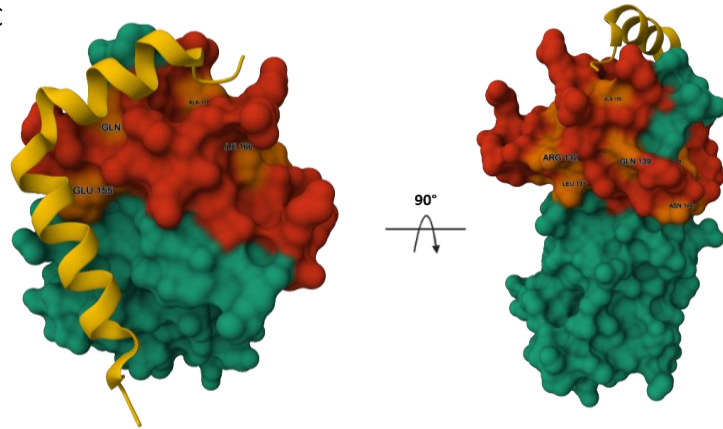
A

Homo_sapiens	STCEQIKDKYMQNRLVRLVCFVLOSIRNKIINVQ---DLFIEVQAFCEFSRIREAAGLFRLKLTLDGGETPSET
Drosophila_melanogaster	STCETVKDKYMQSRLVRLVCFVLOSIRNKIINVNR---ELFIEIEAFCVFQSKIKEATLYRLIKHLEKGSALSS
Saccharomyces_cerevisiae	ENEDGEKISLYSLGLVRLICVMVQTLIAKDFFTKS-ECTFELOTLLMTWIGILPEAKDLFFKIKTRLAMEEEDS
Zygosaccharomyces_parabailii	N-IDNGNVSLEYAVGLMKLICLMVRAFIKKGKDFPRES-ECVFELOTLLMNWITIIPEAKDLFFELKSMIAVHSDN
Kazachstania_africana	SSNSENVSLEYAIGLVKLICFMVKTLMNNDKDFSKS-ECTFELOTLLMNWIGIIEAQELFFTLKANVGEPSMEG
Eremothecium_gossypii	IADERLTASSHVLGLMKLICFMVMDLIEKKKLDFTDS-EYLFELOTLLMNWIGLVPEARTLFFFLKSTLLNSSALN
Candida_glabrata	ADEEDNEYISSYAVGIVTLICNMVKTLVRAGQMDVSKS-EYTVFELOTLLNWNISLIPEAKELFFFLKQEAHFDIQD
Kluyveromyces_lactis	ELFSATSRKAEMSGKVKMVCFILEEVLNDKEFEFVPHEDYVVELKRFLMOWSTFSAEACSVYALLKSKALGKV--L
	1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....

B



C



## Annexe 2 : Conservation entre les régions C-terminales de CNOT11 humain et de Caf130 chez la levure.

(A) Alignement des séquences d'une partie du domaine C-terminal de CNOT11 (humain) avec Caf130 (*S. cerevisiae*) et d'autres espèces, réalisé à l'aide du logiciel CLUSTAL W. (B) Représentation de la « surface moléculaire » générée par « PDB 3D View » du complexe entre CNOT11 (en vert) et GGNBP2 (en jaune) (PDB : 8BFJ). Les résidus conservés dans l'alignement de séquences (A) sont indiqués en rouge. (C) Les résidus entièrement conservés entre les espèces sont en orange, et le numéro de l'acide aminé est affiché, avec une rotation approximative de 90° entre les deux structures.

Numéro des souches (BSY)	Description	Génotype	Mating type
1120	ΔCaf130	Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
1129	W303	ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
1130	W303	ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
2528	Y187/L40	ade2-101/ade2, his3 200/his3Δ200, leu2-3,-112/leu2-3,-112, lys2-801am::LYS2::(lexAop)4-HIS3/LYS2, MEL1/?, met-/MET, trp1-901/trp1-901, gal4Δ/gal4-542, gal80Δ/gal80-538, ura3-52::URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ/URA3::(lexAop)8-lacZ	Mat a/ Mat alpha
3146	MAV203	leu2-3, 112, trp1-901, his3 Δ200, ade2-101, gal4 Δ, gal80 Δ, SPAL10::URA3, GAL1::lacZ, HIS3UAS GAL1::HIS3@LYS2, can1R, cyh2R	Mat a
3706	ΔYjr011c	YJR011CΔ::KanMX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3707	ΔBtt1	BTT1Δ::KanMX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3708	ΔEgd1	Egd1Δ::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3709	ΔEgd1	Egd1Δ::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
3710	ΔEgd2	Egd2Δ::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3711	TAP Caf130	Caf130::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3712	Yjr011c TAP	YJR011C::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3713	TAP Btt1/ΔCaf130	Btt1::TAP::t7::His3MX6; Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3723	ΔCaf130 alpha	Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
3745	ΔEgd1 ΔBtt1	BTT1Δ::KanMX6; Egd1Δ::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
3746	ΔBtt1	BTT1Δ::KanMX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
3747	ΔEgd1 ΔBtt1	BTT1Δ::KanMX6; Egd1Δ::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3748	ΔBtt1/ Caf130-TAP	BTT1Δ::KanMX6; Caf130::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
3783	CAF130 TAP ΔYjr011c	yjr011cΔ::KanMX6; Caf130::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3784	YJR011C TAP Δcaf130	caf130Δ::KanMX6; YJR011C::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3838	Caf130-TAP ΔYjr011c	YJR011CΔ::KanMX6; Caf130::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3839	Btt1-TAP	Btt1::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3840	Btt1-TAP ΔYJR011C	Btt1::TAP::t7::His3MX6; YJR011CΔ::KanMX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3841	Yjr011c-TAP ΔCaf130	Yjr011c::TAP::t7::His3MX6; Caf130Δ::KanMX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3842	Yjr011c-TAP ΔBtt1	Btt1Δ::KanMX6; Yjr011c::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3849	Caf130-TAP ΔBtt1	BTT1Δ::KanMX6; Caf130::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a/Mat alpha
3851	ΔNterm (1-162) Not1	ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
3873	Caf130-TAP ΔNot1 (1-162)	Caf130::TAP::t7::His3MX6; Not1Δ::1-162; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3874	YJR011C-TAP ΔNot1 (1-162)	Yjr011c::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
3881	Caf130-TAP ΔBtt1 ΔNot1 (1-162)	BTT1Δ::KanMX6; Caf130::TAP::t7::His3MX6; Not1Δ::1-162; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a/Mat alpha
3997	ΔRkm1	RKM1Δ::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a

Numéro des souches (BSY)	Description	Génotype	Mating type
4001	diploïde Yjr011c TAP ΔCaf130	YJR011C::TAP::t7::His3MX6; Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a/Mat alpha
4016	ΔRkm1 ΔCaf130	Rkm1Δ::TRP1; Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
4017	Δrkm1 Δcaf130 Yjr011c-TAP	YJR011C::TAP::t7::His3MX6; Rkm1Δ::TRP1; Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
4018	ΔRkm1 TAP Yjr011c	Rkm1Δ::TRP1; YJR011C::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
4019	Δrkm1	Rkm1Δ::TRP1; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
4020	Δrkm1 Δcaf130 Yjr011c-TAP	YJR011C::TAP::t7::His3MX6; Rkm1Δ::TRP1; Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
4021	Δrkm1	Rkm1Δ::TRP1; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
4022	ΔRkm1 ΔCaf130	Rkm1Δ::TRP1; Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat alpha
4023	ΔRkm1 TAP Yjr011c	Rkm1Δ::TRP1; YJR011C::TAP::t7::His3MX6; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a
4024	Δrkm1 Δcaf130 Yjr011c-TAP diploïde	YJR011C::TAP::t7::His3MX6; Rkm1Δ::TRP1; Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a/Mat alpha
4025	ΔACL4 Δcaf130 Yjr011c-TAP diploïde	YJR011C::TAP::t7::His3MX6; Acl4Δ::Hygro; Caf130Δ::KanMX4; ade2-1; his3-11,-15; leu2-3,-112; trp1-1; ura3-1	Mat a/Mat alpha
4029	diploïde W303	ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4041	Δacl4	Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4047	Δacl4	Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4053	Δacl4 Δcaf130 diploïde	Caf130Δ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4056	Δacl4 Δcaf130	Caf130Δ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat alpha
4057	Δacl4 Δcaf130	Caf130Δ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4061	Δacl4 Δyjr011c diploïde	yjr011cΔ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4062	Δbtt1 x Δacl4	btt1Δ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4063	Δegd2 Δacl4	egd2Δ::HisMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4064	TAP Caf130 Δacl4	Caf130::TAP::t7::His3MX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
40pBS66	Δacl4 x Δnot1(1-162)	Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4087	Δacl4 Δyjr011c	yjr011cΔ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4088	Δacl4 Δyjr011c	yjr011cΔ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat alpha
4089	Δacl4 Δbtt1	btt1Δ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4090	Δacl4 Δbtt1	btt1Δ::KanMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat alpha
4091	Δacl4 Δegd2	egd2Δ::HisMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4092	Δacl4 Δegd2	egd2Δ::HisMX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat alpha
4093	Δacl4 Δnot1(1-162)	Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4094	Δacl4 Δnot1(1-162)	Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat alpha
4095	Δacl4 Caf130 TAP	Caf130::TAP::t7::His3MX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4096	Δacl4 Caf130 TAP	Caf130::TAP::t7::His3MX6; Acl4Δ::Hygro; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat alpha
4116	Δacl4 Δegd1 diploïde	Acl4Δ::Hygro; Egd1Δ::His3MX6; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4117	Δacl4 Δegd1 Δbtt1 diploïde	Acl4Δ::Hygro; Egd1Δ::His3MX6; BTT1Δ::KanMX6; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4118	Δacl4 cal4-TAP diploïde	Acl4Δ::Hygro; YJR011C::TAP::t7::His3MX6; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a/Mat alpha
4123	Δacl4 Δegd1	Acl4Δ::Hygro; Egd1Δ::His3MX6; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4124	Δacl4 Δegd1	Acl4Δ::Hygro; Egd1Δ::His3MX6; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat alpha
4125	Δacl4 Δegd1 Δbtt1	Acl4Δ::Hygro; Egd1Δ::His3MX6; BTT1Δ::KanMX6; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat a
4126	Δacl4 Δegd1 Δbtt1	Acl4Δ::Hygro; Egd1Δ::His3MX6; BTT1Δ::KanMX6; ade2-1, his3-11, -15, leu2-3, -112, trp1-1, ura3-1	Mat alpha

