

Université de Montréal

**Caractérisation de la sous-unité bêta du translocon chez
la levure *Schizosaccharomyces pombe***

par

Alexandre Leroux

Département de biochimie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître en Science (M.Sc)
en Biochimie

Décembre 2008

© Alexandre Leroux, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation de la sous-unité bêta du translocon
chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*

présenté par :

Alexandre Leroux

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Christian Baron, président-rapporteur
Luis A. Rokeach, directeur de recherche
Normand Brisson, membre du jury

Résumé

La sécrétion des protéines est un processus essentiel à la vie. Chez les eucaryotes, les protéines sécrétées transitent dans le réticulum endoplasmique par le pore de translocation. Le translocon est composé de trois sous-unités fondamentales nommées Sec61 α , β et γ chez les mammifères, ou Sec61p, Sbh1p et Sss1p chez les levures. Tandis que le rôle des sous-unités α et γ est bien connu, celui de la sous-unité β demeure énigmatique. Plusieurs phénotypes distincts sont associés à cette protéine dans différents organismes, mais le haut niveau de conservation de séquence suggère plutôt une fonction universelle conservée. Récemment, Feng *et al.* (2007) ont montré que le domaine transmembranaire (TMD) de Sbh1p était suffisant pour compléter plusieurs phénotypes associés à la délétion du gène chez *Saccharomyces cerevisiae*, suggérant un rôle important de cette région. L'objectif de mon projet de recherche consiste à étudier la fonction biologique de la sous-unité β du translocon et de son TMD chez *Schizosaccharomyces pombe*. Dans cette levure, j'ai découvert que le gène *sbh1*⁺ n'était pas essentiel à la viabilité à 30°C, mais qu'il était requis pour la croissance à basse température. La délétion de *sbh1*⁺ entraîne une sensibilité aux stress de la paroi cellulaire et une diminution de la sécrétion des protéines à 23°C. La surexpression de Sbh1p diminue elle aussi la sécrétion des protéines et altère la morphologie cellulaire. Ces phénotypes sont distincts de ceux observés chez *S. cerevisiae*, où la délétion des deux paralogues de Sec61 β entraîne une sensibilité à haute température plutôt qu'à basse température. Malgré cela, les homologues de Sec61 β de *S. pombe* et de *S. cerevisiae* sont tout deux capables de compléter la thermosensibilité respective de chaque levure. La complémentation est possible même avec l'homologue humain de Sec61 β , indiquant la conservation d'une fonction de Sec61 β de la levure à l'homme. Remarquablement, le TMD de Sec61 β de *S. pombe*, de *S. cerevisiae* et de l'humain sont suffisants pour compléter la délétion génomique autant chez la levure à fission que chez la levure à bourgeons. Globalement, ces observations indiquent que le TMD de Sec61 β exerce une fonction cellulaire conservée à travers les espèces.

Mots-clés : Sec61 bêta, Sbh1p, translocon, domaine transmembranaire, levure, complémentation, sécrétion, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

Protein secretion is an essential biological process. In eukaryotes, secreted proteins transit into the endoplasmic reticulum through the translocon pore. The core of the translocation channel is composed of three subunits called Sec61 α , β and γ in mammals, or Sec61p, Sbh1p and Sss1p in yeasts. While the role of the α and γ subunit is well understood, the function of the β subunit remains ill-defined. Although numerous species-specific phenotypes have been reported for this protein, the striking sequence conservation among species argue in favour of a universal role. Recently, Feng *et al.* (2007) reported the surprising finding that the transmembrane domain (TMD) of Sbh1p was sufficient to complement different functions of the entire protein in *Saccharomyces cerevisiae*, suggesting an important role for this region. The aim of my project was to explore the biological function of the translocon β subunit and its TMD in *Schizosaccharomyces pombe*. In this yeast, we found that the *sbh1*⁺ gene is unessential for viability at 30°C, but is required for growth at low temperature. Knockout of *sbh1*⁺ results in sensitivity to cell-wall stress and reduced protein secretion at 23°C. Overexpression of Sbh1p also diminishes protein secretion and results in an elongated cell shape. These phenotypes contrast with those observed *S. cerevisiae*, as deletion of both Sec61 β paralogs in this yeast results in heat sensitivity instead of cold sensitivity. Nevertheless, Sec61 β homologs from both *S. pombe* and *S. cerevisiae* complement the respective temperature sensitivity of either yeast. This functional complementation can also be accomplished by the human homolog of the translocon β subunit, indicating that a fundamental function of Sec61 β is conserved from yeast to human. Remarkably, the TMD of Sec61 β homologs from *S. pombe*, *S. cerevisiae* and human are sufficient to complement the gene knockout in both fission and budding yeasts. Together, these observations indicate that the TMD of Sec61 β exerts a cellular function that is conserved across species.

Keywords : Sec61 beta, Sbh1p, translocon, transmembrane domain, yeast, complementation, secretion, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Préface

Cette recherche a été réalisée dans le Département de Biochimie de l'Université de Montréal, de 2006 à 2009. Son succès a été rendu possible grâce à la présence et aux efforts de nombreuses personnes, que je tiens à remercier ici.

D'abord, je remercie mon directeur de recherche, Luis A. Rokeach, pour m'avoir accordé la chance de travailler dans son laboratoire. Dès ma première année de baccalauréat, il a été le premier à me proposer un projet personnalisé et novateur et à superviser ma formation de biochimiste. Il m'a toujours encouragé et a tenu à me pousser au maximum de mes capacités pour faire de moi un meilleur chercheur. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir offert une grande liberté dans le choix et la réalisation de mon projet. Jamais il n'a refusé une expérience que je voulais faire, ni une occasion d'améliorer ma formation scientifique. Enfin, que dire de ses fameux BBQ et partys de Noël, qui ont cimenté les relations de notre laboratoire tout en nous bourrant la panse! Un grand merci donc à un directeur de recherche passionné.

Ensuite, j'aimerais remercier chacun des membres de notre laboratoire que j'ai eu la chance de fréquenter. Merci à Renée, pour ta présence réconfortante. Toujours attentionnée et désireuse d'aider les autres dans les moments difficiles, tu as été un modèle de persévérance pour moi. Sache que tes conseils et ton sourire m'ont influencé énormément. Merci à Pascale, pour ta présence stimulante. Patiente et vivante, tu as toujours répondu à mes questions, autant scientifiques que geeks. Toi aussi, tu as été un grand modèle d'excellence pour moi, et je suis persuadé que tu réussiras au-delà de toute attente. Merci à Antoine, pour ta présence vivifiante. Nos discussions sur les filles, le vieillissement et le poker ont beaucoup animé le laboratoire. Enfin, un Français qui sait sacrer et vanter les bienfaits du Québec (à l'occasion)! Merci à Patrick, mon classique partenaire de bench, pour nos discussions enflammées, tes soirées cocktail, tes conseils et ta présence animée. Les manip n'auraient pas été pareilles sans toi! Merci à Geneviève, notre fidèle et acadienne assistante de recherche, pour ta présence pétillante et ton aide appréciée. Merci à Cynthia, pour m'avoir accepté comme stagiaire et m'avoir beaucoup appris à de nombreux égards. Merci aussi à Faddi, pour ton entrain et tes plaisanteries, et pour avoir inspiré une

grande partie de mon projet. Enfin, merci à Fred, mon collègue stagiaire, pour avoir encouragé mon goût du dépassement et des desserts sucrés! Chacun de vous a transformé mon travail de recherche en plaisir de recherche!

Par ailleurs, une maîtrise ne saurait être réalisée sans le soutien de plusieurs personnes, que je tiens également à remercier. Merci à tous mes meilleurs amis du baccalauréat, René, Sam, Évelyne, Véro, Douce, Julie et Thu Ngan, pour avoir crû en mes capacités et avoir partagé avec moi l'expérience de la maîtrise. Un merci tout spécial à René Therrien, qui s'est continuellement enquis des progrès de mes travaux, qui est venu me voir au laboratoire et qui a poussé l'audace jusqu'à m'aider à corriger mon mémoire! René, tu es une source d'inspiration et un regain d'énergie ambulant! Merci également aux membres du laboratoire Pelletier pour m'avoir soutenu depuis mon stage chez eux, et aux membres du laboratoire Chartrand pour avoir partagé leur expertise et leurs amusements. Merci aussi à Vanessa, pour sa présence rafraîchissante, ainsi qu'à mes parents et à ma famille, qui m'ont apporté un soutien inconditionnel dans la réalisation de mes études.

Enfin, une maîtrise requiert aussi le soutien de nombreux partenaires scientifiques. À ce titre, j'accorde un merci spécial à Pascal Chartrand, pour avoir parrainé mes recherches et m'avoir continuellement conseillé et orienté dans la réalisation de mon projet. Merci à Normand Brisson, qui a fait partie de mon comité d'évaluation de maîtrise, et à Christian Baron, qui a discuté abondamment de mon projet lors de la retraite départementale. Merci à ces deux grands directeurs pour avoir lu, corrigé et critiqué mon mémoire. Merci également à tous les directeurs de recherche à l'étranger (Bernhard Dobberstein, Randy Schekman, Tom A. Rapoport, Jaana Toikkanen, Jussi Jääntti et Shelley Sazer) qui m'ont offert leur collaboration sous forme d'anticorps, de plasmides, de souches et de conseils pratiques. Vous êtes la preuve vivante que les scientifiques forment une communauté où l'entraide et la solidarité sont de mise. Pour finir, merci aux organismes subventionnaires (CRSNG, FRSQ, FES) qui m'ont offert leur soutien financier et qui continuent de l'offrir aux scientifiques de demain.

Finalement, merci à vous, lecteurs de ce mémoire! J'espère que vous l'apprécierez et qu'il vous apportera des connaissances nouvelles.

*À mes parents, qui m'ont toujours
soutenu et encouragé*

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Préface	v
Table des matières	viii
Liste des publications	xii
Liste des tableaux	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des abréviations	xvi
Chapitre I : Introduction	1
1.1 Problématique	2
1.2 La voie de sécrétion	4
1.3 La voie de sécrétion chez les procaryotes	4
1.3.1 Identification des gènes impliqués dans la sécrétion	6
1.3.2 L'appareil général de sécrétion bactérien	6
1.3.3 La structure du translocon chez l'archée	8
1.3.3.1 Structure de SecY	9
1.3.3.2 Structure de SecE	11
1.3.3.2 Structure de Sec β	11
1.4 La voie de sécrétion chez les eucaryotes	12
1.4.1 Identification des gènes impliqués dans la sécrétion	12
1.4.2 Reconnaissance des protéines de la voie de sécrétion	13
1.4.3 Ciblage des protéines au réticulum endoplasmique	15
1.4.3.1 Ciblage dépendant de SRP	15
1.4.3.2 Ciblage indépendant de SRP	15
1.4.3.3 Ciblage des protéines transmembranaires	16
1.4.4 Translocation des protéines	16
1.4.4.1 Translocation co-traductionnelle	19
1.4.4.2 Translocation post-traductionnelle	19
1.4.4.3 Translocation des protéines transmembranaires	20

1.4.5	Maturation des protéines dans le RE.....	20
1.4.5.1	Modifications covalentes des protéines	21
1.4.5.2	Repliement des protéines	22
1.4.5.3	Contrôle de qualité dans le RE.....	22
1.4.6	Transport vésiculaire.....	23
1.4.6.1	Exportation vers l'appareil de Golgi.....	23
1.4.6.2	Exportation vers des compartiments post-Golgi.....	24
1.4.7	Problèmes de la voie de sécrétion	25
1.4.7.1	La réponse UPR	25
1.4.7.2	La rétrotranslocation et le ERAD.....	26
1.5	Le translocon eucaryote	28
1.5.1	Composantes du translocon.....	28
1.5.1.1	La sous-unité α	28
1.5.1.2	La sous-unité β	30
1.5.1.3	La sous-unité γ	30
1.5.2	Protéines associées au translocon.....	31
1.5.2.1	TRAM	31
1.5.2.2	RAMP4/SERP1	32
1.5.2.3	SRP, SR et ribosomes	33
1.5.2.4	Complexe OST et SP	33
1.5.2.5	BiP et autres chaperones	34
1.5.2.6	Complexe Sec62/Sec63.....	34
1.5.2.7	Complexe de rétrotranslocation	37
1.5.3	Le second translocon de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
1.5.4	Oligomérisation du translocon	39
1.6	La sous-unité β du translocon	41
1.6.1	SecG chez les bactéries	41
1.6.2	Sec β chez les archées	42
1.6.3	Sbh1/2 chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	44
1.6.3.1	Sbh1p	45
1.6.3.2	Sbh2p	45

1.6.3.3 Le domaine transmembranaire de SC_Sec61 β	47
1.6.3.4 Autres partenaires d'interaction de SC_Sec61 β	47
1.6.4 Sbh1p chez d'autres levures.....	48
1.6.4.1 Sbh1p chez <i>Kluyveromyces lactis</i>	48
1.6.4.2 Sbh1p chez <i>Yarrowia lipolytica</i>	49
1.6.4.3 Sbh1p chez les microsporidies	50
1.6.5 Sec61 β chez les eucaryotes pluricellulaires	52
1.6.5.1 Sec61 β chez les plantes	52
1.6.5.2 Sec61 β chez la drosophile	53
1.6.5.3 Sec61 β chez les mammifères	54
1.7 Projet de recherche	56
1.7.1 Choix du modèle	56
1.7.2 Objectif de recherche	57
Chapitre II : Article	58
Abstract	60
Introduction	61
Results	64
Discussion	69
Materials and Methods	73
Acknowledgments.....	76
Literature cited	77
Tables	82
Figures.....	83
Chapitre III : Discussion	93
3.1 Retour sur la problématique	94
3.2 Regard sur les différents phénotypes associés à Sec61 β	95
3.2.1 Différences structurelles des homologues.....	95
3.2.2 Différences dans des voies métaboliques.....	96
3.2.3 Différences dans le sécrétome.....	98
3.3 L'importance du domaine transmembranaire de Sec61 β	99
3.3.1 Rôle d'ancre membranaire et de localisation cellulaire	99