### Annexe 3 : Tableau des souches utilisées durant la thèse.

Description	pDest22 DA (Ampicilline)	pDest32 DLA (Gentamycine)	pDONR221 (Kanamycine)
Vecteur vide	pBS2354	pBS2356	pDONR221
Not1	pBS2872	-	pBS2873
Not1 (1-162)	pBS5654	pBS5655	pBS6744
Not1 163-249	pBS5656	pBS5657	-
Not1 (1-1062)	pBS2917	-	-
Caf130	pBS5181	pBS5171	pBS6743
Caf130 (1-272)	pBS5315	pBS5325	pBS5304
Caf130 (1-580)	pBS5316	pBS5326	pBS5305
Caf130 (272-1122)	pBS5328	pBS5318	pBS5307
Caf130 (580-1122)	pBS5329	pBS5319	pBS5308
YJR011C	pBS5182	pBS5202	pBS5178
Egd1	pBS5185	pBS5174	pBS5152
Egd1 (1-122)	pBS6298	pBS6301	pBS6292
Btt1	pBS5180	pBS5172	pBS5150
Btt1 (1-109)/Egd1(109-157)	pBS5544	pBS5551	pBS5537
Egd1(1-109)/Btt1(109-149)	pBS5548	pBS5555	pBS5541
Btt1Δ109-122	pBS5614	pBS5619	pBS5600
Btt1Δ123-149	pBS5719	pBS5721	pBS5715
Btt1Δ136-149	pBS5720	pBS5722	pBS5714
Egd1(1-109)/Btt1(109-122)	pBS6297	pBS6300	pBS6291
Caf130 1-688	pBS6545	pBS6536	pBS6523
Caf130 689-1122	pBS6549	pBS6538	pBS6524
Caf130 726-1122	pBS6550	pBS6539	pBS6525
Caf130 623-1016	pBS6551	pBS6540	pBS6526
Caf130 689-1016	pBS6552	pBS6541	pBS6527
Caf130 726-1016	pBS6553	pBS6542	pBS6528
Caf130 1-622	pBS6544	pBS6535	pBS6529
Caf130 1-725	pBS6546	-	pBS6530
Caf130 1-1016	pBS6547	pBS6537	pBS6531
Caf130 623-1122	pBS6548	pBS6543	pBS6532
Caf130 N460A P461A	pBS6768	pBS6786	pBS6748
Caf130 (1-622) N460A P461A	pBS6773	pBS6780	pBS6749
Not1 (1-162) Q30A I31A	pBS6769	pBS6770	pBS6750
Caf130 R712G	pBS6774	pBS6805	pBS6762
Caf130 E836K	pBS6775	pBS6781	pBS6763
Caf130 (623-1016) R712G	pBS6776	pBS6782	pBS6764
Caf130 (623-1016) E836K	pBS6777	pBS6783	pBS6765
Cal4 G162V	pBS6778	pBS6784	pBS6766
Cal4 L208P	pBS6779	pBS6785	pBS6767

**Annexe 4: Tableau des plasmides utilisés pour le double hybride avec les protéines de levure.**

Description	Numéro de plasmides
Empty Vector pB27	pBS4411
Empty pP6	pBS4403
pB27-hCNOT11(61-510)	pBS4568
pP6 CNOT10	pBS4571
pP6 FAM193A	pBS5707
pP6 GGNBP2	pBS5710
pP6 GPBP1L1	pBS6240
pB27-hCNOT11(61-510) A476E F491D	pBS6275
pB27-hCNOT11(61-510) L427R S430R	pBS6615
pB27-hCNOT11(61-510) L427R S430R A476E-F491D	pBS6616
pB27-hCNOT11(61-510) L451R V454R	pBS6619
pB27-hCNOT11(61-510) L451R V454R A476E-F491D	pBS6620
pB27-hCNOT11(61-510) L451R V454R A476E-F491D + L427R S430R	pBS6629

**Annexe 5 : Tableau des plasmides utilisés pour le double hybride avec les protéines humaines.**

Numéro de plasmide	Description
pBS5561	Btt1- His Egd2 Caf130 (272-1122)
pBS6380	Btt1-His Egd2 Not1(1-162) Caf130
pBS6381	Btt1-His Egd2 Not1(1-162) YJR011C Caf130
pBS6382	Btt1-His Egd2 Not1(1-162) Caf130 (272-1122)
pBS6383	Btt1(His) Egd2 Not1(1-162) YJR011C Caf130(272-1122)
pBS6384	Btt1 Egd2 Not1(1-162) (His)Caf130
pBS6385	Btt1 Egd2 Not1(1-162) YJR011C (His)Caf130
pBS6386	Btt1 Egd2 Not1(1-162) Caf130-His
pBS6387	Btt1 Egd2 Not1(1-162) YJR011C Caf130-His
pBS6388	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) Caf130(272-1122)-His
pBS6389	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) YJR011C Caf130(272-1122)-His
pBS6401	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) Caf130
pBS6402	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) YJR011C Caf130
pBS6403	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) Caf130(272-1122)
pBS6404	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) YJR011C Caf130(272-1122)
pBS6405	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) His-Caf130
pBS6406	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) YJR011C His-Caf130
pBS6407	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) His-Caf130 (272-1122)
pBS6408	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) YJR011C His-Caf130 (272-1122)
pBS6409	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) Caf130-His
pBS6410	Btt1-STREP Egd2 Not1(1-162) YJR011C Caf130-His
pBS6580	Yjr011c-6xHis STREP-Caf130(623-1016)
pBS6581	Yjr011c-6xHis Caf130(623-1016)-STREP
pBS6582	Yjr011c-6xHis STREP-Caf130(623-1122)
pBS6583	Yjr011c-6xHis Caf130(623-1122)-STREP
pBS6602	Not1 1-162 Caf130 1-622 Strep Nterm
pBS6603	Not1 1-162 Caf130 1-622 Strep Cterm
pBS6604	Not1 1-162 (6xHis) Caf130 1-622 Strep Cterm
pBS6605	Not1 1-162 Caf130 1-688 Strep Nterm
pBS6606	Not1 1-162 Caf130 1-688 Strep Cterm
pBS6607	Not1 1-162 (6xHis) Caf130 1-688 Strep Cterm
pBS6608	Not1 1-162 Caf130 1-725 Strep Cterm
pBS6609	Not1 1-162 (6xHis) Caf130 1-725 Strep Cterm
pBS6635	Yjr011C Caf130 689-1016 Strep Cterm
pBS6636	Yjr011C-STREP Caf130 689-1016
pBS6637	Yjr011C-6xHis Caf130 689-1016 Strep Cterm
pBS6638	Not1 (1-162) Caf130 (272-622) Strep Cterm
pBS6639	Not1 (1-162) Caf130 (272-688) Strep Cterm
pBS6640	Not1 (1-162) 6xHis Caf130 (272-622) Strep Cterm
pBS6641	Not1 (1-162) 6xHis Caf130 (272-688) Strep Cterm
pBS6693	Not1(1-162) Btt1 Egd2 Caf130 (1-622)-STREP
pBS6694	Not1(1-162)x6his Btt1 Egd2 Caf130 (1-622)-STREP
pBS6695	Not1(1-162) Btt1 Egd2 Caf130 (1-688)-STREP
pBS6696	Not1(1-162)X6his Btt1 Egd2 Caf130 (1-688)-STREP
pBS6815	Not1(1-162)x6His (Q30A I31A) Btt1 Egd2 Caf130 (1-622) STREP
pBS6816	Cal4 6xhis STREP-Caf130 (623-1016) R712G
pBS6817	Cal4 6xhis G162V STREP-Caf130 (623-1016)
pBS6821	Not1 1-162 6xhis Btt1 Egd2 Caf130 623-1016 STREP N460A P461A
pBS6822	Cal4 6xhis L208P STREP-Caf130 623-1016
pBS6823	Cal4 6xhis STREP-Caf130 623-1016 E836K
pBS6869	Cal4-6xHis
pBS6870	Cal4 6xhis G162V
pBS6871	STREP-Caf130(623-1016)

**Annexe 6 : Tableau des plasmides utilisés pour l'expression de protéines recombinantes.**

Numéro d'oligonucléotide (OBS)	Séquence
9122	ATTGCCCTCAATGCAATCT
9123	CTGAAAAAGTCAAGCAATC
9127	GCCAGCTCTGAACTGAATC
9128	AGTCTGTTCTCTCGCTCTG
9129	ACCCATTGGAAGTTTCAGT
9130	GCTTGACCAATCCTGGAGTA
9142	ATACGGCTAAATTAATAAACTACTACATAATCCTACAACATCAACGGATCCCCGGGTTAATTAA
9143	TTGCGCCACTAGCTATAACGTTTACTGGCAATTATTATGAACATGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
9144	TTTAAGAATAGAACATCTCACACCAGACGCGACTCATAATTATACGGATCCCCGGGTTAATTAA
9145	AATATGTGTTTTTTATTAACTGTTAAATTAAGGATTAAGTTATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
9146	GAGCAACCTTTACAAGCAACCACACACCCACATACTCAATTGATACGGATCCCCGGGTTAATTAA
9147	GCGTTAGAATAACTACGTACCCCTATATAATATATTTTATATCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
9148	AAGAAAAAGGACAAATAAGGTAACGTGTATAGCATATAAAGGCTCGGATCCCCGGGTTAATTAA
9149	TAGAACCTTATTTTATACTCTGTATTATATTACATTACTTGCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
9150	TAATGACCAACGAGGAAGTT
9151	ACTGCGGTGGTGAGGGTAT
9152	GCACATGCATCTCTCTTT
9153	TTGCTTGACCAATCCTGGAG
9154	TTCGATGGGAATCAGGGTAA
9155	TTGCGCAAAAGTGGTGACG
9156	GGCGTAAGTTTTTCGGTCA
9157	TTGCTACAGATTGGCCAGTA
9234	CTTCGCTGACGTTTCTTTT
9236	GCCGTCACAGTATAGAGTC
9247	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAGCCAAACCTGTCAAATACT
9248	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGCTTAATGGGCTGTATCCGAG
9249	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCAAGCCAATTGAGACAAGGCTT
9250	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTTGAATAAGGATGATATCGA
9251	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGCAGATTTTCGTCAAGAC
9252	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTAAACCACCTCTTAGCCTTA
9259	CAAGCTAAATATTACGCGAAAG
9260	CGTTTATGCTCAAGAGGGG
9442	GCCGGATCCTTATTTAGACAAGGACATGA
9443	GGCGGATCCTAAGGAGGATATATATGCTATCGGCCACATACCG
9444	GCCGCGCGCTCACTTAATTGTCTTGAATCGT
9445	GCCACTAGTTCACCTAATTGTCTTGAATCGT
9446	GGCACTAGTTAAGGAGGATATATATGAGTGAAACACGAGAATC
9447	GCCGCGCGCTTAAACCGTCATTTACCAA
9448	TGGACGGAATCGCCGCTGCT
9622	TCGACGGTATCGATAAGCTTCGTGAGCTCTGATTTTACCG
9623	CCTTAAATAATTGTATGATTCTATGTAATCAATTGTCCTGAGT
9624	CACCTCAGGACAAATTGATTACATGAATCATACAAATATTATTAAGG
9625	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCAACGTCCTTGAAACGATGACG
9626	TCGACGGTATCGATAAGCTTCGAATTCCTTGAAGAAACAC
9627	TGGACCTTGAATAAACTTCCAATCTTAATTGTCTTGAATCGT
9628	TTGGAAGTTTATTTCAAGGTCGAATGAATCATACAAATATTATTAAGG
9629	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCGCTCATCCGAGTTGATTAT
9630	TCGACGGTATCGATAAGCTTCGTGCTACCCAGCAAAATGC
9631	TGGACCTTGAATAAACTTCCAATTTGTTGCTCCAGAGTGATTG
9632	TTGGAAGTTTATTTCAAGGTCACAAACAGAGCAACAAAGGCA
9633	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCTATTATGCGGTGTCAAGC
9634	TCGACGGTATCGATAAGCTTAAACACGACGACAGATGCTA
9635	TGGACCTTGAATAAACTTCCAATTTGCTGAGGCTGAGTTAAACCC
9636	TTGGAAGTTTATTTCAAGGTCACAAACAGCGCAAATGCCTACCC
9637	TCCACCGCGGTGGCGGCCGCAACCTCATCAGTCGGGTCA
9672	CGCAATATTCGTCAGGAGT
9673	ACCAACTCCGTGTGGGATCA
9674	ACCGAAGAAAAGCACAGACC
9675	GGTGAAAGTATTTCGGACAG
9676	ACCACCAAATCTCTCAAGCC
9677	GTGTGAATTGAACCTCGC
9678	CACCTGGTTACTCTCAAC
9679	GCAATCCACTTGAGGATT
9687	ATCAGTGTCAAGGCAGATGG
9688	GTGCGTCATCCGAGTTGATT
9691	CTTCCTCATCATCTTCAGCC
9692	CCCTCCCAACCAATTTGTCT
9693	GGATACGTTTGGCCGAATATCC
9694	GCTTGCAATTTGGTCTGCG
9695	GGTGCTTTGGGATCAATCAC
9696	GCAAACTAAAACGATCACAG
9872	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCATGCTATTTTTCTGTTGGGT
9873	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGTTAGGTGACGTAAACGAGT
9874	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAGATGAATGAATAAGATGGCG
9875	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTTCTTCCATGGCGAGCC
9876	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGTCTGGTAGTAATAATGTTTT
9877	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGCCACTTCCGTTAGATCAAG
9878	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGCATGAGCCTAAGTTAGATGT
9934	GCCGCGCGCTAAACCGTCATTTACCAAT
9935	GCCGCGCGCTAAAGGAGGATATATATGTGGTCTCATATTTGAGAAGAGCGGACGACCAACAGGTGTC
9936	GGCTCGAGTCACTCTCTCCATAGCCA
9937	GCCGCGCGCTAAGGAGGATATATATGAGCGGACGCAACAACGTGTTT
9938	GGCTCGAGTCACTTCTCAAAATGAGGARGAGACCACTCTCTCCATAGCCAGACG
9939	GGCTCGAGTCACTTCTCAAAATGAGGATGAGACCATTCGGAGTCGCAACGTCCAG
9952	CCCTCTAGATAAGGAGGATATATATCTATCTTCCACATACCG
9953	TTAGCGGCGCTCACTTAATTGTCTTGAATCG
9954	TTAGCGGCGCTCAGTGATGGTGATGGTGATGCTTAATTGTCTTGAATCGT
9955	TGAGCGGCGCTAAGGAGGATATATATGTGCTCATCTCAATTTGAGAAGACCAAGAAAAAGCGGCGAC
9956	GTGCTCGAGTCAAGCGATTCTTCGGTGC