3.3.2 Interactions intramembranaires	100
3.3.3 Rôle stabilisateur	101
3.3.4 Rôle d'oligomérisation.....	102
3.4 Conclusion et perspectives	103
3.4.1 Suite du projet	103
3.4.2 Retombées à long terme	104
Annexes.....	105
4.1 Effet de la délétion de SP_Sec61 β sur la réponse UPR	105
4.2 Coimmunoprécipitation de SP_Sec61 β	107
4.3 Mutagenèse dirigée du TMD de SP_Sec61 β	109
4.4 Phénomène Cin, identification du gène <i>isp6</i> ⁺ et lien avec SP_Sec61 β	111
Bibliographie.....	116

Liste des publications

Le mémoire présenté ici est basé sur l'article suivant :

Leroux, A. and Rokeach, L. (2008). Inter-Species Complementation of the Translocon Beta Subunit Requires Only its Transmembrane Domain. *PloS One* 3(12): e3880 [PMID: 19057642]

Liste des tableaux

Tableau de l'introduction du mémoire

Tableau 1. Nomenclature des sous-unités du translocon à travers les espèces	5
---	---

Tableaux de l'article

Table I. Yeast strains used in this study	82
Table II. Plasmids used in this study	82

Liste des figures

Figures de l'introduction du mémoire

Figure 1.1 La sécrétion des protéines	3
Figure 1.2 La voie générale de sécrétion bactérienne	7
Figure 1.3 La structure du translocon	10
Figure 1.4 La voie de sécrétion eucaryote	14
Figure 1.5 La translocation co-traductionnelle chez les eucaryotes	17
Figure 1.6 La translocation post-traductionnelle chez les eucaryotes	18
Figure 1.7 La rétrotranslocation des protéines	27
Figure 1.8 Les protéines associées au translocon	36
Figure 1.9 L'oligomérisation du translocon	40
Figure 1.10 Alignement de séquences de la sous-unité β du translocon	43
Figure 1.11 Arbre phylogénique de la sous-unité β du translocon	51

Figures de l'article

Figure 1. The translocon β subunit is conserved from yeast to human.....	83
Figure 2. Phenotypes associated with the knockout and overexpression of SP_Sec61 β .	84
Figure 3. Effects of SP_Sec61 β levels on protein secretion	87
Figure 4. Different homologs complement the phenotypes of the Sec61 β knockout in fission and budding yeast	89
Figure 5. The transmembrane domain (TMD) of different Sec61 β homologs is sufficient to complement the knockout of the whole gene in fission and budding yeast.....	91

Figures des annexes

Figure 4.1 Réponse UPR des cellules $\Delta sbh1$	106
Figure 4.2 Coimmunoprécipitation de SP_Sec61 β avec la calnexine et BiP	108
Figure 4.3 Mutagenèse dirigée du TMD de SP_Sec61 β	110
Figure 4.4 Rôle d'Isp6p et de SP_Sec61 β dans le phénomène Cin	112

Liste des abréviations

A	Adénine
AL_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Antonospora locustae</i>
BiP	Binding Protein
Cdn	Calnexine dépendant
Cin	Calnexine Indépendant
Cnx	Calnexine
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DM_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Drosophila melanogaster</i>
EC_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>
EM	Microscopie Électronique
ERAD	Dégradation Associée au Réticulum Endoplasmique
ERGIC	Compartiment Intermédiaire ER-Golgi
EtBr	Bromure d'Éthidium
GC_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Gymnadenia conopsea</i>
GEF	Facteur d'Échange de nucléotides Guanine
GET	Trafic Golgi-ER
GPI	GlycoPhosphatidylInositol
HS_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Homo sapiens</i> (humain)
KL_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Kluyveromyces lactis</i>
L	Leucine
OST	Oligosaccharide Transférase
PDI	Disulphide Isomérase
PPI	Peptidyl-Proline Isomérase
<i>prl</i>	Mutant de Localisation Protéique
QC	Contrôle de Qualité
RAMP	Protéine Membranaire Associée aux Ribosomes
RE	Réticulum Endoplasmique
Sbh1	Sec61 Beta Homolog 1
<i>sec</i>	Sécrétion

Sec61	Translocon de levure
Sec61 $\alpha\beta\gamma$	Translocon de mammifère
Sec β	Homologue de Sec61 β de l'archée
SecG	Homologue de Sec61 β de la bactérie
SecYE β	Translocon de l'archée
SecYEG	Translocon bactérien
SERP1	Protéine du RE associée au Stress 1
SC_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SP_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SP	Signal Peptidase
SRP	Particule de Reconnaissance du Signal
SR	Récepteur du SRP
Ssh1	Sec Sixty-one Homolog
Sss1	Sec Sixty-one Suppressor 1
T	Thiamine
TA	Ancrée à la membrane par la queue
Tat	Translocation double-arginine
TMD	Domaine transmembranaire
TNG	Appareil <i>trans</i> -Golgi
TRAM	protéine Membranaire Associée à la chaîne de TRanslocation
U	Uracile
UPR	Réponse aux Protéines mal repliées
YL_Sec61 β	Homologue de Sec61 β de <i>Yarrowia lipolytica</i>
WT	Souche sauvage (Wild Type)

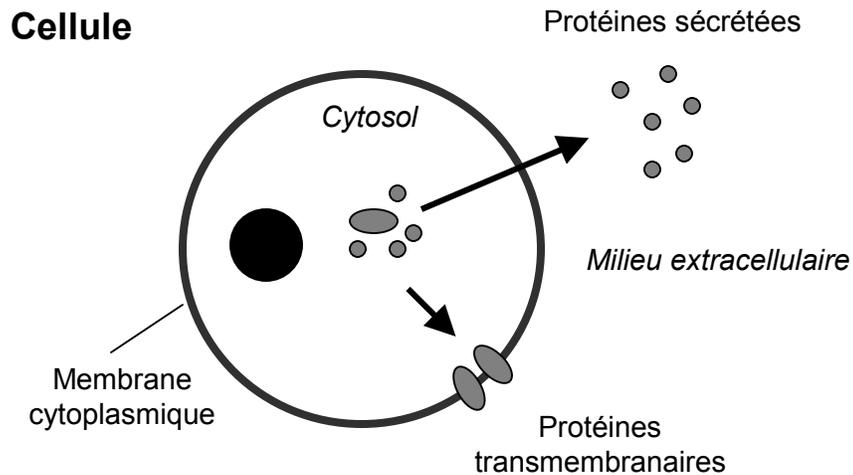
Chapitre I

Introduction

1.1 Problématique

Pour survivre, les êtres vivants doivent sécréter des protéines dans le milieu extracellulaire. Tous les règnes du vivant possèdent une voie de sécrétion, des organismes unicellulaires simples comme la bactérie aux organismes pluricellulaires complexes comme l'humain [1]. Chez l'homme, la voie de sécrétion est essentielle à de nombreuses fonctions métaboliques, dont la relâche de neurotransmetteurs pour la transmission de l'influx nerveux, l'expulsion de zymogènes pour la digestion, la sécrétion d'insuline pour la régulation de la glycémie, la production d'antigènes pour la défense immunitaire et la libération d'hormones pour la croissance cellulaire. Des perturbations de la voie de sécrétion sont la cause de plusieurs maladies, incluant certains diabètes, hémophilies, maladies neurodégénératives et cancers [2]. La voie de sécrétion est également requise pour la libération de toxines, allant du venin de scorpion aux exotoxines de l'anthrax. Les toxines sécrétées par les pathogènes sont la cause de maladies humaines dont le choléra, la diphtérie, le tétanos, la dysenterie et la gangrène gazeuse [3]. L'étude de la sécrétion permet de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter ces pathologies.

En outre, la sécrétion des protéines est également un processus primordial pour les biotechnologies. Depuis plus de 25 ans, différents microorganismes comme la bactérie *Escherichia coli* et la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont employés pour la production de protéines normalement absentes de ces organismes [4]. La production de protéines recombinantes par sécrétion a littéralement révolutionné le monde des composés pharmacologiques, qui incluent aujourd'hui l'érythropoïétine, les interférons et des vaccins, dont ceux de l'hépatite A et B. Les ventes de composés biopharmacologiques (de source cellulaire et exogène) ont atteint 60 milliards de dollars en 2005, tandis que le marché mondial est estimé à plus de 300 milliards [5]. Du côté industriel, les enzymes sécrétées sont utilisées notamment dans le traitement de la nourriture, du papier, des textiles et des détergents [6]. Dans ces conditions de haute compétitivité où les coûts de production sont un facteur déterminant, l'optimisation de la sécrétion des protéines peut avoir des conséquences majeures sur notre vie quotidienne. À ce titre, l'étude des composantes moléculaires qui limitent la vitesse de sécrétion est cruciale pour l'avenir des biotechnologies.



Fonctions des protéines transmembranaires et sécrétées humaines	Quantité
Canaux et récepteurs de la membrane cytoplasmique	135
Protéines de structure et d'adhésion	65
Immunoglobines	64
Facteurs de croissance, hormones et molécules de signalisation	54
Protéases et peptidases	52
Enzymes métaboliques diverses	40
Autres protéines transmembranaires	252
Autres protéines sécrétées	217
Total	879

Figure 1.1 La sécrétion des protéines

Certaines protéines cellulaires initialement synthétisées dans le cytosol sont sécrétées dans le milieu extracellulaire ou intégrées dans la membrane cytoplasmique. Une étude à large échelle réalisée par le SPDI (Secreted Protein Discovery Initiative) a permis d'identifier près de 900 protéines sécrétées chez l'humain [7]. Quelques exemples de fonctions de ces protéines sont présentées.

Parmi les médiateurs primordiaux du processus de sécrétion, on compte la sous-unité β du translocon, le large complexe responsable de l'entrée des protéines dans la voie. Malgré le fait qu'on trouve un homologue de cette protéine (Sec61 β) chez tous les êtres vivants séquencés à ce jour [1], sa fonction exacte demeure nébuleuse. L'objectif de mon projet de recherche est d'élucider le rôle de Sec61 β chez la levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe*, un organisme modèle eucaryote unicellulaire. Je souhaite aussi déterminer si la fonction de Sec61 β est conservée à travers les espèces et identifier le domaine structurel minimal qui sous-tend cette fonction. Dans l'introduction, je présente la voie de sécrétion et Sec61 β dans une perspective évolutive, en mettant l'emphase sur les différents rôles suggérés pour cette protéine.

1.2 La voie de sécrétion

Les organismes vivants sont compartimentés en différents espaces cellulaires séparés par des membranes, comportant chacun leur lot respectif de protéines spécifiques. Comme l'initiation de la synthèse protéique s'effectue dans le cytosol, la cellule doit déterminer dans quel compartiment chaque protéine doit être acheminée [8,9]. Lorsque les protéines sont transportées en dehors de la cellule, on dit que les protéines sont sécrétées. L'ensemble du processus cellulaire de transport de ces protéines est appelé « voie de sécrétion » (Figure 1.1). Outre les protéines destinées au milieu extracellulaire, la voie de sécrétion inclut également les protéines membranaires ainsi que les protéines des compartiments intermédiaires. En moyenne, on estime que de 10 à 30 % de toutes les protéines cellulaires transitent tôt ou tard par la voie de sécrétion [10].

1.3 La voie de sécrétion chez les procaryotes

Les procaryotes sont des êtres unicellulaires simples dépourvus de noyau, qui incluent les archées et les eubactéries. Les procaryotes sont très utilisés en recherche pour leur rapidité de croissance, leur simplicité d'utilisation, leur génome entièrement séquencé et la facilité avec laquelle on peut les manipuler génétiquement. Ainsi, il n'est pas surprenant de constater que les mécanismes de base du processus de sécrétion aient été élucidés en premier lieu chez la bactérie *E. coli*, au début des années 1980 [11].

Tableau 1. Nomenclature des sous-unités du translocon à travers les espèces

Organisme	Sous-unité α	Sous-unité β	Sous-unité γ	Translocon	
Bactéries	SecY	SecG	SecE	SecYEG	
Archées	SecY	Sec β	SecE	SecYE β	
Levures	1 ^{er} paraglogue	Sec61p	Sbh1p	Sss1p	Sec61
	2 ^e paraglogue	Ssh1p	Sbh2p	Sss1p	Ssh1
Eucaryotes pluricellulaires	Sec61 α	Sec61 β	Sec61 γ	Sec61 $\alpha\beta\gamma$	

Nomenclature simplifiée de la sous-unité β

<i>Antonospora locustae</i>	AL_Sec61 β
<i>Drosophila melanogaster</i>	DM_Sec61 β
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	EC_Sec61 β
<i>Gymnadenia conopsea</i>	GC_Sec61 β
<i>Homo sapiens</i>	HS_Sec61 β
<i>Kluyveromyces lactis</i>	KL_Sec61 β
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (1 ^{er} paraglogue)	SC_Sec61 β 1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2 ^e paraglogue)	SC_Sec61 β 2
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SP_Sec61 β
<i>Yarrowia lipolytica</i>	YL_Sec61 β

1.3.1 Identification des gènes impliqués dans la sécrétion

La voie générale de sécrétion bactérienne, aussi nommée « voie *sec* », assure le transport d'un cinquième de toutes les protéines cellulaires bactériennes [12]. Les protéines de la voie *sec* ont toutes un point en commun : elles possèdent une séquence signal (aussi appelée peptide signal), typiquement composée d'une longue région hydrophobe du côté N-terminal, qui permet la reconnaissance des protéines destinées à entrer dans la voie de sécrétion [13].

Afin d'identifier les gènes cruciaux de la voie de sécrétion bactérienne, différents criblages génétiques ont été entrepris [11]. Un premier criblage a permis d'identifier les mutations génétiques « *prl* » (*protein localisation*), qui permettent de corriger la mauvaise localisation de protéines possédant un peptide signal muté [14]. Un second criblage a permis d'identifier les gènes « *sec* », dont la mutation provoque des défauts généraux de sécrétion [15]. Les gènes *prl* et *sec* encodent les mêmes protéines, nommées SecA, SecE et SecY (Tableau 1). Ces trois protéines sont essentielles à la survie et constituent l'appareil minimum de sécrétion bactérien [16]. En poussant plus loin les recherches, d'autres criblages plus raffinés ont permis d'identifier des protéines de sécrétion accessoires, dont les principales sont SecB, SecD, SecF et SecG. En tout, plus de 17 protéines de la voie générale de sécrétion bactérienne ont ainsi pu être identifiées [12]. Le rôle de chacune de ces protéines a ensuite été élucidé par une approche biochimique.

1.3.2 L'appareil général de sécrétion bactérien

Lorsqu'une protéine de la voie *sec* est synthétisée par le ribosome, son peptide signal hydrophobe est exposé et reconnu par la chaperonine cytosolique SecB ou par le complexe SRP (Signal Recognition Particle) bactérien (Figure 1.2). Ces deux protéines compétitrices ont la même fonction : acheminer la protéine du cytosol à la membrane cytoplasmique. Dans la membrane, SecY, SecE et SecG forment un hétérocomplexe agissant comme « translocase de préprotéines » ou « translocon » [17]. Ainsi, le complexe SecYEG forme un canal de transport qui permet aux protéines en cours de synthèse de traverser la membrane lipidique, par un processus nommé « translocation ».

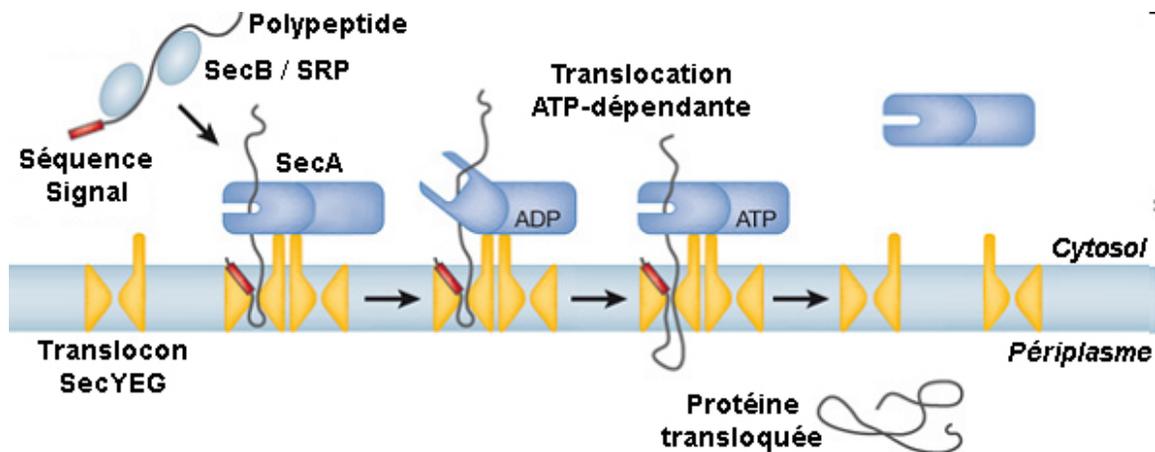


Figure 1.2 La voie générale de sécrétion bactérienne

Schéma adapté de (Rapoport *et al.*, 2007) [18] présentant les différentes étapes de la voie générale de sécrétion bactérienne. 1) Le polypeptide possédant une séquence signal N-terminale est reconnu par la chaperonine SecB ou le complexe SRP. 2) Le polypeptide est ciblé au translocon SecYEG, où il s'insère sous forme de boucle dans le canal. 3) SecA agit comme moteur protéique pour transloquer le polypeptide à travers le pore de translocation. 4) L'hydrolyse de l'ATP par SecA permet de pousser le polypeptide à travers le pore en déplaçant les domaines de liaison au substrat. 5) Une fois entièrement transloqué, le polypeptide est libéré dans l'espace périplasmique via le clivage de sa séquence signal par une Signal Peptidase.

L'énergie requise pour la translocation est fournie par SecA, qui agit comme moteur ATPase pour catalyser le passage des peptides à travers le canal formé par SecYEG [19]. De plus, un gradient électrochimique ($\Delta\mu\text{H}^+$) à travers la membrane favorise la translocation [20]. Enfin, SecD, SecE et YajC forment un deuxième complexe non essentiel à la translocation, mais important pour la croissance cellulaire [21]. Ce complexe, SecDFyajC, interagit avec SecYEG et intervient à différentes étapes de la translocation pour en augmenter l'efficacité [22]. Enfin, une fois que la protéine a été transloquée, une enzyme Signal Peptidase (LepB, LspA ou Ppp) vient cliver son peptide signal [23]. La protéine est ainsi sécrétée directement dans le milieu extérieur (bactéries gram positives) ou exportée dans le périplasme (bactéries gram négatives), avant d'être acheminée en dehors de la cellule. L'ensemble de ces étapes constitue la voie de sécrétion générale bactérienne. Il existe toutefois une seconde voie d'export indépendante du translocon, la voie de sécrétion Tat (Twin-arginine translocation) [24], ainsi que des voies de sécrétion alternatives, les systèmes de sécrétion de type I à VI [25,26].

1.3.3 La structure du translocon chez l'archée

Autrefois appelées archéobactéries, les archées sont des procaryotes qui se distinguent des eubactéries par leur biochimie, notamment au niveau de la membrane et de la répllication de l'ADN, les rendant plus proches des eucaryotes sous de nombreux aspects. Par exemple, contrairement aux bactéries, mais tout comme les eucaryotes, les archées sont dépourvues de l'ATPase SecA [27]. De plus, bien que l'archée présente un homologue de SecY et de SecE très conservé avec la bactérie, la troisième sous-unité du translocon ne présente que peu de similarité de séquence avec la protéine SecG bactérienne, mais une grande similarité avec l'homologue eucaryote. Pour cette raison, cette sous-unité est nommée Sec β chez l'archée au lieu de SecG, et le translocon est appelé SecYE β (Tableau 1).

Afin d'obtenir des informations sur le mécanisme général de translocation, des informations structurales sont requises. Pour ce faire, les différentes sous-unités du complexe peuvent être purifiées et visualisées par une technique de cristallographie ou de cryomicroscopie électronique (cryo-EM) en milieu lipidique. Chez *E. coli*, le translocon

SecYEG a été reconstitué par imagerie EM, mais à une faible résolution de 8 Å ne permettant pas d'identifier précisément chacun des domaines transmembranaires [28]. La difficulté a été surmontée en 2004 par le groupe de Tom A. Rapoport [29], qui a obtenu la structure cristallographique du complexe SecYE β de l'archée *Methanocaldococcus jannaschii* par diffraction aux rayons X à une résolution de 3,2 Å. La structure du translocon de l'archée se superpose presque parfaitement avec l'image EM bactérienne, suggérant que l'architecture du translocon est conservée. Ces données ont fourni plusieurs informations primordiales sur le rôle des trois sous-unités du translocon.

1.3.3.1 Structure de SecY

SecY est une protéine conservée de 50 kD composée de dix domaines transmembranaires. La protéine s'assemble en une structure de la forme d'un sablier, avec des extrémités larges en forme d'entonnoir et une cavité centrale (ou anneau) d'un diamètre de 3 Å [29] (Figure 1.3). Le sablier est composé de deux moitiés (TMDs 1-5 et 6-10) reliées par une région charnière, lui permettant de s'ouvrir sur le côté, ce qui forme une « porte latérale », permettant la relâche des protéines transmembranaires. En outre, le pore de translocation est entravé par une hélice alpha (TMD7) qui forme un domaine « bouchon » dans l'entonnoir inférieur, du côté périplasmique.

Alors qu'on pensait auparavant que le translocon était composé de plusieurs oligomères s'assemblant en un complexe d'ordre supérieur [30], l'analyse de la structure cristallographique de SecYE β suggère plutôt qu'un seul hétérotrimère de SecYE β est suffisant pour assurer la translocation des protéines. En effet, même si l'anneau de 3 Å est trop étroit pour permettre le passage de polypeptides, de nombreuses études suggèrent que la protéine SecY peut « s'ouvrir » suite à l'association de SecA, permettant à la fois de déplacer le domaine bouchon et d'agrandir l'anneau jusqu'à 5-8 Å [31]. Ceci est supporté par le fait qu'une cystéine introduite dans le domaine bouchon peut former un pont disulfure avec une cystéine de SecE normalement beaucoup trop éloignée (20 Å de distance dans la conformation fermée), uniquement durant la translocation [32]. De plus, un agrandissement de l'anneau est requis pour expliquer l'environnement aqueux dans le port de translocation, tel qu'observé par des études d'extinction de fluorescence [33].

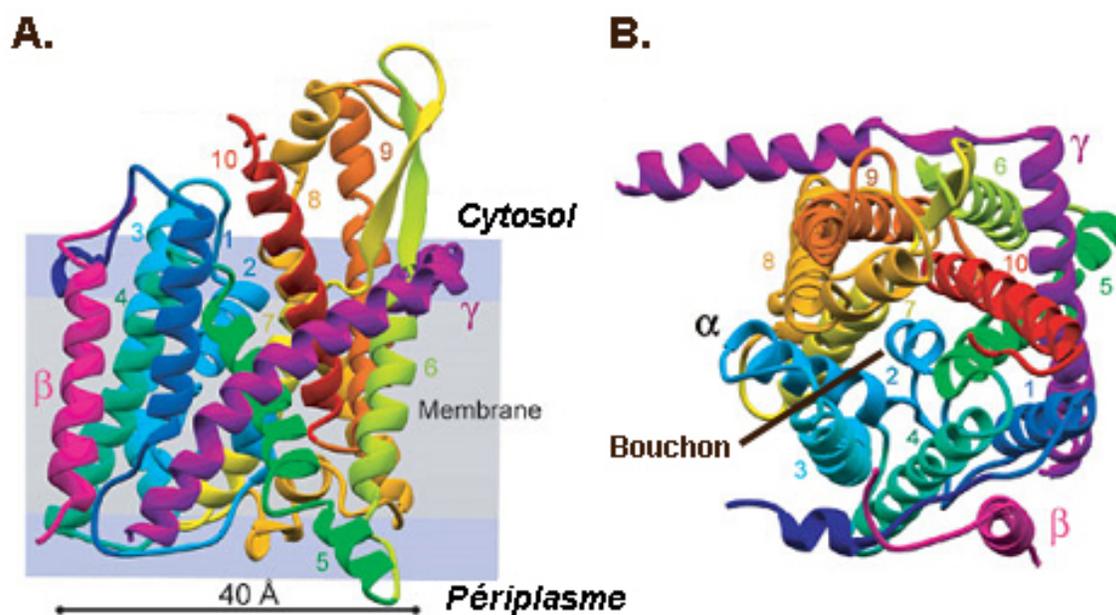


Figure 1.3 La structure du translocon

Schéma adapté de (Van den Berg *et al.*, 2004) [29] représentant la structure moléculaire du translocon de l'archée *Methanocaldococcus jannaschii* obtenue par cristallographie aux rayons X. **A.** Vue de côté du translocon. **B.** Vue de haut du translocon à partir du cytosol. Les domaines transmembranaires des trois sous-unités du complexe SecYE β sont numérotés et présentés de différentes couleurs. La sous-unité β est colorée en rose.

Une fois ouvert, le canal formé par le changement de conformation de SecY serait suffisamment large pour assurer le transport de polypeptides linéaires, d'hélices alpha déjà formées (comme les signaux peptidiques) et même de boucles d'acides aminés reliés par des ponts disulfure [34]. Toutefois, même si une seule protéine SecY forme le pore, la translocation est régulée par l'oligomérisation d'au minimum deux molécules de SecY. Ceci est dû au fait que l'association d'un SecY actif à un second SecY non-actif est nécessaire pour recruter SecA et transférer les protéines dans le pore [35].

1.3.3.2 Structure de SecE

Contrairement à SecY, SecE est une petite protéine de 8 kD qui ne comporte qu'un seul domaine transmembranaire. Son domaine N-terminal est situé du côté cytosolique, faisant de SecE une protéine de type « ancrée à la membrane par la queue » (tail-anchored, ou TA). Du point de vue structurel, SecE est composé de deux hélices. Le domaine N-terminal cytosolique forme une hélice amphipathique, avec sa partie hydrophobe orientée vers la membrane, s'associant au domaine C-terminal de SecY. Le domaine transmembranaire, quant à lui, forme une hélice inclinée à 35° dans la membrane qui vient relier ensemble les deux moitiés de SecY [29]. Le rôle présumé de SecE consiste à stabiliser le pore de translocation, grâce à ses multiples contacts avec SecY, empêchant de ce fait sa dégradation prématurée [36].