Numéro d'oligonucléotide (OBS)	Séquence
9957	TGAGCGGCCGCTAAGGAGGATATATGACCAAGAAAAAGCGGC
9958	GTGCTCGAGTCACTTCTCAAATTGAGGATGAGACCAAGCGATTTCCTGGTCGGGT
9959	GTGCTCGAGTCAGTTCGGGCTGGTAACCA
9960	GTGCTCGAGTCACTTCTCAAATTGAGGATGAGACCAGTTCGGGCTGGTAACACGT
9961	GTGCTCGAGTCACTTCTCAAATTGAGGATGAGACCAGATGAAGCTGTAGCTCGGGC
10016	CCTCCTGAATTTATTCACCGTTATATAAGAAATTGCATCTCTAC
10017	GTAGAGATGCAATTTCTTATATAACGGTGAATAAATTCAGGAGG
10018	CAGAAATCGGTTGGTGGCTGTGTGTGTAGTTTCTCCAATCCTTG
10019	CAAGGATTGGAGAAACCTACACACACGACCAACCGATTCTG
10057	ACTTATACCTAAAAGCATCTTCAGGCTGAGGATAAAAAGGAATCGGATCCCCGGGTTAATTAA
10058	ATATATCAGTGTATGTACTTATGCATATGTTAAATTAGAAGACTAGAATTCGAGCTCGTTAAAC
10059	ATATATCAGTGTATGTACTTATGCATATGTTAAATTAGAAGACTAGAATTCGAGCTCGTTAAAC
10060	ATATCACCTACTCTCCGTTTTATATACACGGAAATAGCACCATACGGATCCCCGGGTTAATTAA
10061	TAATAATCTACTATGTGTAAATATATGATCCTCAAGTATTATACAGTGAATTCGAGCTCGTTAAAC
10062	TCGGAATAAGGAGCACAAAGGTTATAGATACAAGAGAAGACTATCCGGATCCCCGGGTTAATTAA
10063	GCAGATGTAATTACGTACTCTACTCTAACATTCTATAAGGAAAGGAATTCGAGCTCGTTAAAC
10064	TACGCACTAGATTGTGCGGG
10065	CGGAGTCTGAAGCAGATATG
10066	CGCTCAAAATGGAGTACCA
10067	GTAATAAGCAACTGACACG
10068	TGCGCTAAGAAATGATCTTGC
10069	GGGTAACCTAAGCTCTGCTC
10114	ACTTATACCTAAAAGCATCTTCAGGCTGAGGATAAAAAGGAATAGATCTGTTTAGCTTGCTCTGCC
10115	ATATATCAGTGTATGTACTTATGCATATGTTAAATTAGAAGACTAGAATTCGAGCTCGT
10116	ATATCACCTACTCTCCGTTTTATATACACGGAAATAGCACCATAAGATCTGTTAGCTTGCTCTGCC
10117	TAATAATCTACTATGTGTAAATATATGATCCTCAAGTATTATACAGTGAATTCGAGCTCGT
10118	TCGGAATAAGGAGCACAAAGGTTATAGATACAAGAGAAGACTATCAGATCTGTTAGCTTGCTCTGCC
10119	GCAGATGTAATTACGTACTCTACTCTAACATTCTATAAGGAAAGGATATCATCGATGAATTCGAGCTCG
10120	GGCTCTAGATAAGGAGGATATATAGAGTGAACACGAGAATCTAA
10121	GGCTCTAGATAAGGAGGATATATAGTGTCTCATCTCAATTGAGAAGAGTGAACACGAGAATCTAA
10122	GCCGCGGCCGCTAAGGAGGATATATAGCCCTGAGCGTGCCTAGCCGT
10123	GGCTCGAGTCACTTCTCCATAGCCAGCG
10124	TGAGCGGCCGCTAAGGAGGATATATAGATGCGCCGTACCATCAA
10312	TTAGGATCTCACTTAATTGCTTGAAATCG
10313	TTAGGATCTCAGTGATGGTGATGGTGATCTTAATTGCTTGAAATCGT
10314	GCGGATCTTAAGGAGGATATATAGCTGTAGATCAAGAAA
10315	TTACCGCGTCACTATTATCATCTTGT
10326	GAAAAAATACCTATACAACTAGCCGATTTTTTTTTCATTAAATC
10327	GATATTAATGAAAAATAAAATGCGGCTAGTTGTATAGGTATTTTTTC
10328	GCTCAATCGTCATTGACGTGCCAGTTTATTATTCACGAC
10329	GTCGTGAATAATAAATGCGAGCTGCAATGACGATTGAGC
10338	GGCTCGAGGATGCTCAAGAGACTATCC
10339	GCCGGATCCTATGTATTTCTACGTAGCGG
10340	GGCTCGAGATTTTGTGCATTACTGCC
10341	GCCGGATCCGATTCTGTGAGCATGGCC
10342	GGCTCGAGCCACGTAGGATGGATGTGT
10343	CAATATTCTCTATAACCGG
10344	TGGATGAAATGTTAATGTGC
10345	GCCGGATCCCCATGTTAACTACTAACT
10363	GTCCATTAGTTGTCTACGC
10364	GGTCCAGATAACGAATCTAC
10365	TCTTCTCTCAGCAATCGC
10366	GGTTTGATTAAGACTAGTAAC
10367	CAGTAACCTGTGGACGGGAC
10393	GATTGGAGGGACGTTCCCGGGATTTCATATGTAC
10394	GTACATATTGAAATCCCGGGAACGTCCTCCCAATC
10395	GCGTGAGATTAAATGGATAAGATGTTAATGTGACCGG
10396	CCGTTGCACATTAACTCTTATCCATTAACTCCACGC
10397	GCAAAATTGTTTATCAGTGTTCGTTAATCTCTAC
10398	GTAGAGATTAACGAACACTGATAAACAATTTTC
10399	GGAAGTTTCAGTTAGATCCGCTGAATTTGTAAC
10400	GTTTACAATTGAGCGGATCTAACTGAACTTCC
10401	GGCTCGAGGGTTACTGGCTGATTAGG
10402	GCCGGATCCCGGATTGAATACAAATTCGAATGG
10404	GCCGGATCCGGAGGTGGAAGCAGATATGA
10405	AACTTTGAAACACGATTAAAC
10406	ACTTTGAAACACGATTAACTTAT
10407	AAACCTTGAAGCATGACTAGAA
10408	ACCTTGAAGCATGACTAGAATTTA
10409	TGGATATCACTCAGCATAATTAATTTGGCGCTTAAGGTC
10410	AAATTGGCGCTTAAGGTC
10411	AAATTGGCGCTTAAGGTC
10452	TTTAAAGAATAGAATCTCACACGAGCGCACTATAATCATAAGATCTGTTAGCTTGCTCTGCC
10453	AATATGTGTTTTTTTATTTAAAGTTAAAGATTAAAGTTATGATATCATCGATGAATTCGAGCTCGT
10454	GAGCAACCTTTACAAGCAACACACACCCACATACTCAATTGATAAGATCTGTTAGCTTGCTCTGCC
10455	GCGTTAGAATAACTAGTACCCCTATATAATATATTTTATATCAGATATCATCGATGAATTCGAGCTCGT
10467	ACCACAAGTGTCTCAATCTCT
10473	GAGAAGATCCCGATCCAGCTGCGCGATTCTGTCAGCTGATCAG
10474	CTGATCAGGCTGAACAGGAATGCGGCGAGCTGGATCGGATCTTCTC
10475	GCTCAATCGTCTATTGACGTGCGAGTTTATTATTCACGAC
10476	GTCGTGAATAATAAATGCGAGCTGCAATGACGATTGAGC
10477	GACTGGCGTGATTTCCGGGGATTTCACATGTACTACAG
10478	CTGTAGTACATGTTGAAATCCCCGGGAACATCAGCCAGTC
10479	GCAAAATTGTTTATCAGTGTTCGTTAATCTCT
10480	AGAGATTAAACGAACACTGATAAACAATTTTC
10481	GGAAGTTTCAGTTAGATCCGCTGAATTTGTAAC
10482	GTTTACAATTGAGCGGATCTAACTGAACTTCC
10483	GCGTGGCGTCTGATGGATAAGATGCTGATGTGCAC
10484	GTGCACATCAGCATCTTATCCATCAGACGCCACGC
10508	TTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATATCACTCAGCATAATTAATTTGGCGCTTAAGGTC
10511	TGGATATCACTCAGCATAATTAATTTGGCGCTTAAGGTCCTTTTTTTTTTTTTTTTT

Annexe 7 : Tableau des oligonucléotides utilisés durant la thèse.