1.3.3.2 Structure de Secβ

La troisième sous-unité du complexe, Secβ, est la plus énigmatique du point de vue structurel. Tout comme SecE, Secβ est une petite protéine de 10 kD de type TA, mais qui n'est pas essentielle à la translocation en conditions normales. Le domaine N-terminal de Secβ est déstructuré et ne forme aucune interaction avec le pore [29]. Seul le domaine transmembranaire, perpendiculaire à la membrane, interagit faiblement avec SecY. L'interaction est cependant localisée en périphérie, et ne semble pas avoir de fonction évidente. Aucune interaction entre Secβ et SecE n'est observée chez l'archée, bien qu'une étude ait montré que l'homologue bactérien de Secβ, SecG, stabilisait des formes tronquées de SecE chez *E. coli* [37]. De façon intéressante, Secβ et SecG présentent très peu de similarité de séquence, mais leur structure semble néanmoins similaire. Par

exemple, même si SecE possède deux domaines transmembranaires, son second TMD est positionné et orienté de la même façon que chez l'archée [11]. Ceci suggère que cette sous-unité du translocon joue un rôle structurel conservé chez tous les procaryotes.

1.4 La voie de sécrétion chez les eucaryotes

Les eucaryotes se distinguent des procaryotes par la présence d'un noyau et de nombreux compartiments spécialisés séparés par des membranes, les organelles. L'étude de la voie de sécrétion eucaryote a été amorcée par les travaux pionniers de George Emil Palade, qui a déterminé les relations topologiques entre différents compartiments, comme l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (RE), et a posé les bases du transport vésiculaire [38] (Figure 1.4). Suite à ces travaux et aux découvertes faites chez la bactérie, différents groupes de recherche ont combiné leurs efforts pour caractériser cette voie fondamentale chez les organismes supérieurs. Outre les cellules humaines, la levure a fourni la contribution la plus importante à notre compréhension de la voie de sécrétion, en alliant les avantages génétiques des organismes unicellulaires à un système eucaryote complet et relativement facile à étudier.

1.4.1 Identification des gènes impliqués dans la sécrétion

Comme pour la bactérie, des criblages ont été entrepris chez la levure pour identifier les gènes impliqués dans la sécrétion. C'est ainsi que le groupe de Randy Schekman a identifié les premiers mutants *sec* eucaryotes, thermosensibles pour la sécrétion de phosphatase acide et d'invertase, des enzymes endogènes sécrétées de *S. cerevisiae* [39]. Parmi les premiers mutants identifiés, on compte *sec1-1* et *sec2-1*, des gènes codants pour des protéines de transport vésiculaire. À 37°C, ces mutants deviennent denses et lourds dû à l'accumulation de vésicules. Grâce à cette propriété, un enrichissement des mutants a pu être réalisé à l'aide d'un gradient de densité, permettant l'identification de nouveaux mutants *sec* [40]. Ces mutants ont été classés en 23 groupes de complémentation, correspondant à 23 gènes *sec* affectant le ciblage ou la fusion des vésicules à la membrane plasmique. Parallèlement, les travaux de Palade chez les mammifères ont défini les grandes étapes de la voie de sécrétion : entrée des protéines

dans le réticulum endoplasmique (RE), transport des protéines du RE vers l'appareil de Golgi, transport du Golgi aux vésicules et enfin des vésicules à la membrane extracellulaire [38]. Ces résultats ont été reproduits chez la levure *S. cerevisiae*, démontrant que la voie de sécrétion suit les mêmes étapes dans cet organisme [41]. Des criblages plus raffinés ont ensuite été entrepris pour identifier les gènes impliqués à chacune des étapes. Par exemple, en reproduisant l'approche de Oliver et Beckwith [15], qui avait permis l'identification des gènes SecA et SecB chez la bactérie, Deshaies et Scheckman [42] sont parvenus à identifier *SEC61* et *SEC62*, deux gènes primordiaux du processus de translocation eucaryote. En s'attaquant systématiquement à toutes les étapes de la voie de sécrétion, les travaux cumulés de différents groupes de recherche ont permis d'identifier plus de 100 gènes directement impliqués dans la sécrétion protéique. Pour la plupart, ces gènes trouvent leur homologue chez l'humain, témoignant de la conservation de la voie de sécrétion *sec*-dépendante [43]. En cumulant ces données brutes à des études biochimiques des protéines *sec*, la voie de sécrétion eucaryote a été peu à peu élucidée.

1.4.2 Reconnaissance des protéines de la voie de sécrétion

Toutes les protéines de la voie de sécrétion amorcent leur synthèse dans le cytosol. Un mécanisme de reconnaissance des précurseurs est donc nécessaire pour diriger les protéines vers leur destination finale [44]. À l'instar des procaryotes, c'est grâce à une structure particulière, le peptide signal, que ces précurseurs sont reconnus. Les signaux peptidiques sont toutefois beaucoup plus variables chez les eucaryotes, car ces derniers doivent diriger les protéines non seulement vers les organelles de la voie de sécrétion, mais aussi le noyau, la mitochondrie et le chloroplaste [45].

Le peptide signal qui permet le ciblage vers la voie de sécrétion est caractérisé par un domaine N-terminal polaire chargé positivement, qui facilite son interaction avec les phospholipides de la membrane, d'un domaine H formant une hélice α hydrophobe, reconnue par la machinerie de translocation, et d'un domaine C-terminal contenant un site de clivage pour la Signal Peptidase [46]. Ces trois domaines présentent presque toujours les mêmes caractéristiques physiques et sont souvent interchangeable d'une espèce à l'autre, même s'ils varient considérablement en termes de séquence [47,48].

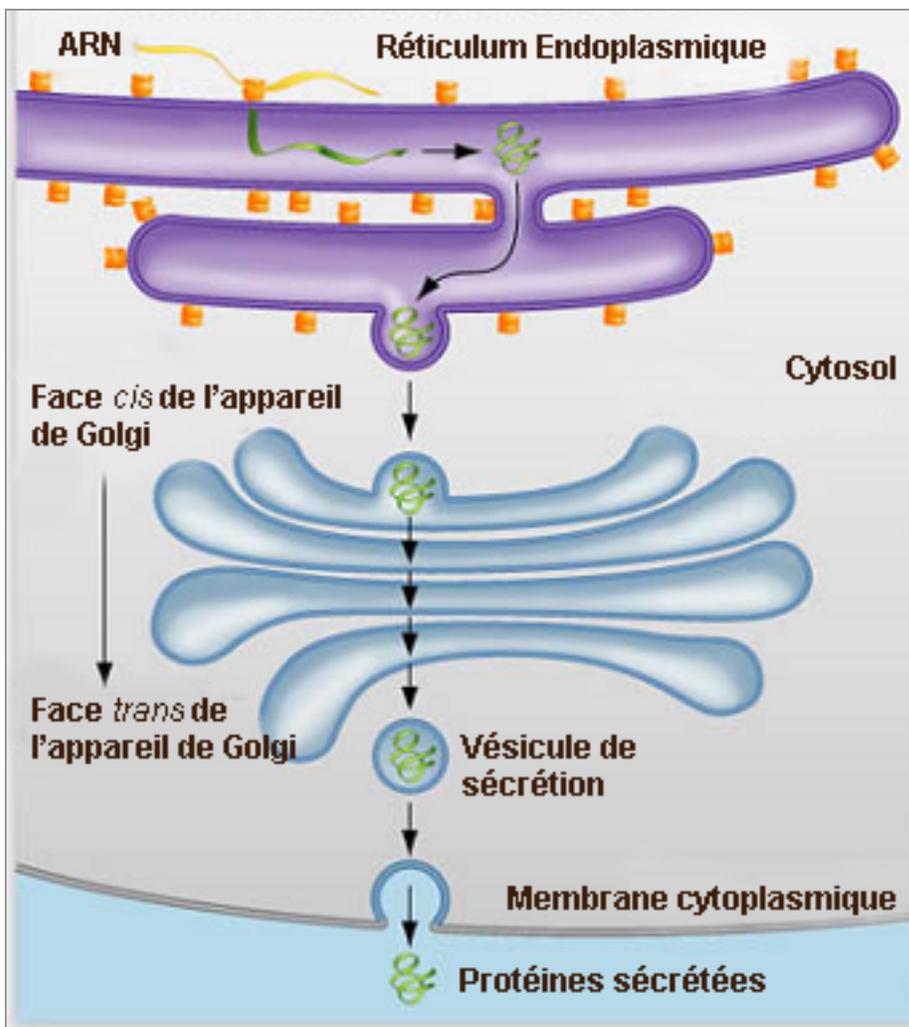


Figure 1.4 La voie de sécrétion eucaryote

Schéma adapté d'une image du Collège des Arts et des Sciences de l'Université de Miami [49] présentant les différentes étapes de la voie de sécrétion eucaryote. 1) Les protéines de sécrétion sont traduites par le ribosome et transloquées dans le réticulum endoplasmique (RE) via le translocon. 2) Les protéines sont maturées dans le RE et empaquetées dans des vésicules. 3) Les protéines sont dirigées vers l'appareil de Golgi où elles terminent leur maturation. 4) Les protéines entrent dans des vésicules de sécrétion et sont ciblées vers leur localisation finale. 5) Les vésicules de sécrétion fusionnent à la membrane plasmique grâce au complexe exocyste et sont relâchées dans le milieu extracellulaire.

1.4.3 Ciblage des protéines au réticulum endoplasmique

Chez les eucaryotes, les protéines de la voie de sécrétion commencent leur périple dans un organelle particulier, le réticulum endoplasmique (RE) [38]. Le RE est constitué d'un réseau labyrinthe de tubules topologiquement distincts du cytosol séparés de ce dernier par une membrane lipidique. Le ciblage des protéines de la voie de sécrétion vers le RE s'effectue de deux façons : la voie dépendante de SRP, qui assure le ciblage des protéines avant que leur synthèse ne soit complétée, et la voie indépendante de SRP, qui assure le ciblage post-traductionnel des protéines.

1.4.3.1 Ciblage dépendant de SRP

Lorsque le peptide signal émerge du ribosome, il est reconnu par un complexe riboprotéique nommé SRP (Signal Recognition Particle) [50,51]. Chez les mammifères, le complexe SRP est constitué d'un ARN 7S et de 6 protéines [52]. Parmi celles-ci, la protéine SRP54 joue un rôle critique en s'associant directement au peptide signal, ce qui entraîne l'arrêt de la traduction [53]. Le ribosome est ensuite acheminé vers la membrane du RE où le complexe SRP est reconnu par un récepteur membranaire, nommé SR (SRP receptor). Le SR est composé d'un hétérodimère de SR α , une GTPase associée à la membrane, et de SR β , une GTPase transmembranaire [54]. Lorsque le complexe SRP est reconnu par le SR, le peptide signal est transféré du ribosome au translocon par une cascade d'hydrolyse du GTP [55]. Ceci permet la reprise de la synthèse protéique couplée à la translocation à travers la membrane du RE.

1.4.3.2 Ciblage indépendant de SRP

Un mécanisme indépendant de SRP permet également de cibler les protéines au RE. Dans cette voie de ciblage, les séquences hydrophobes sont reconnues par des chaperones du cytosol, comme Hsp70 et TriC/CCT [56]. Contrairement à la voie dépendante de SRP, cette interaction n'arrête pas la synthèse protéique, qui se poursuit normalement. Par contre, les chaperones ralentissent la maturation de la protéine et la maintiennent dans un état suffisamment déroulé pour permettre sa translocation [57,58]. La protéine associée aux chaperones est ensuite reconnue par un récepteur membranaire

associé au translocon, le complexe Sec62/Sec63, qui permet l'initiation de la translocation. Bien que la voie de ciblage post-traductionnelle existe chez tous les eucaryotes, elle est prépondérante surtout chez les eucaryotes unicellulaires, notamment la levure *S. cerevisiae*, où la délétion de SRP n'est pas létale, contrairement aux mammifères [59,60,61].

1.4.3.3 Ciblage des protéines transmembranaires

Comme les protéines sécrétées, les protéines transmembranaires transitent aussi dans le RE. On distingue différents types de protéines transmembranaires, selon l'orientation qu'elles adoptent dans la membrane [62]. Les protéines de type I ont leur domaine N-terminal du côté luminal et leur domaine C-terminal du côté cytosolique, alors que c'est l'inverse pour les protéines de type II. Les protéines à multiples domaines transmembranaires (TMD) sont classifiées de façon analogue, selon l'orientation du premier TMD. Dans la grande majorité des cas, le ciblage des protéines transmembranaires de type I, II ou à multiples TMDs est dépendant de SRP [63]. Par contre, les protéines de type II ancrées par la queue (TA), comme les sous-unités β et γ du translocon, sont insérées par un mécanisme différent, nécessitant l'ATPase cytosolique TRC40/Asn1 chez les mammifères, homologue du complexe GET (Golgi ER trafficking) chez *S. cerevisiae* [64,65].

1.4.4 Translocation des protéines

Les protéines de la voie de sécrétion doivent entrer dans la lumière du RE pour amorcer leur périple vers le milieu extracellulaire. Comme les protéines sont incapables de traverser spontanément la membrane lipidique de cet organelle, ce passage requiert un transport actif, la translocation [18]. À ce titre, le RE est topologiquement similaire à la membrane cytoplasmique des bactéries, et par homologie, on nomme « translocon » le complexe de translocation du RE. Il existe deux types de translocation, selon la façon dont les protéines ont été ciblées à la membrane : la translocation co-traductionnelle, (dépendante de SRP) et la translocation post-traductionnelle (indépendante de SRP). Dans les deux cas, le même translocon est employé, soit le complexe Sec61 $\alpha\beta\gamma$ (le translocon est détaillé dans la section 1.5 du mémoire).

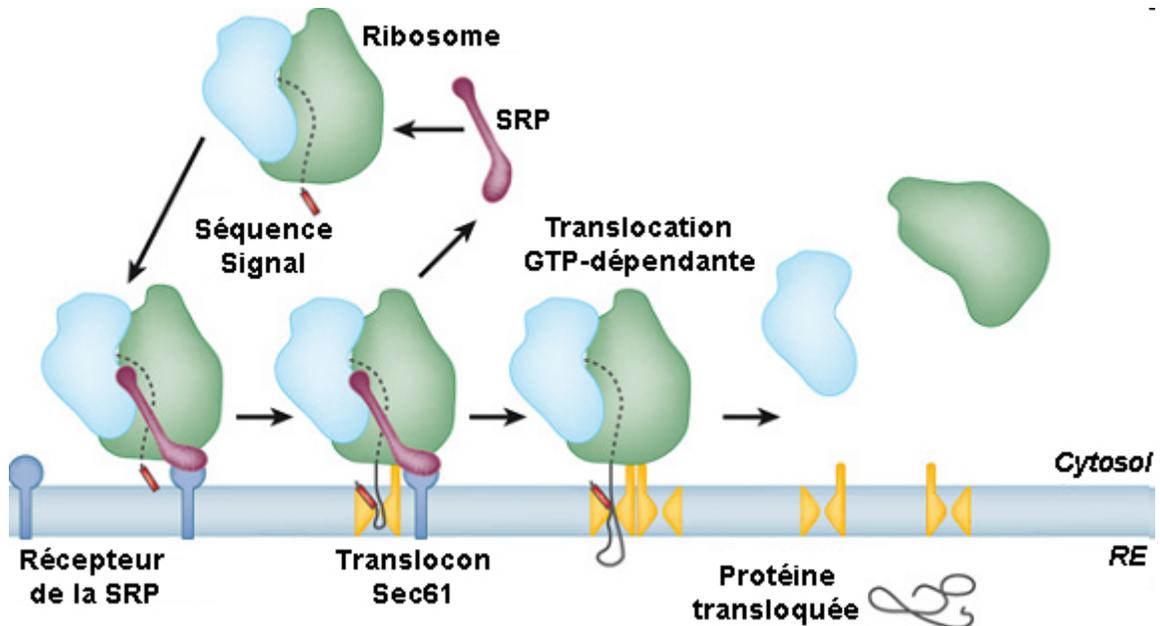


Figure 1.5 La translocation co-traductionnelle chez les eucaryotes

Schéma adapté de (Rapoport *et al.*, 2007) [18] présentant les différentes étapes de la translocation co-traductionnelle. 1) Le peptide signal est reconnu par le complexe SRP (marqué en mauve) dès qu'il émerge du ribosome, ce qui arrête temporairement la traduction. 2) Le SRP s'associe à son récepteur membranaire (en bleu foncé) au RE et transfère le peptide signal au translocon Sec61 $\alpha\beta\gamma$ (en jaune). 3) La translocation s'effectue co-traductionnellement à travers le pore de translocation. 4) Lorsque la protéine est entièrement traduite, les deux sous-unités du ribosome (bleue et verte) se dissocient et la protéine transloquée est relâchée dans la lumière du RE suite au clivage de son peptide signal par le complexe Signal Peptidase.

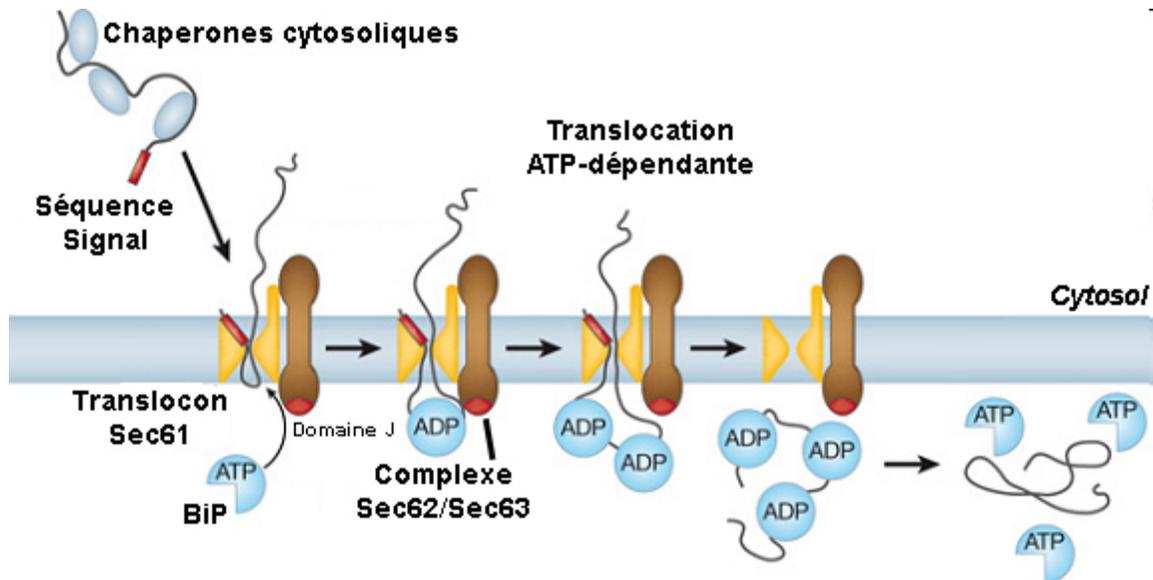


Figure 1.6 La translocation post-traductionnelle chez les eucaryotes

Schéma adapté de (Rapoport *et al.*, 2007) [18] présentant les différentes étapes de la translocation post-traductionnelle. 1) La protéine est entièrement traduite dans le cytosol et s'associe aux chaperones cytosoliques Hsp70 et TriC/CCT, qui la maintiennent sous forme linéaire. 2) Le polypeptide s'associe au complexe Sec62/Sec63 (marqué en brun), qui le transfère au translocon Sec61 $\alpha\beta\gamma$ (en jaune). 3) À mesure qu'il émerge dans la lumière du RE, le polypeptide transloqué s'associe à la chaperone BiP (en bleue) de façon ATP-dépendante, ce qui empêche son retour en arrière. 4) Une fois totalement transloquée et repliée, la protéine mature est libérée de l'emprise des chaperones lumineuses.

1.4.4.1 Translocation co-traductionnelle

La translocation co-traductionnelle permet l'entrée des protéines dans le RE au fur et à mesure qu'elles sont traduites (Figure 1.5). Cette voie est dépendante du complexe SRP, qui cause l'arrêt de la traduction suite à la reconnaissance du peptide signal, et achemine le ribosome au translocon. La liaison du SRP à son récepteur SR permet le transfert du polypeptide directement dans le pore, une étape stabilisée par de nombreuses interactions ribosome-translocon [66]. Lorsque la synthèse protéique reprend, la protéine émerge directement à l'intérieur du pore de translocation. À ce stade, l'hydrolyse du GTP est nécessaire pour l'élongation de la chaîne protéique par le ribosome, mais la translocation comme telle ne requiert pas d'énergie [55]. Lorsque la protéine a été entièrement transloquée dans le RE, le ribosome est désassemblé et un nouveau complexe peut venir s'associer au translocon. Ce mode de translocation est prédominant chez la plupart des eucaryotes pluricellulaires.

1.4.4.2 Translocation post-traductionnelle

Les protéines qui ne sont pas reconnues par le complexe SRP complètent leur synthèse dans le cytoplasme et s'associent à des chaperones cytosoliques. Un second mécanisme de translocation indépendant du ribosome et de SRP est alors requis pour transporter ces protéines post-traductionnellement (Figure 1.6). Pour y parvenir, la protéine est reconnue par un complexe multimérique transmembranaire associé au translocon, nommé Sec62/Sec63. L'association à ce complexe induit la relâche des chaperones cytosoliques, ce qui permet l'insertion de la protéine dans le pore [67]. Une fois dans le canal de translocation, le polypeptide se déplace aléatoirement par mouvement Brownien, mais aussitôt qu'il émerge dans le RE, il est reconnu par la chaperone luminale BiP (Binding Protein) [68]. Cette chaperone essentielle possède une faible spécificité de substrat, lui permettant de s'associer à n'importe quelle chaîne en voie d'élongation. La forme active « ouverte » de BiP, liée à l'ATP, est recrutée au translocon par le domaine J de Sec63p [69]. Ce domaine catalyse l'hydrolyse de l'ATP au niveau du translocon afin que BiP puisse se refermer autour de son substrat. La capture du polypeptide par BiP empêche le retour du polypeptide dans le cytosol,

assurant un mouvement unidirectionnel vers le RE. Lorsqu'une nouvelle section de polypeptide surgit du translocon, une seconde molécule de BiP vient s'associer, et ainsi de suite jusqu'à la translocation complète de la protéine. Finalement, BiP aide également au repliement du polypeptide, si bien que ce n'est qu'après que la protéine ait adopté sa conformation mature qu'elle est relâchée dans le RE, suite à l'échange de l'ADP par un ATP, qui provoque l'ouverture de BiP.

1.4.4.3 Translocation des protéines transmembranaires

Les protéines transmembranaires doivent quitter le pore de translocation pour être intégrées dans la membrane lipidique. Ceci est rendu possible grâce à la « porte latérale » de la sous-unité α du translocon (homologue de SecY) [29]. En effet, lors de la translocation, la porte latérale s'ouvre et se referme continuellement, exposant le polypeptide au milieu lipidique [70]. Si la chaîne d'acides aminés est suffisamment longue et hydrophobe, comme c'est le cas pour un TMD, son intégration membranaire est possible par simple partition entre milieu aqueux et lipide [71]. Si une protéine possède plusieurs TMDs, chaque domaine hydrophobe est intégré indépendamment des autres [72]. Un renversement d'orientation est même possible pour les protéines de type II et certains TMDs particuliers [70]. Le processus d'insertion membranaire des TMDs s'effectue lentement [73], mais peut être aidé par des protéines accessoires, comme TRAM. Cette protéine agit comme une chaperone membranaire pour stabiliser les TMDs peu hydrophobes, le temps qu'ils puissent quitter le pore [74]. Les TMDs agissent également comme des signaux peptidiques « stop » pour arrêter la translocation. Les régions non-transloquées complètent quant à elles leur traduction en dehors du translocon et forment les domaines cytosoliques des protéines transmembranaires [75].

1.4.5 Maturation des protéines dans le RE

La translocation des protéines à travers le translocon requiert la linéarisation des protéines sous forme d'une longue chaîne d'acides aminés. Or, pour que les protéines puissent accomplir leur fonction métabolique, elles doivent adopter une structure tertiaire particulière, souvent globulaire, composée de nombreux domaines et motifs structuraux [76]. De plus, les protéines sécrétées sont souvent modifiées de façon post-

traductionnelle, que ce soit par le clivage d'un précurseur, par l'addition de polysaccharides, par l'ajout d'une ancre glycoposphatidylinositol (GPI) ou encore par la formation de ponts disulfure [77]. Le processus par lequel les polypeptides émergent du translocon adoptent leur conformation finale est appelé « maturation des protéines ». Cette étape est critique dans le RE, car l'environnement de cet organelle, topologiquement similaire au milieu externe, est très différent du cytoplasme en termes de concentration ionique et de conditions oxydoréductrices [78].

1.4.5.1 Modifications covalentes des protéines

La séquence signal nécessaire pour le ciblage des protéines au RE ne fait pas partie de la protéine mature, et doit donc être excisée. Le clivage du peptide signal est effectué co- ou post-traductionnellement par un large complexe de la membrane interne du RE, la Signal Peptidase (SP) [79]. La SP est composée de nombreuses sous-unités, chacune interagissant à différents degrés avec le translocon [80].

Un autre large complexe protéique est situé à proximité du translocon et intervient sitôt les protéines transloquées : l'oligosaccharide transférase (OST) [81]. L'OST modifie environ 70 % des protéines émergentes en ajoutant des N-glycosylations sur le site consensus Asn-X-Ser/Thr des protéines. Cette réaction implique le transfert d'une chaîne d'oligosaccharides riche en mannose à partir d'un transporteur dolichol-pyrophosphate jusqu'au site accepteur du polypeptide émergent, suivi du clivage de trois résidus glucose par les glucosidases I et II [82]. La N-glycosylation ainsi formée est primordiale pour de nombreuses protéines, en affectant leur repliement, leur ciblage, leur spécificité, leur dégradation, etc. [83]. Chacune des neuf protéines de l'OST interagit avec une ou plusieurs sous-unités du translocon eucaryote [84], suggérant que ce complexe fait partie intégrante de l'appareil de translocation co-traductionnelle.

Enfin, certaines protéines sont modifiées par l'ajout d'une ancre GPI [85]. Cette modification est effectuée par le remplacement du domaine transmembranaire C-terminal accepteur (ω) de la protéine par une ancre GPI pré-formée. La réaction est catalysée par un complexe transamidase peu caractérisé. Les ancres GPI permettent l'attachement des protéines à la membrane tout en modifiant leurs propriétés physiques. Elles sont

nécessaires entre autres pour faciliter la transduction de signaux ou encore pour cibler les protéines à des endroits précis, comme la membrane apicale des cellules polarisées [86].