Nom	Contre	Référence	Concentration	Anticorps secondaire
PAP (Peroxidasen anti-peroxidase)	Protéine A de l'étiquette TAP	Sigma P1291	1:3000	-
GARPO (Goat anti-Rabbit PerOxidase) IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP conjugate	Rabbit IgG + IgM secondary antibody	Jackson 115-035-068	1:5000	-
AbBS6	Anti Rpl1a (Ssm1)	Lapin, polyclonal	1:10000	GARPO (Goat anti-Rabbit PerOxidase)

**Annexe 8 : Tableau des anticorps utilisés durant la thèse.**

## Références

- Abramson, Josh, Jonas Adler, Jack Dunger, Richard Evans, Tim Green, Alexander Pritzel, Olaf Ronneberger, et al. 2024. « Accurate Structure Prediction of Biomolecular Interactions with AlphaFold 3 ». *Nature* 630 (8016): 493-500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>.
- Aitken, Colin Echeverría, et Jon R. Lorsch. 2012. « A Mechanistic Overview of Translation Initiation in Eukaryotes ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (6): 568-76. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2303>.
- Albihlal, Waleed S., Wei Yee Chan, et Folkert J. van Werven. 2024. « Budding Yeast as an Ideal Model for Elucidating the Role of N6-Methyladenosine in Regulating Gene Expression ». *Yeast* 41 (4): 148-57. <https://doi.org/10.1002/yea.3925>.
- Altmann, M, P P Müller, J Pelletier, N Sonenberg, et H Trachsel. 1989. « A Mammalian Translation Initiation Factor Can Substitute for Its Yeast Homologue in Vivo ». *Journal of Biological Chemistry* 264 (21): 12145-47. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63833-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63833-5).
- Altmann, M., N. Schmitz, C. Berset, et H. Trachsel. 1997. « A Novel Inhibitor of Cap-Dependent Translation Initiation in Yeast: P20 Competes with eIF4G for Binding to eIF4E ». *The EMBO Journal* 16 (5): 1114-21. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.1114>.
- Amrani, Nadia, Robin Ganesan, Stephanie Kervestin, David A. Mangus, Shubhendu Ghosh, et Allan Jacobson. 2004. « A Faux 3'-UTR Promotes Aberrant Termination and Triggers Nonsense-Mediated mRNA Decay ». *Nature* 432 (7013): 112-18. <https://doi.org/10.1038/nature03060>.
- Auesukaree, C., A. Damnernsawad, M. Kruatrachue, P. Pokethitiyook, C. Boonchird, Y. Kaneko, et S. Harashima. 2009. « Genome-Wide Identification of Genes Involved in Tolerance to Various Environmental Stresses in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Journal of Applied Genetics* 50 (3): 301-10. <https://doi.org/10.1007/BF03195688>.
- Badis, Gwenaél, Cosmin Saveanu, Micheline Fromont-Racine, et Alain Jacquier. 2004. « Targeted mRNA Degradation by Deadenylation-Independent Decapping ». *Molecular Cell* 15 (1): 5-15. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.06.028>.
- Baer, B W, et R D Kornberg. 1983. « The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. » *Journal of Cell Biology* 96 (3): 717-21. <https://doi.org/10.1083/jcb.96.3.717>.
- Basquin, Jérôme, Vladimir V. Roudko, Michaela Rode, Claire Basquin, Bertrand Séraphin, et Elena Conti. 2012. « Architecture of the Nuclease Module of the Yeast Ccr4-Not Complex: The Not1-Caf1-Ccr4 Interaction ». *Molecular Cell* 48 (2): 207-18. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.014>.
- Boreikaitė, Vytutė, et Lori A. Passmore. 2023. « 3'-End Processing of Eukaryotic mRNA: Machinery, Regulation, and Impact on Gene Expression ». *Annual Review of Biochemistry* 92 (Volume 92, 2023): 199-225. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052521-012445>.
- Breker, Michal, Melissa Gymrek, et Maya Schuldiner. 2013. « A Novel Single-Cell Screening Platform Reveals Proteome Plasticity during Yeast Stress Responses ». *The Journal of Cell Biology* 200 (6): 839. <https://doi.org/10.1083/jcb.201301120>.
- Burd, Christopher G., Erika L. Matunis, et Gideon Dreyfuss. 1991. « The Multiple RNA-Binding Domains of the mRNA Poly(A)-Binding Protein Have Different RNA-Binding Activities ».

- Molecular and Cellular Biology* 11 (7): 3419-24.  
<https://doi.org/10.1128/mcb.11.7.3419-3424.1991>.
- Caponigro, G., et R. Parker. 1995. « Multiple Functions for the Poly(A)-Binding Protein in mRNA Decapping and Deadenylation in Yeast ». *Genes & Development* 9 (19): 2421-32.  
<https://doi.org/10.1101/gad.9.19.2421>.
- Castelli, Lydia M., David Talavera, Christopher J. Kershaw, Sarah S. Mohammad-Qureshi, Joseph L. Costello, William Rowe, Paul F. G. Sims, et al. 2015. « The 4E-BP Caf20p Mediates Both eIF4E-Dependent and Independent Repression of Translation ». *PLoS Genetics* 11 (5): e1005233. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005233>.
- Chamieh, Hala, Lionel Ballut, Fabien Bonneau, et Hervé Le Hir. 2008. « NMD Factors UPF2 and UPF3 Bridge UPF1 to the Exon Junction Complex and Stimulate Its RNA Helicase Activity ». *Nature Structural & Molecular Biology* 15 (1): 85-93.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb1330>.
- Charenton, Clément, Claudine Gaudon-Plesse, Régis Back, Nathalie Ulryck, Loreline Cosson, Bertrand Séraphin, et Marc Graille. 2020. « Pby1 is a direct partner of the Dcp2 decapping enzyme ». *Nucleic Acids Research* 48 (11): 6353-66.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa337>.
- Charenton, Clément, Claudine Gaudon-Plesse, Zaineb Fourati, Valerio Taverniti, Régis Back, Olga Kolesnikova, Bertrand Séraphin, et Marc Graille. 2017. « A unique surface on Pat1 C-terminal domain directly interacts with Dcp2 decapping enzyme and Xrn1 5'–3' mRNA exonuclease in yeast ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (45): E9493-9501.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1711680114>.
- Charenton, Clément, Valerio Taverniti, Claudine Gaudon-Plesse, Régis Back, Bertrand Séraphin, et Marc Graille. 2016. « Structure of the Active Form of Dcp1–Dcp2 Decapping Enzyme Bound to m7GDP and Its Edc3 Activator ». *Nature Structural & Molecular Biology* 23 (11): 982-86. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3300>.
- Coller, J M, M Tucker, U Sheth, M A Valencia-Sanchez, et R Parker. 2001. « The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. » *RNA* 7 (12): 1717-27.
- Coller, Jeff, et Roy Parker. 2005. « General Translational Repression by Activators of mRNA Decapping ». *Cell* 122 (6): 875-86. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.012>.
- Cosentino, Gregory P., Tobias Schmelzle, Ashkan Haghighat, Stephen B. Helliwell, Michael N. Hall, et Nahum Sonenberg. 2000. « Eap1p, a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-Associated Protein in *Saccharomyces cerevisiae* ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (13): 4604-13.
- Cui, Yajun, Deepti B. Ramnarain, Yueh-Chin Chiang, Liang-Hao Ding, Jeffrey S. McMahon, et Clyde L. Denis. 2008. « Genome Wide Expression Analysis of the CCR4-NOT Complex Indicates That It Consists of Three Modules with the NOT Module Controlling SAGA-Responsive Genes ». *Molecular Genetics and Genomics* 279 (4): 323-37.  
<https://doi.org/10.1007/s00438-007-0314-1>.
- Czaplinski, Kevin, Maria J. Ruiz-Echevarria, Sergey V. Paushkin, Xia Han, Youmin Weng, Haley A. Perlick, Harry C. Dietz, Michael D. Ter-Avanesyan, et Stuart W. Peltz. 1998. « The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs ». *Genes & Development* 12 (11): 1665-77.
- Dai, Xing-Xing, Zhi-Yan Jiang, Yun-Wen Wu, Qian-Qian Sha, Yang Liu, Jia-Yi Ding, Wen-Dong Xi, Jing Li, et Heng-Yu Fan. 2021. « CNOT6/6L-Mediated mRNA Degradation in Ovarian