1.4.5.2 Repliement des protéines

D'autres modifications post-traductionnelles des protéines du RE ont pour but d'accélérer leur repliement tridimensionnel. Par exemple, l'isomérisation *cis* vers *trans* des prolines, une étape thermodynamique défavorisée [87], est catalysée par une classe de protéines nommée PPI (peptidyl-proline isomérases), qui assurent une rotation rapide et efficace de l'axe X-Pro [88]. Similairement, les protéines disulphide isomérases (PDI) catalysent la formation des ponts disulfure par liaison covalente des groupements thiol de deux cystéines [89], une réaction d'oxydoréduction nécessaire à l'adoption d'une structure ternaire ou quaternaire fonctionnelle. Les PPI et les PDI sont essentielles à la survie et agissent de façon synergique pour assurer la maturation rapide des protéines [90,91,92].

Enfin, d'autres protéines, appelées chaperones, assistent le repliement protéique dans le RE en empêchant la formation d'agrégats insolubles [93]. Cette batterie de chaperones, incluant notamment Grp94, la calnexine et BiP, s'associent aux protéines en voie de repliement dans le but de restreindre leur contact avec les autres protéines du RE et favoriser l'adoption de leur structure native [94]. L'action des chaperones du RE est en étroite relation avec le translocon, car ces dernières doivent intercepter les protéines transloquées immédiatement à leur arrivée dans la lumière du RE. Des interactions directes entre des sous-unités du translocon et des chaperones, notamment BiP et la calnexine, ont d'ailleurs été rapportées [95,96]. Enfin, les chaperones s'associent aussi aux foldases comme PDI et PPI pour former un large complexe multiprotéique associé au translocon [97].

1.4.5.3 Contrôle de qualité dans le RE

Malgré la présence de tous les facteurs favorisant le repliement, il arrive que des protéines soient incapables d'adopter leur conformation mature. Ces protéines ne sont pas transportées dans la voie de sécrétion, car elles risqueraient d'entraver le fonctionnement

de la cellule. La cellule possède un système de tri, ou « contrôle de qualité » (QC), dont le fonctionnement repose largement sur les chaperones du RE, qui permet de reconnaître les erreurs de repliement et de les corriger. Le QC est un processus multifactoriel complexe, qui agit à la fois de façon globale et spécifique pour certaines protéines. Parmi les systèmes de QC les plus connus, on compte le cycle de la calnexine/calreticuline (revue dans [98]). Ce système maintient les protéines incorrectement repliées dans le RE grâce à un cycle de glycosylation / déglycosylation couplé à des interactions lectines. La cellule s'assure ainsi que seules les protéines natives pourront poursuivre leur route dans la voie de sécrétion.

1.4.6 Transport vésiculaire

Les différents compartiments cellulaires de l'appareil de sécrétion eucaryote ne sont pas contigus, si bien que la cellule doit utiliser un système de transport par cargo pour envoyer les protéines d'un organelle à l'autre. Ainsi, le trafic de toutes les protéines de la voie de sécrétion est réalisé par l'intermédiaire de petites unités membranaires sphériques appelées vésicules. Le transport vésiculaire constitue l'outil de transport principal pour délivrer dans chaque compartiment son lot de protéines, de lipides et de molécules de signalisation [99].

1.4.6.1 Exportation vers l'appareil de Golgi

Les protéines du RE qui ont traversé le système de contrôle de qualité se rendent jusqu'aux « sites de sortie du RE », ou RE de transition, par flux de masse [100]. À cet endroit, les protéines forment un cargo qui est emmagasiné dans des vésicules bourgeonnantes adjacentes à un réseau membranaire tubulaire complexe, appelé ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment). Le bourgeonnement est accompli grâce à des GTPases de la famille des ARF/SAR et un recouvrement protéique de type COPII [101]. Des récepteurs protéiques de la famille des SNARE, quant à eux, assurent la spécificité de livraison [102]. Les vésicules sont ainsi acheminées le long des microtubules vers un second organelle, l'appareil de Golgi. À ce niveau, la vésicule fusionne avec la membrane du compartiment pré-Golgi pour libérer son contenu protéique [103].

L'appareil de Golgi est un organelle permettant la maturation des protéines, notamment par l'ajout d'une panoplie de glycosylations spécifiques. Il est composé d'une région *cis*, d'une région médiane et d'une région *trans*. Le Golgi sert également de machine à trier les protéines selon leur destination finale [104]. Le tri est réalisé grâce à la présence d'un « code postal » constitué de motifs structuraux précis sur les protéines [105]. Par exemple, les protéines du RE ont un motif KDEL ou KKXX qui leur permet de revenir dans leur organelle d'origine par transport rétrograde COPI-dépendant [106]. Les autres protéines sont triées dans l'appareil *trans*-Golgi (TNG) [107].

1.4.6.2 Exportation vers des compartiments post-Golgi

Les protéines destinées aux lysosomes, aux endosomes, aux granules de sécrétion et à des localisations membranaires particulières, comme la membrane apicale des cellules polarisées, possèdent toutes un code postal protéique particulier [108]. Dans le TNG, ces motifs structuraux interagissent avec des complexes hétérotétramériques de la famille des AP [109]. Les AP concentrent les protéines cibles dans des vésicules en s'associant à la clathrine, une protéine en forme de triskèle dont l'oligomérisation provoque la formation d'une structure polyédrique qui entoure la vésicule [110]. Le transport vésiculaire vers les différents compartiments se fait de façon analogue au transport ER-Golgi, c'est-à-dire le long des microtubules, avec des SNARE spécifiques pour assurer la fusion au bon compartiment [111]. Un transport rétrograde dépendant de la clathrine est également possible, par exemple au cours de l'endocytose, le processus qui permet d'internaliser des éléments du milieu extérieur [112].

À l'inverse, les protéines destinées au milieu extracellulaire ou à la membrane cytoplasmique n'ont souvent pas besoin de code postal : elles empruntent la voie de sécrétion canonique par défaut. Néanmoins, l'exocytose de certaines classes de vésicules requiert l'action d'un complexe protéique particulier de la membrane plasmique, appelé exocyste [113]. Le complexe exocyste est composé de dix protéines, dont six protéines *sec* (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10p et Sec15p). Sa fonction consiste à attacher les vésicules à la membrane juste avant l'interaction des SNARE menant à la fusion vésiculaire [114]. Étonnamment, le complexe exocyste interagit de façon fonctionnelle et

physique avec le translocon, liant ainsi les deux extrémités de la voie de sécrétion [115,116]. Il a été suggéré que cette relation translocon-exocyste permettait une boucle de régulation, assurant que le niveau de translocation soit toujours proportionnel au niveau d'exocytose [115].

1.4.7 Problèmes de la voie de sécrétion

Il arrive que les cellules soient confrontées à des stress extracellulaires ou intracellulaires qui entraînent une surcharge de la voie de sécrétion, généralement au niveau du RE [117]. La cellule s'adapte alors au stress à l'aide de deux principales voies de défense : la réponse aux protéines mal repliées (UPR) et la dégradation protéique associée au RE (ERAD). Ces deux voies sont intrinsèquement reliées au translocon.

1.4.7.1 La réponse UPR

La réponse UPR est induite quand un stress vient perturber le fonctionnement normal du RE (choc thermique, virus, protéine mutante, etc.) [118]. Ces perturbations entraînent l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE, entraînant la formation d'agrégats toxiques. Dans ces circonstances, différents « senseurs de stress » transmembranaires, nommés IRE1, PERK et ATF6 chez les mammifères, sont activés et déclenchent une cascade de signalisation menant à une réponse transcriptionnelle et traductionnelle [119]. La réponse UPR agit à plusieurs niveaux : d'abord, en diminuant la synthèse protéique globale, et ensuite, en augmentant la synthèse de chaperones moléculaires du RE (BiP, PPI, PDI, etc.) [120]. Généralement, la combinaison de ces deux approches permet de rétablir l'homéostasie du RE en diminuant la charge protéine une fois le stress terminé. Toutefois, si le stress se prolonge, la réponse UPR peut également déclencher la mort cellulaire programmée (apoptose) [121].

La réponse UPR est reliée au translocon par de multiples interactions fonctionnelles. Ainsi, certaines protéines induites ou nécessaires durant un stress du RE, comme la protéine SERP1/RAMP4 et la chaperone BAP31 (également impliquée dans la rétrotranslocation) forment un complexe physiquement associé à certaines sous-unités du translocon [122,123].

1.4.7.2 La rétrotranslocation et le ERAD

Il arrive que certaines protéines du RE soient totalement incapables de se replier correctement, à cause d'une mutation ou de l'absence d'un co-facteur. Dans de telles conditions, la seule solution pour la cellule consiste à éliminer ces protéines par un processus appelé ER-associated degradation (ERAD). Toutefois, comme la machinerie de dégradation protéique (le système ubiquitine-protéasome) est située dans le cytoplasme, les protéines destinées à la dégradation doivent traverser en sens inverse le pore de translocation, par un processus nommé rétrotranslocation [124] (Figure 1.7).

Dans la majorité des cas, la reconnaissance des protéines luminales irrémédiablement mal repliées est effectuée via une modification lente de leur N-glycan, réalisée par une α -mannosidase du RE [125]. Le polysaccharide ainsi formé est alors reconnu par une lectine particulière, appelée EDEM, qui les retire du système de contrôle de qualité et les achemine au translocon [126]. À ce niveau, une lectine transmembranaire, Yos9p, agit comme gardien pour sélectionner les protéines qui doivent être rétrotransloquées [127]. Yos9p fait partie du large complexe Hrd1, responsable de l'initiation de la rétrotranslocation [128]. Certaines sous-unités du complexe, comme Hrd3p et BiP, peuvent également reconnaître indépendamment les protéines mal repliées, par exemple celles qui n'ont pas de N-glycosylation [129]. En association avec une batterie de co-facteurs, ces protéines assurent la rétrotranslocation à travers le pore formé par la sous-unité α du translocon, par un mécanisme qui n'est pas très bien connu. Néanmoins, on sait que l'énergie nécessaire est fournie par le complexe Cdc48/p97, composé d'une AAA adénosine triphosphatase et de co-facteurs cytosoliques [130]. À mesure que le polypeptide émerge dans le cytosol, ce dernier est polyubiquitiné par l'action séquentielle d'une enzyme d'activation (E1), de conjugaison (E2) et de liaison (E3) de l'ubiquitine couplé à l'action de Cdc48/p97. Suite à la polyubiquitination, le polypeptide est reconnu et dégradé par la machinerie du protéasome 26S [131]. Quant aux protéines membranaires mal repliées, elles peuvent également être dégradées par une variante du ERAD appelée ERAD-C (pour les domaines cytosoliques) ou ERAD-M (pour les domaines transmembranaires), requérant des complexes Hrd alternatifs [124]. Néanmoins, on ignore de quelle manière les protéines sont extraites de la membrane.

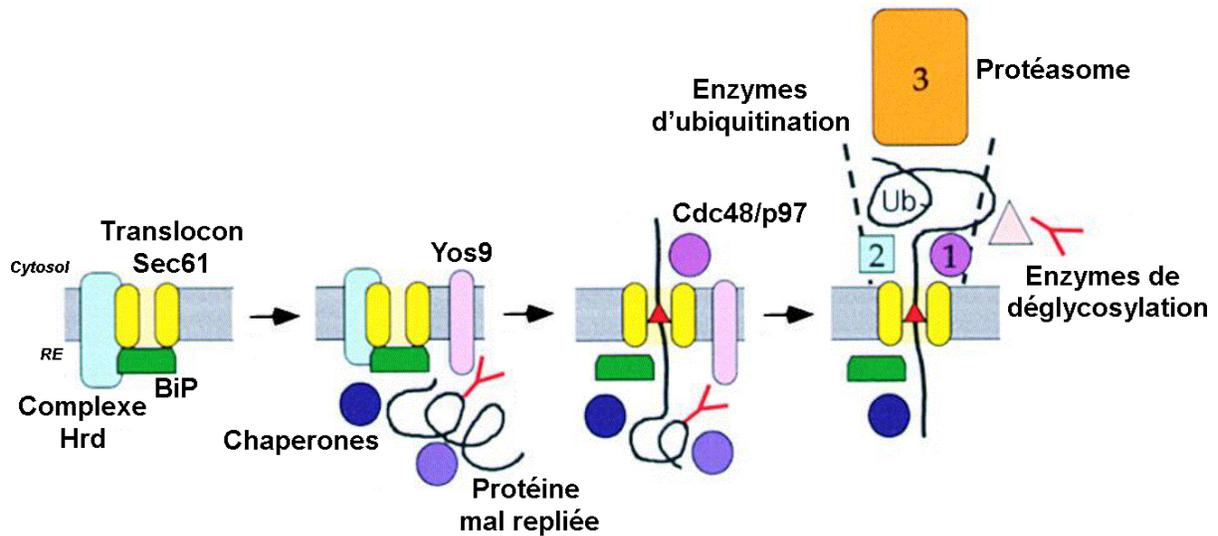


Figure 1.7 La rétrotranslocation des protéines

Schéma adapté de (Johnson *et al.*, 2000) [132] présentant les différentes étapes de la rétrotranslocation des protéines. 1) Les protéines mal repliées sont reconnues par des chaperones (BiP, EDEM, marquées en vert) et ciblées au complexe de rétrotranslocation Hrd (en bleu pâle). 2) Les protéines sont reconnues par la lectine Yos9p (en rose) qui les transfère dans le canal formé par Sec61 $\alpha\beta\gamma$ (en jaune). 3) Du côté cytosolique, le complexe Cdc48/p97 (en mauve) agit comme moteur de rétrotranslocation en extrayant les protéines du pore. 4) Sitôt dans le cytosol, les protéines sont ubiquitinées et déglycosylées par une batterie de protéines et de chaperones. 5) Les protéines ubiquitinées sont finalement dégradées par le protéasome 26S (en orange).

1.5 Le translocon eucaryote

Dans les années 1975, le groupe de Bernhard Dobberstein a émis l'hypothèse que les protéines de la voie de sécrétion intégraient le RE par un pore aqueux formé de protéines transmembranaires [133]. Il a cependant fallu attendre les années 1990 pour que l'implication d'un complexe protéique membranaire dans la translocation soit démontrée. En 1986, le terme «translocon» a été suggéré pour la première fois par Walter et Lingappa [134]. Aujourd'hui, le translocon est l'une des machines moléculaires de transportation des protéines les plus étudiées du RE, en tant qu'unique gardien de la frontière entre le cytosol et le RE.

1.5.1 Composantes du translocon

Les protéines du translocon ont été identifiées en un premier temps par des expériences de pontage avec des sondes photoréactives, placées à différents endroits dans le polypeptide en voie de translocation [135,136]. Lorsque la membrane du RE était soumise à des rayons photolysants, la protéine était spécifiquement pontée aux protéines du translocon situées à proximité. Les composantes du translocon ont ensuite été purifiées, puis l'activité translocase a été reconstituée *in vitro* dans des liposomes, démontrant que ce complexe constituait l'appareil minimal de translocation [137,138]. Trois sous-unités du translocon eucaryote ont ainsi été identifiées : Sec61 α , Sec61 β et Sec61 γ , homologues des trois sous-unités du translocon bactérien découvertes en parallèle, SecY, SecE et SecE, respectivement (Tableau 1).

1.5.1.1 La sous-unité α

Lorsqu'une protéine en voie de translocation se trouve au niveau de la membrane du RE, elle peut être pontée à une seule protéine du translocon [139]. C'est donc cette sous-unité qui entoure le polypeptide et forme le canal de translocation. La protéine a été nommée Sec61 α à cause de son homologie à Sec61p (identique à 56 %), une protéine découverte chez la levure *S. cerevisiae* lors d'un criblage de mutants de sécrétion [140,141]. Dans cet organisme, le gène *SEC61* est essentiel à la survie, et des allèles mutantes thermosensibles de *SEC61* présentent des défauts majeurs de translocation et

accumulent des précurseurs protéiques dans le cytosol [42]. Sec61 α est également très similaire à SecY, la protéine bactérienne qui constitue le pore de translocation [1]. Tout comme SecY, Sec61 α est une protéine de 50 kD possédant dix régions hydrophobes conservées encodant des domaines transmembranaires, avec un N et un C-terminal exposés au cytosol [142]. Des expériences de digestion protéolytique ont confirmé que les boucles de Sec61 α possédaient la même topologie que celles de SecY, et que leur digestion empêchait la translocation SRP-dépendante [143]. Des acides aminés précis de ces boucles interagissent avec des protéines ribosomales, si bien que Sec61 α agit comme principal récepteur du ribosome dans le RE [144]. De plus, la structure prédite de Sec61 α s'aligne presque parfaitement avec la structure de SecY observée par cristallographie [29]. Ainsi, la sous-unité α du translocon est structurellement conservée entre procaryotes et eucaryotes, témoignant de son rôle clé dans la translocation.

Sec61 α est aussi un homologue fonctionnel de SecY. Ainsi, suite aux études de pontage qui ont démontré la proximité de Sec61 α aux polypeptides en voie de translocation, le rôle de la sous-unité α dans la translocation a été démontré lors d'une reconstitution *in vitro* du processus dans des protéoliposomes purifiés [137]. La preuve définitive que Sec61 α constitue bien un pore de translocation a été apportée peu de temps après par le groupe de Colin J. Stirling [142]. Toutefois, à l'inverse de SecY, Sec61 α joue de nombreux rôles dans le RE [145]. Ainsi, Sec61 α peut s'associer à une gamme de protéines qui en modifient la fonction, afin de servir tour à tour de pore de translocation co-traductionnelle, de pore de translocation post-traductionnelle ou de pore de rétrotranslocation [146,147]. En outre, Sec61 α constitue un pore hautement dynamique capable d'ajuster son diamètre pour accommoder le passage de protéines solubles ou transmembranaires [70]. Sec61 α détermine également l'orientation des TMD par son environnement chargé et reconnaît les signaux peptidiques pour en faciliter l'intégration [148]. Enfin, Sec61 α interagit avec une batterie de cofacteurs, non essentiels pour la translocation *in vitro*, mais importants pour l'efficacité du processus *in vivo* [149].

1.5.1.2 La sous-unité β

La découverte de Sec61 α a été capitale car elle a permis de générer des anticorps pouvant immunoprécipiter le translocon eucaryote. Ceci a permis l'identification d'une seconde protéine dans le complexe, nommée Sec61 β [137,150]. Il s'agit d'une petite protéine transmembranaire de 10 kD de type « TA », ancrée à la membrane par son domaine C-terminal, avec un N-terminal exposé au cytoplasme. La protéine Sec61 β est abordée en détail dans la section 1.6 du mémoire.

1.5.1.3 La sous-unité γ

La sous-unité γ du translocon a été découverte en même temps que la sous-unité β , lors de la purification du complexe Sec61 [137,150]. Il s'agit d'une petite protéine TA de 9 kD, topologiquement semblable à la sous-unité β en termes de structure et d'orientation. Sec61 γ est identique à 45 % avec *SSSI* (sec sixty-one suppressor 1), un gène de *S. cerevisiae* initialement identifié comme suppresseur des défauts de sécrétion des mutants de *SEC61* [151]. La délétion de *SSSI* est létale alors que la diminution de l'expression du gène entraîne de sévères défauts de translocation semblables à ceux causés par les mutants de *SEC61*. La sous-unité γ de mammifère peut complémenter la délétion du gène *SSSI* chez *S. cerevisiae* et corriger les défauts de translocation, démontrant qu'il s'agit bien d'un homologue fonctionnel [150]. Dans la même optique, Sec61 γ est similaire à 20 % avec la protéine SecE bactérienne, et possède une organisation structurale identique à celle de *B. subtilis* [1]. En outre, des études de résonance magnétique nucléaire faites avec des protéines Sss1p purifiées ont montré que le TMD de Sss1p était ancré dans la membrane, alors que sa seconde région amphipathique était couchée sur l'interface membrane-cytosol, confirmant les observations cristallographiques faites avec SecE [29,152]. Ainsi, tout comme la sous-unité α du translocon, la sous-unité γ est extrêmement conservée entre les espèces, à la fois en termes de séquence et de structure.

De même, le rôle cellulaire de Sec61 γ semble conservé. Tout comme Sec61 α , Sec61 γ est lui aussi essentiel à la survie et à la translocation *in vitro* [137]. Les protéines Sec61 γ non appariées à Sec61 α sont rapidement dégradées par le système ubiquitine-

protéasome, suggérant que le rôle de cette protéine est strictement relié à la translocation [153]. Pour cette raison, bien que la fonction précise de Sec61 γ ne soit pas connue, on pense que la protéine agit de la même manière que SecE : en stabilisant le translocon par des liaisons protéiques afin de réguler l'ouverture latérale du translocon [70]. D'ailleurs, tout comme chez l'archée, des liaisons directes entre Sec61 γ et Sec61 α ont été observées par pontage chimique [154]. De plus, le rôle stabilisateur de la sous-unité γ a été démontré par des études de complémentation de mutants instables de *SEC61* [155]. Enfin, Sec61 γ interagit également avec Ost4p et Wbp1p, deux protéines du complexe OST, et pourrait donc jouer un rôle architectural important pour la N-glycosylation des protéines [84,156].

1.5.2 Protéines associées au translocon

Les sous-unités α , β et γ constituent le noyau central du translocon. Toutefois, ces protéines ne sont pas suffisantes à elles seules pour supporter le processus *in vivo*. Les différents partenaires d'interaction du translocon, généralement constitués de protéines transmembranaires, permettent la formation des différents complexes de translocation (Figure 1.8).

1.5.2.1 TRAM

Lors de la purification du translocon par le groupe de Tom A. Rapoport [137], une quatrième protéine a été identifiée en plus des trois sous-unités du translocon. Cette protéine a été nommée TRAM pour «translocation associated membrane protein». La protéine TRAM est une large protéine glycosylée de 36 kD à huit passages transmembranaires, aussi abondante dans le RE que les sous-unités du translocon [157]. La protéine TRAM interagit à la fois avec Sec61 α et avec les polypeptides en voie de translocation [158]. Des études de pontage ont montré que TRAM interagissait principalement avec les domaines N-terminaux chargés des polypeptides, immédiatement après leur insertion dans le translocon [135]. Chez les mammifères, la protéine TRAM est requise pour la translocation de certaines protéines transmembranaires, alors que son effet sur la translocation des autres protéines est accessoire [137]. Le rôle exact de TRAM n'est pas très bien compris, mais on pense que la protéine agit en facilitant l'intégration et

l'accumulation de TMDs particuliers lors de la translocation [74]. Alternativement, TRAM pourrait agir en guidant les signaux peptidiques lors de la translocation et en stabilisant l'interaction ribosome-translocon. Il a aussi été proposé que TRAM faisait partie intégrante du noyau central de translocation, mais l'absence d'homologues de cette protéine chez les levures et les procaryotes a quelque peu refroidi cette allégation. Néanmoins, TRAM facilite la translocation d'une majorité de protéines chez les mammifères, et constitue donc un élément clé du translocon des eucaryotes supérieurs [74].

1.5.2.2 RAMP4/SERP1

L'isolement du translocon eucaryote a été réalisée en purifiant la fraction associée aux ribosomes, nommée RAMP. Suite à une série de chromatographies et de lavages, un seul complexe formé de RAMP1, 2 et 3 a été isolé, renommé Sec61 α , β et γ . La majorité des autres protéines transmembranaires ont été éliminées, mais une autre protéine, nommée RAMP4, était également présente dans le complexe à environ 4 % par rapport aux microsomes, soit environ la même quantité que la Signal Peptidase [137]. RAMP4 est une petite protéine de 10 kD, très similaire aux sous-unités β et γ du translocon en tant que protéine TA. Contrairement à TRAM, RAMP4 ne semble pas avoir d'effet catalytique sur la translocation, et n'interagit pas directement avec le polypeptide en voie de translocation *in vitro*. Néanmoins, RAMP4 semble être une protéine conservée avec une fonction importante *in vivo*. Ainsi, chez *S. cerevisiae*, l'homologue de RAMP4, nommé Ysy6p, a été identifié dans un criblage visant à supprimer les défauts de sécrétion de SecY, la sous-unité α du translocon bactérien [159]. De plus, il a été montré que RAMP4 contrôle la N-glycosylation de la chaîne invariable de la protéine CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de type II en interagissant avec des séquences spécifiques lors de sa translocation [160]. En parallèle, RAMP4 a été identifié comme une protéine fortement induite par hypoxie et par un stress du RE, et a été renommée SERP1 (stress associated ER protein 1) [123]. SERP1/RAMP4 interagit avec Sec61 α , Sec61 β et la calnexine, et sa surexpression diminue la quantité de protéines agrégées après un stress du RE, tout en facilitant leur glycosylation. La délétion de SERP1/RAMP4 chez la souris entraîne une hausse de mortalité et un stress accru du RE,

particulièrement délétère dans le pancréas, l'organe majeur de sécrétion des protéines [161]. Ainsi, RAMP4 constitue une protéine associée au translocon extrêmement importante pour stabiliser les protéines membranaires lors d'un stress du RE [123].

1.5.2.3 SRP, SR et ribosomes

Outre le translocon et le complexe ribosome-polypeptide naissant, seules deux autres protéines sont requises pour reconstituer la translocation co-traductionnelle *in vitro* : la particule de reconnaissance du signal, SRP, et son récepteur transmembranaire, SR [137]. Tel qu'expliqué dans la section 1.4.3.1, le complexe SRP agit en arrêtant temporairement la synthèse protéique et en acheminant le ribosome jusqu'au translocon, où elle est reconnue par le SR. Le translocon agit alors à deux niveaux : d'abord, il interagit directement avec le ribosome, de façon à assurer une interaction faible mais suffisante pour le maintenir associé [144]. Ensuite, le translocon agit comme GEF du SR, par un processus inconnu, afin d'activer le cycle GTPase requis pour le transfert du polypeptide naissant du SRP jusqu'au pore de translocation [143]. L'entrée du polypeptide induit un changement conformationnel qui stabilise l'association ribosome-translocon, tandis que le ribosome agit comme GEF de la SRP afin de compléter le cycle [162]. Une fois la synthèse du polypeptide terminée, les facteurs de relâche sont recrutés par le codon stop de la protéine traduite afin de dissocier les deux sous-unités du ribosome. On suppose que le SR est immédiatement dissocié du translocon lorsque la translocation est amorcée, car il y a beaucoup moins de SR que de translocons libres dans la membrane du RE [163]. Enfin, les homologues bactériens éloignés du SR, Ffh-4.5S RNA et FtsY, sont eux aussi capables d'activer la translocation malgré une structure divergente, suggérant que le SR pourrait être situé en périphérie du translocon et ne pas requérir d'interaction directe avec ce dernier [164].