- Granulosa Cells Is a Key Mechanism of Gonadotropin-Triggered Follicle Development ». *Cell Reports* 37 (7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110007>.
- Decourty, Laurence, Antonia Doyen, Christophe Malabat, Emmanuel Frachon, Delphine Rispal, Bertrand Séraphin, Frank Feuerbach, Alain Jacquier, et Cosmin Saveanu. 2014. « Long Open Reading Frame Transcripts Escape Nonsense-Mediated mRNA Decay in Yeast ». *Cell Reports* 6 (4): 593-98. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.025>.
- Dehecq, Marine, Laurence Decourty, Abdelkader Namane, Caroline Proux, Joanne Kanaan, Hervé Le Hir, Alain Jacquier, et Cosmin Saveanu. 2018. « Nonsense-mediated mRNA Decay Involves Two Distinct Upf1-bound Complexes ». *The EMBO Journal* 37 (21). <https://doi.org/10.15252/embj.201899278>.
- Dénervaud, Nicolas, Johannes Becker, Ricard Delgado-Gonzalo, Pascal Damay, Arun S. Rajkumar, Michael Unser, David Shore, Felix Naef, et Sebastian J. Maerkl. 2013. « A Chemostat Array Enables the Spatio-Temporal Analysis of the Yeast Proteome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (39): 15842. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308265110>.
- Deuerling, Elke, et Bernd Bukau. 2004. « Chaperone-Assisted Folding of Newly Synthesized Proteins in the Cytosol ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 39 (5-6): 261-77. <https://doi.org/10.1080/10409230490892496>.
- Dever, Thomas E., Jonathan D. Dinman, et Rachel Green. 2018. « Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (8): a032649. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032649>.
- Dever, Thomas E., et Rachel Green. 2012. « The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (7): a013706. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>.
- Eddy, S. R. 1998. « Profile hidden Markov models. » *Bioinformatics* 14 (9): 755-63. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.9.755>.
- Elkon, Ran, Alejandro P. Ugalde, et Reuven Agami. 2013. « Alternative Cleavage and Polyadenylation: Extent, Regulation and Function ». *Nature Reviews Genetics* 14 (7): 496-506. <https://doi.org/10.1038/nrg3482>.
- Fabian, Marc R., Filipp Frank, Christopher Rouya, Nadeem Siddiqui, Wi S. Lai, Alexey Karetnikov, Perry J. Blackshear, Bhushan Nagar, et Nahum Sonenberg. 2013. « Structural Basis for the Recruitment of the Human CCR4-NOT Deadenylation Complex by Tristetraprolin ». *Nature Structural & Molecular Biology* 20 (6): 735-39. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2572>.
- Ford, L. P., P. S. Bagga, et J. Wilusz. 1997. « The poly(A) tail inhibits the assembly of a 3'-to-5' exonuclease in an in vitro RNA stability system. » *Molecular and Cellular Biology* 17 (1): 398-406.
- Fourati, Zaineb, Olga Kolesnikova, Régis Back, Jenny Keller, Clément Charenton, Valerio Taverniti, Claudine Gaudon Plesse, et al. 2014. « The C-Terminal Domain from *S. cerevisiae* Pat1 Displays Two Conserved Regions Involved in Decapping Factor Recruitment ». *PLoS ONE* 9 (5): e96828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096828>.
- Gamerding, Martin. 2016. « Protein quality control at the ribosome: focus on RAC, NAC and RQC ». Édité par Patricija van Oosten-Hawle. *Essays in Biochemistry* 60 (2): 203-12. <https://doi.org/10.1042/EBC20160011>.
- Gamerding, Martin, Min Jia, Renate Schloemer, Laurenz Rabl, Mateusz Jaskolowski, Katrin M. Khakzar, Zeynel Ulusoy, et al. 2023. « NAC controls cotranslational N-terminal

- methionine excision in eukaryotes ». *Science* 380 (6651): 1238-43. <https://doi.org/10.1126/science.adg3297>.
- Gamerding, Martin, Kan Kobayashi, Annalena Wallisch, Stefan G. Kreft, Carolin Sailer, Renate Schlömer, Nadine Sachs, et al. 2019. « Early Scanning of Nascent Polypeptides inside the Ribosomal Tunnel by NAC ». *Molecular Cell* 75 (5): 996-1006.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.030>.
- Garneau, Nicole L., Jeffrey Wilusz, et Carol J. Wilusz. 2007. « The Highways and Byways of mRNA Decay ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (2): 113-26. <https://doi.org/10.1038/nrm2104>.
- Gautschi, Matthias, Sören Just, Andrej Mun, Suzanne Ross, Peter Rücknagel, Yves Dubaquié, Ann Ehrenhofer-Murray, et Sabine Rospert. 2003. « The Yeast N $\alpha$ -Acetyltransferase NatA Is Quantitatively Anchored to the Ribosome and Interacts with Nascent Polypeptides ». *Molecular and Cellular Biology* 23 (20): 7403-14. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.20.7403-7414.2003>.
- Gautschi, Matthias, Hauke Lilie, Ursula Fünfschilling, Andrej Mun, Suzanne Ross, Trevor Lithgow, Peter Rücknagel, et Sabine Rospert. 2001. « RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (7): 3762-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.071057198>.
- Ghosh, Agnidipta, et Christopher D. Lima. 2010. « Enzymology of RNA cap synthesis ». *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 1 (1): 152-72. <https://doi.org/10.1002/wrna.19>.
- Giaever, Guri, Angela M. Chu, Li Ni, Carla Connelly, Linda Riles, Steeve Véronneau, Sally Dow, et al. 2002. « Functional Profiling of the *Saccharomyces Cerevisiae* Genome ». *Nature* 418 (6896): 387-91. <https://doi.org/10.1038/nature00935>.
- Graham, Amy C., Daniel L. Kiss, et Erik D. Andrulis. 2006. « Differential Distribution of Exosome Subunits at the Nuclear Lamina and in Cytoplasmic Foci ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (3): 1399-1409. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-08-0805>.
- Guzman, Ulises H., Henriette Aksnes, Rasmus Ree, Nicolai Krogh, Magnus E. Jakobsson, Lars J. Jensen, Thomas Arnesen, et Jesper V. Olsen. 2023. « Loss of N-Terminal Acetyltransferase A Activity Induces Thermally Unstable Ribosomal Proteins and Increases Their Turnover in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Nature Communications* 14 (1): 4517. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40224-x>.
- Hartl, F. Ulrich, Andreas Bracher, et Manajit Hayer-Hartl. 2011. « Molecular Chaperones in Protein Folding and Proteostasis ». *Nature* 475 (7356): 324-32. <https://doi.org/10.1038/nature10317>.
- Hogg, J. Robert, et Stephen P. Goff. 2010. « Upf1 senses 3'UTR length to potentiate mRNA decay ». *Cell* 143 (3): 379-89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.005>.
- Holm, Liisa, et Laura M. Laakso. 2016. « Dali Server Update ». *Nucleic Acids Research* 44 (Web Server issue): W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw357>.
- Höpfner, Markus, Eva Absmeier, Sew-Yeu Peak-Chew, Evangelia Vartholomaïou, Lori A. Passmore, Ivana Gasic, et Ramanujan S. Hegde. 2023. « Mechanism of ribosome-associated mRNA degradation during tubulin autoregulation ». *Molecular Cell* 83 (13): 2290-2302.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2023.05.020>.
- Huntzinger, Eric, Isao Kashima, Maria Fauser, Jérôme Saulière, et Elisa Izaurralde. 2008. « SMG6 is the catalytic endonuclease that cleaves mRNAs containing nonsense codons in metazoan ». *RNA* 14 (12): 2609-17. <https://doi.org/10.1261/rna.1386208>.

- Ito, Takashi, Tomoko Chiba, Ritsuko Ozawa, Mikio Yoshida, Masahira Hattori, et Yoshiyuki Sakaki. 2001. « A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (8): 4569-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.061034498>.
- Izaurralde, E, U Kutay, C von Kobbe, I W Mattaj, et D Görlich. 1997. « The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. » *The EMBO Journal* 16 (21): 6535-47. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.21.6535>.
- Kahvejian, A., G. Roy, et N. Sonenberg. 2001. « The mRNA Closed-Loop Model: The Function of PABP and PABP-Interacting Proteins in mRNA Translation ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 66 (0): 293-300. <https://doi.org/10.1101/sqb.2001.66.293>.
- Knorr, Alexandra G., Timur Mackens-Kiani, Joanna Musial, Otto Berninghausen, Thomas Becker, Birgitta Beatrix, et Roland Beckmann. 2023. « The dynamic architecture of Map1- and NatB-ribosome complexes coordinates the sequential modifications of nascent polypeptide chains ». *PLOS Biology* 21 (4): e3001995. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001995>.
- Kolesnikova, Olga, Régis Back, Marc Graille, et Bertrand Séraphin. 2013. « Identification of the Rps28 binding motif from yeast Edc3 involved in the autoregulatory feedback loop controlling RPS28B mRNA decay ». *Nucleic Acids Research* 41 (20): 9514-23. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt607>.
- Krempl, Christina, Daniela Lazzaretti, et Remco Sprangers. 2023. « A Structural Biology View on the Enzymes Involved in Eukaryotic mRNA Turnover ». *Biological Chemistry* 404 (11-12): 1101-21. <https://doi.org/10.1515/hsz-2023-0182>.
- Krogan, Nevan J., Gerard Cagney, Haiyuan Yu, Gouqing Zhong, Xinghua Guo, Alexandr Ignatchenko, Joyce Li, et al. 2006. « Global Landscape of Protein Complexes in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Nature* 440 (7084): 637-43. <https://doi.org/10.1038/nature04670>.
- Kshirsagar, Meenakshi, et Roy Parker. 2004. « Identification of Edc3p as an enhancer of mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. » *Genetics* 166 (2): 729-39.
- Lebreton, Alice, Rafal Tomecki, Andrzej Dziembowski, et Bertrand Séraphin. 2008. « Endonucleolytic RNA Cleavage by a Eukaryotic Exosome ». *Nature* 456 (7224): 993-96. <https://doi.org/10.1038/nature07480>.
- Lentzsch, Alfred M., Denis Yudin, Martin Gamerding, Sowmya Chandrasekar, Laurenz Rabl, Alain Scaiola, Elke Deuerling, Nenad Ban, et Shu-ou Shan. 2024. « NAC Guides a Ribosomal Multienzyme Complex for Nascent Protein Processing ». *Nature*, août, 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07846-7>.
- Liu, Hudan, Nancy D. Rodgers, Xinfu Jiao, et Megerditch Kiledjian. 2002. « The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases ». *The EMBO Journal* 21 (17): 4699-4708. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf448>.
- Liu, Quansheng, Jaclyn C. Greimann, et Christopher D. Lima. 2006. « Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome ». *Cell* 127 (6): 1223-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.10.037>.
- Liu, Yiwei, Yingxia Hu, Xu Li, Liwen Niu, et Maikun Teng. 2010. « The Crystal Structure of the Human Nascent Polypeptide-Associated Complex Domain Reveals a Nucleic Acid-Binding Region on the NACA Subunit », *Biochemistry* 49 (13): 2890-96. <https://doi.org/10.1021/bi902050p>.

- Malys, Naglis, Kathleen Carroll, Jaleel Miyan, David Tollervey, et John E. G. McCarthy. 2004. « The 'scavenger' m7GpppX pyrophosphatase activity of Dcs1 modulates nutrient-induced responses in yeast ». *Nucleic Acids Research* 32 (12): 3590-3600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh687>.
- Mangus, David A., Nadia Amrani, et Allan Jacobson. 1998. « Pbp1p, a Factor Interacting with *Saccharomyces Cerevisiae* Poly(A)-Binding Protein, Regulates Polyadenylation ». *Molecular and Cellular Biology* 18 (12): 7383. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.12.7383>.
- Mauxion, Fabienne, Jérôme Basquin, Sevim Ozgur, Marion Rame, Jana Albrecht, Ingmar Schäfer, Bertrand Séraphin, et Elena Conti. 2022. « The human CNOT1-CNOT10-CNOT11 complex forms a structural platform for protein-protein interactions ». *Cell Reports* 42 (1): 111902. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111902>.
- Mauxion, Fabienne, et Bertrand Séraphin. 2024. « An RNA-Ligation-Based RACE-PAT Assay to Monitor Poly(A) Tail Length of mRNAs of Interest ». In *Deadenylation: Methods and Protocols*, édité par Eugene Valkov et Aaron C. Goldstrohm, 113-23. New York, NY: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3481-3\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3481-3_7).
- Muhlrاد, Denise, Carolyn J. Decker, et Roy Parker. 1995. « Turnover Mechanisms of the Stable Yeast PGK1 mRNA ». *Molecular and Cellular Biology* 15 (4): 2145-56. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.2145>.
- Mulder, Klaas W., G. Sebastiaan Winkler, et H. Th. Marc Timmers. 2005. « DNA damage and replication stress induced transcription of RNR genes is dependent on the Ccr4-Not complex ». *Nucleic Acids Research* 33 (19): 6384-92. <https://doi.org/10.1093/nar/gki938>.
- Nasertorabi, Fariborz, Claire Batisse, Meikel Diepholz, Dietrich Suck, et Bettina Böttcher. 2011. « Insights into the structure of the CCR4-NOT complex by electron microscopy ». *Febs Letters* 585 (14): 2182-86. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.05.071>.
- Niessing, Dierk, Stefan Hüttelmaier, Daniel Zenklusen, Robert H. Singer, et Stephen K. Burley. 2004. « She2p Is a Novel RNA Binding Protein with a Basic Helical Hairpin Motif ». *Cell* 119 (4): 491-502. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.10.018>.
- Otto, Hendrik, Charlotte Conz, Philipp Maier, Tina Wölflle, Carolyn K. Suzuki, Paul Jenö, Peter Rücknagel, Joachim Stahl, et Sabine Rospert. 2005. « The chaperones MPP11 and Hsp70L1 form the mammalian ribosome-associated complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (29): 10064-69. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504400102>.
- Pacheco-Fiallos, Belén, Matthias K. Vorländer, Daria Riabov-Bassat, Laura Fin, Francis J. O'Reilly, Farja I. Ayala, Ulla Schellhaas, Juri Rappsilber, et Clemens Plaschka. 2023. « mRNA Recognition and Packaging by the Human Transcription-Export Complex ». *Nature* 616 (7958): 828-35. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05904-0>.
- Parker, Roy, et Ujwal Sheth. 2007. « P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation ». *Molecular Cell* 25 (5): 635-46. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>.
- Passmore, Lori A., et Jeff Collier. 2022. « Roles of mRNA Poly(A) Tails in Regulation of Eukaryotic Gene Expression ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23 (2): 93-106. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00417-y>.
- Peisker, Kristin, Marco Chiabudini, et Sabine Rospert. 2010. « The ribosome-bound Hsp70 homolog Ssb of *Saccharomyces cerevisiae* ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

- Molecular Cell Research*, Molecular Chaperones and Intracellular Protein Transport, 1803 (6): 662-72. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.03.005>.
- Pereira, Jose H., Ryan P. McAndrew, Giovani P. Tomaleri, et Paul D. Adams. 2017. « Berkeley Screen: A Set of 96 Solutions for General Macromolecular Crystallization ». *Journal of Applied Crystallography* 50 (Pt 5): 1352. <https://doi.org/10.1107/S1600576717011347>.
- Pillet, Benjamin, Juan J. García-Gómez, Patrick Pausch, Laurent Falquet, Gert Bange, Jesús de la Cruz, et Dieter Kressler. 2015. « The Dedicated Chaperone Acl4 Escorts Ribosomal Protein Rpl4 to Its Nuclear Pre-60S Assembly Site ». *PLoS Genetics* 11 (10): e1005565. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005565>.
- Pillet, Benjamin, Alfonso Méndez-Godoy, Guillaume Murat, Sébastien Favre, Michael Stumpe, Laurent Falquet, et Dieter Kressler. 2022. « Dedicated Chaperones Coordinate Co-Translational Regulation of Ribosomal Protein Production with Ribosome Assembly to Preserve Proteostasis ». *eLife* 11 (mars): e74255. <https://doi.org/10.7554/eLife.74255>.
- Pillet, Benjamin, Valentin Mitterer, Dieter Kressler, et Brigitte Pertschy. 2017. « Hold on to Your Friends: Dedicated Chaperones of Ribosomal Proteins ». *BioEssays* 39 (1): e201600153. <https://doi.org/10.1002/bies.201600153>.
- Preissler, Steffen, et Elke Deuerling. 2012. « Ribosome-associated chaperones as key players in proteostasis ». *Trends in Biochemical Sciences* 37 (7): 274-83. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.03.002>.
- Presnyak, Vladimir, Najwa Alhusaini, Ying-Hsin Chen, Sophie Martin, Nathan Morris, Nicholas Kline, Sara Olson, et al. 2015. « Codon Optimality Is a Major Determinant of mRNA Stability ». *Cell* 160 (6): 1111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.029>.
- Prouteau, Manoël, Marie-Claire Daugeron, et Bertrand Séraphin. 2008. « Regulation of ARE transcript 3' end processing by the yeast Cth2 mRNA decay factor ». *The EMBO Journal* 27 (22): 2966-76. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.212>.
- Puig, Oscar, Friederike Caspary, Guillaume Rigaut, Berthold Rutz, Emmanuelle Bouveret, Elisabeth Bragado-Nilsson, Matthias Wilm, et Bertrand Séraphin. 2001. « The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification ». *Methods* 24 (3): 218-29. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1183>.
- Quan, Yujun, Meijiao Wang, Chengpeng Xu, Xiaoxiao Wang, Yu Wu, Dandan Qin, Yuxuan Lin, Xukun Lu, Falong Lu, et Lei Li. 2022. « Cnot8 eliminates naïve regulation networks and is essential for naïve-to-formative pluripotency transition ». *Nucleic Acids Research* 50 (8): 4414-35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac236>.
- Raasi, Shahri, et Cecile M. Pickart. 2003. « Rad23 Ubiquitin-associated Domains (UBA) Inhibit 26 S Proteasome-catalyzed Proteolysis by Sequestering Lysine 48-linked Polyubiquitin Chains\* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (11): 8951-59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212841200>.
- Radhakrishnan, Aditya, Ying-Hsin Chen, Sophie Martin, Najwa Alhusaini, Rachel Green, et Jeff Collier. 2016. « The DEAD-box protein Dhh1p couples mRNA decay and translation by monitoring codon optimality ». *Cell* 167 (1): 122-132.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.053>.
- Reimann, Barbara, John Bradsher, Jacqueline Franke, Enno Hartmann, Martin Wiedmann, Siegfried Prehn, et Brigitte Wiedmann. 1999. « Initial Characterization of the Nascent Polypeptide-Associated Complex in Yeast ». *Yeast* 15 (5): 397-407. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19990330\)15:5<397::AID-YEA384>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19990330)15:5<397::AID-YEA384>3.0.CO;2-U).

- Roque, Sylvain, Marie Cerciati, Isabelle Gaugué, Liliana Mora, Aurélie G. Floch, Miklos de Zamaroczy, Valérie Heurgué-Hamard, et Stephanie Kervestin. 2015. « Interaction between the Poly(A)-Binding Protein Pab1 and the Eukaryotic Release Factor eRF3 Regulates Translation Termination but Not mRNA Decay in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *RNA* 21 (1): 124-34. <https://doi.org/10.1261/rna.047282.114>.
- Rubtsova, Maria P., Daria V. Sizova, Sergei E. Dmitriev, Dmitri S. Ivanov, Vladimir S. Prassolov, et Ivan N. Shatsky. 2003. « Distinctive Properties of the 5'-Untranslated Region of Human Hsp70 mRNA \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (25): 22350-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303213200>.
- Schäfer, Ingmar B., Michaela Rode, Fabien Bonneau, Steffen Schüssler, et Elena Conti. 2014. « The Structure of the Pan2–Pan3 Core Complex Reveals Cross-Talk between Deadenylase and Pseudokinase ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (7): 591-98. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2834>.
- Schäfer, Ingmar B., Masami Yamashita, Jan Michael Schuller, Steffen Schüssler, Peter Reichelt, Mike Strauss, et Elena Conti. 2019. « Molecular Basis for poly(A) RNP Architecture and Recognition by the Pan2-Pan3 Deadenylase ». *Cell* 177 (6): 1619-1631.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.013>.
- Scutenaire, Jérémy, Damien Plassard, Mélody Matelot, Tommaso Villa, Julie Zumsteg, Domenico Libri, et Bertrand Séraphin. 2022. « The *S. cerevisiae* m6A-reader Pho92 promotes timely meiotic recombination by controlling key methylated transcripts ». *Nucleic Acids Research* 51 (2): 517-35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac640>.
- Sharif, Humayun, et Elena Conti. 2013. « Architecture of the Lsm1-7-Pat1 Complex: A Conserved Assembly in Eukaryotic mRNA Turnover ». *Cell Reports* 5 (2): 283-91. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.004>.
- Sharif, Humayun, Sevim Ozgur, Kundan Sharma, Claire Basquin, Henning Urlaub, et Elena Conti. 2013. « Structural analysis of the yeast Dhh1–Pat1 complex reveals how Dhh1 engages Pat1, Edc3 and RNA in mutually exclusive interactions ». *Nucleic Acids Research* 41 (17): 8377-90. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt600>.
- Shoemaker, Christopher J., et Rachel Green. 2012. « Translation Drives mRNA Quality Control ». *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (6): 594-601. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2301>.
- Simms, Carrie L., Erica N. Thomas, et Hani S. Zaher. 2017. « Ribosome-based quality control of mRNA and nascent peptides ». *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* 8 (1): 10.1002/wrna.1366. <https://doi.org/10.1002/wrna.1366>.
- Spreter, Thomas, Markus Pech, et Birgitta Beatrix. 2005. « The Crystal Structure of Archaeal Nascent Polypeptide-Associated Complex (NAC) Reveals a Unique Fold and the Presence of a Ubiquitin-Associated Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (16): 15849-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500160200>.
- Stupfler, Benjamin, Catherine Birck, Bertrand Séraphin, et Fabienne Mauxion. 2016. « BTG2 bridges PABPC1 RNA-binding domains and CAF1 deadenylase to control cell proliferation ». *Nature Communications* 7 (février):10811. <https://doi.org/10.1038/ncomms10811>.
- Takakura, H., S. Tsunasawa, M. Miyagi, et J. R. Warner. 1992. « NH2-Terminal Acetylation of Ribosomal Proteins of *Saccharomyces Cerevisiae* ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (8): 5442-45.
- Tesina, Petr, Elisabeth Heckel, Jingdong Cheng, Micheline Fromont-Racine, Robert Buschauer, Lukas Kater, Birgitta Beatrix, et al. 2019. « Structure of the 80S Ribosome–Xrn1

- Nuclease Complex ». *Nature Structural & Molecular Biology* 26 (4): 275-80. <https://doi.org/10.1038/s41594-019-0202-5>.
- Uchida, Naoyuki, Shin-ichi Hoshino, et Toshiaki Katada. 2004. « Identification of a Human Cytoplasmic Poly(A) Nuclease Complex Stimulated by Poly(A)-Binding Protein \* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (2): 1383-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309125200>.
- Ukleja, Marta, Jorge Cuellar, Aleksandra Siwaszek, Joanna M. Kasprzak, Mariusz Czarnocki-Cieciura, Janusz M. Bujnicki, Andrzej Dziembowski, et Jose M. Valpuesta. 2016. « The architecture of the Schizosaccharomyces pombe CCR4-NOT complex ». *Nature Communications* 7 (janvier):10433. <https://doi.org/10.1038/ncomms10433>.
- Vetro, Joseph A., et Yie-Hwa Chang. 2002. « Yeast Methionine Aminopeptidase Type 1 Is Ribosome-Associated and Requires Its N-Terminal Zinc Finger Domain for Normal Function in Vivo ». *Journal of Cellular Biochemistry* 85 (4): 678-88. <https://doi.org/10.1002/jcb.10161>.
- Warner, Jonathan R, et Paul M Knopf. 2002. « The discovery of polyribosomes ». *Trends in Biochemical Sciences* 27 (7): 376-80. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02126-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02126-6).
- Webster, Michael W., Ying-Hsin Chen, James A. W. Stowell, Najwa Alhusaini, Thomas Sweet, Brenton R. Graveley, Jeff Collier, et Lori A. Passmore. 2018. « mRNA Deadenylation Is Coupled to Translation Rates by the Differential Activities of Ccr4-Not Nucleases ». *Molecular Cell* 70 (6): 1089-1100.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.05.033>.
- Wilkinson, Max E., Clément Charenton, et Kiyoshi Nagai. 2020. « RNA Splicing by the Spliceosome ». *Annual Review of Biochemistry* 89 (Volume 89, 2020): 359-88. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-091719-064225>.
- Wurm, Jan Philip, et Remco Sprangers. 2019. « Dcp2: an mRNA decapping enzyme that adopts many different shapes and forms ». *Current Opinion in Structural Biology* 59 (décembre):115-23. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.07.009>.
- Yamashita, Akio, Tsung-Cheng Chang, Yukiko Yamashita, Wenmiao Zhu, Zhenping Zhong, Chyi-Ying A. Chen, et Ann-Bin Shyu. 2005. « Concerted Action of Poly(A) Nucleases and Decapping Enzyme in Mammalian mRNA Turnover ». *Nature Structural & Molecular Biology* 12 (12): 1054-63. <https://doi.org/10.1038/nsmb1016>.
- Yang, Ying, Phillip J. Hsu, Yu-Sheng Chen, et Yun-Gui Yang. 2018. « Dynamic Transcriptomic m6A Decoration: Writers, Erasers, Readers and Functions in RNA Metabolism ». *Cell Research* 28 (6): 616-24. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0040-8>.
- Zenklusen, Daniel, et Françoise Stutz. 2001. « Nuclear Export of mRNA ». *FEBS Letters* 498 (2-3): 150-56. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02482-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02482-6).
- Zhang, Yixiao, Chengying Ma, Yi Yuan, Jing Zhu, Ningning Li, Chu Chen, Shan Wu, Li Yu, Jianlin Lei, et Ning Gao. 2014. « Structural Basis for Interaction of a Cotranslational Chaperone with the Eukaryotic Ribosome ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21 (12): 1042-46. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2908>.