1.5.2.4 Complexe OST et SP

Deux complexes additionnels sont situés à proximité du translocon : l'oligosaccharide transférase (OST) et la Signal Peptidase (SP). Tel qu'expliqué à la section 1.4.5.1, ces deux complexes sont impliqués dans la maturation du polypeptide naissant, immédiatement à son entrée dans la lumière du RE. Étant donné que les sites de

N-glycosylation peuvent être situés n'importe où dans la protéine, le complexe OST reste intimement associé au translocon tout au long de la translocation, et pourrait même faire partie intégrante du noyau central [149]. De plus, l'une des protéines de l'OST, la ribophorine I, agit en partie comme récepteur du ribosome [165]. Quant à la SP, elle est également présente en faible quantité dans le translocon purifié, suggérant que son association est également stable dans le complexe [137]. Ensemble, l'OST et la SP forment donc un large complexe multiprotéique centré autour de Sec61 $\alpha\beta\gamma$.

1.5.2.5 BiP et autres chaperones

Dans la même optique, les chaperones qui assistent le repliement des protéines sont également situées à proximité du translocon (voir section 1.4.5.2). À ce titre, BiP constitue un cas particulier, car cette protéine essentielle est requise à la fois pour le transport co- et post-traductionnelle [146,166]. En effet, BiP agit non seulement en assistant le repliement des protéines transloquées [167], mais également comme moteur protéique pour la translocation post-traductionnelle [168]. De plus, plusieurs études indiquent que BiP agit comme « bouchon » du translocon libre, pour sceller le côté luminal, possiblement en interagissant directement avec le translocon [169,170,171]. D'autres chaperones, comme la calnexine, peuvent également être pontées aux polypeptides en voie de translocation, indiquant une grande proximité par rapport au translocon [172]. De plus, la calnexine peut également lier certaines sous-unités du translocon de façon transitoire [96]. Il est donc certain que les chaperones jouent un rôle déterminant dans le processus de translocation et qu'elles sont situées non loin du translocon pour maximiser leur efficacité.

1.5.2.6 Complexe Sec62/Sec63

Le criblage d'identification des gènes *sec* eucaryotes a non seulement permis d'identifier *SEC61* et *KAR2* (le gène de BiP), comme gènes essentiels à la translocation, mais aussi deux autres gènes, *SEC62* et *SEC63*, chez *S. cerevisiae* [173]. Des études de pontage ont ensuite montré que Sec62p et Sec63p formaient un complexe protéique associé au translocon, spécifiquement recruté lors de la translocation post-traductionnelle [146,174]. Sec63p est une protéine transmembranaire de 75 kD comportant un domaine J,

la région ultraconservée de la famille des DnaJ. Les protéines J sont des co-facteurs des chaperones Hsp70 et servent à activer le domaine ATPase de ces protéines [175]. Dans le cas de Sec63p, le domaine J sert à recruter et activer BiP au niveau du translocon afin de démarrer la translocation [176]. Des mutants de Sec63p ou BiP bloquent les protéines en voie de translocation au niveau de la membrane du RE [139]. Chez *S. cerevisiae*, Sec63p et BiP sont essentiels à la translocation post-traductionnelle, mais, curieusement, également à la translocation co-traductionnelle, à l'inverse des mammifères [166]. De plus, chez la levure à bourgeons, le complexe Sec62/Sec63 comprend deux autres protéines spécifiques, Sec71p et Sec72p. Sec71p est une petite protéine à un seul passage transmembranaire tandis que Sec72p est une protéine cytosolique associée à Sec71p [177]. Ces protéines ne sont pas essentielles à la viabilité cellulaire, mais leur délétion entraîne l'accumulation de précurseurs protéiques dans le cytoplasme [178]. Quant à Sec62p, on sait qu'il sert de récepteur pour la reconnaissance des signaux peptidiques avant même le recrutement du translocon [179]. En fait, Sec62p, Sec71p et Sec72p forment une interface de reconnaissance et de liaison du peptide signal sur la membrane du RE [180]. Ainsi, lorsque le translocon s'associe à Sec62p, Sec63p, Sec71p et Sec72p, on dit qu'il forme le complexe heptarique « Sec », par opposition au complexe Sec61 impliqué dans la translocation co-traductionnelle [146]. Le complexe Sec déforme légèrement la structure du translocon, permettant au substrat de s'insérer sous forme de boucle entre deux TMDs de Sec61 α [181]. L'interaction entre Sec61 α et le complexe Sec62/Sec63 se fait via le domaine Brl de Sec63p [182]. Enfin, le complexe Sec62/Sec63 est également important pour l'oligomérisation du translocon [183].

Bien que le complexe Sec soit abondamment utilisé par certains eucaryotes unicellulaires comme la levure *S. cerevisiae*, l'importance du transport post-traductionnel chez les eucaryotes supérieurs est beaucoup moindre. En effet, les mammifères sont dépourvus de Sec72p et Sec73p, et seules les protéines de moins de 70 acides aminés peuvent être transportées efficacement de façon post-traductionnelle chez l'homme [184]. De plus, l'efficacité de translocation diminue rapidement *in vitro* dès que la taille du polypeptide dépasse 25 kD [185]. L'importance de cette voie chez les mammifères demeure donc peu connue.

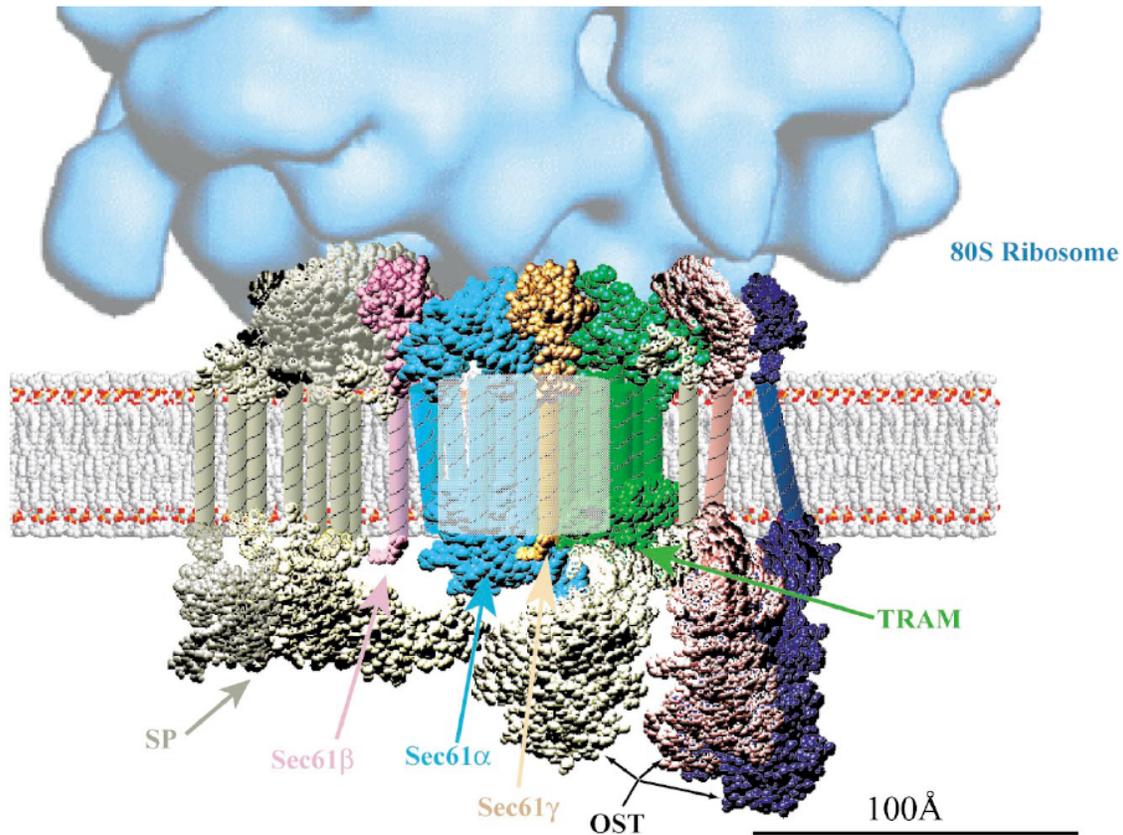


Figure 1.8 Les protéines associées au translocon

Schéma tiré de (Johnson *et al.*, 1999) [149] présentant les différentes protéines associées au translocon sous forme de carte moléculaire bidimensionnelle. Les domaines transmembranaires sont représentés par des cylindres alors que les domaines cytosoliques et luminaux sont représentés par des boules. La forme des domaines est arbitraire et ne sert qu'à indiquer l'espace approximatif occupé par chaque protéine. Les protéines interagissant ensemble ont été placées à proximité l'une de l'autre. L'échelle est globalement respectée.

1.5.2.7 Complexe de rétrotranslocation

De nombreuses indications suggèrent que le translocon est impliqué dans la rétrotranslocation de polypeptides en voie de ERAD (ER-associated degradation), bien que le mécanisme exact demeure mal connu [124]. Ainsi, plusieurs substrats de ERAD, dont le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de type I et le pro-facteur alpha (α F), peuvent être pontés à Sec61 α lors de leur rétrotranslocation [147]. De plus, des mutants de *SEC61* présentent de graves défauts de ERAD et sont incapables d'exporter la toxine du choléra et le peptide β -amyloïde au cytosol [186,187,188]. Par ailleurs, le translocon interagit avec le protéasome 19S, la machinerie de dégradation cytosolique, ainsi que p58, une simili-chaperone qui pourrait modifier la conformation du translocon pour le transformer en « rétrotranslocon » [189,190]. Cependant, le rôle de Sec61 $\alpha\beta\gamma$ dans la rétrotranslocation des protéines n'est pas absolu car le translocon n'interagit pas avec tous les complexes d'ubiquitination Hrd essentiels au ERAD, et certains substrats peuvent être dégradés en absence de Sec61 α [191,192]. Une autre protéine liant les Hrd, la derline Der1p, a aussi été proposée pour jouer le rôle de canal de rétrotranslocation [193].

1.5.3 Le second translocon de *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *S. cerevisiae*, qui a fourni une quantité importante d'informations sur les mécanismes de sécrétion et de translocation, est particulière en ce sens qu'elle a entièrement dupliqué son génome par le passé, générant la présence de nombreuses répétitions génétiques [194]. En termes de translocation, ceci se traduit par le fait que *S. cerevisiae* est le seul unicellulaire connu à posséder un second pore de translocation, nommé Ssh1 (Sec sixty-one homolog complex) [195].

Structurellement, le translocon Ssh1 de *S. cerevisiae* est composé d'un homologue de Sec61p appelé Ssh1p (identique à 34 %), d'un homologue de Sbh1p appelé Sbh2p (identique à 53 %) et d'une protéine commune aux deux translocons, Sss1p. Contrairement à *SEC61*, *SSH1* n'est pas un gène essentiel à la survie, même s'il est requis pour un taux de croissance normal [196]. De plus, la délétion de *SSH1* n'entraîne aucun défaut apparent de translocation et de rétrotranslocation, tout comme la délétion de *SBH2*

[188,197]. Néanmoins, le translocon Ssh1 interagit avec les ribosomes et le SR aussi bien que le translocon Sec61, suggérant un rôle potentiel du complexe [198,199]. De plus, Ssh1 reconnaît une sous-catégorie de signaux peptidiques, comprenant notamment ceux de BiP et des invertases, et forme un pore de translocation fonctionnel [200]. Ssh1 possède en outre son propre complexe OST [201], mais n'interagit pas avec le complexe Sec62/Sec63, suggérant que Ssh1 est strictement dévoué au transport co-traductionnel [196]. Ceci est supporté par le fait que les cellules $\Delta ssh1$ sont synthétiquement létales avec des mutants du complexe SRP mais pas du complexe Sec62/Sec63 [202].

Néanmoins, si Ssh1 est effectivement un translocon dévoué au transport co-traductionnel, il est surprenant de constater que la délétion de *SSH1* n'entraîne aucune diminution de translocation. De surcroît, le flux de protéines transloquées n'est pas altéré dans les cellules $\Delta ssh1$, et le complexe Sec61p n'est pas surexprimé [200]. Une solution à cette énigme a été proposée par le groupe de Colin J. Stirling [202], qui a montré que les cellules dépourvues du complexe Ssh1 s'adaptent rapidement en devenant déficientes pour la respiration, dans le but de réduire leur synthèse protéique. À l'inverse, les cellules $\Delta ssh1$ compétentes pour la respiration poussent non seulement moins rapidement, mais possèdent également des défauts sévères de translocation et de rétrotranslocation. De plus, la translocation post-traductionnelle est altérée, suggérant que le translocon Sec subit lui aussi un stress important. Dans la même optique, les cellules $\Delta ssh1$, qui doivent assumer l'ensemble du transport co- et post-traductionnel uniquement avec le translocon Sec61, sont extrêmement sensibles à une surexpression de Sec62/Sec63, qui vient perturber le ratio des translocons Sec vs Sec61 [200].

En somme, il s'avère que le translocon Ssh1 possède une activité de translocation et de rétrotranslocation redondante avec le translocon Sec61 [195]. Ce second translocon agirait donc principalement comme sauvegarde lors d'une surcharge de protéines en voie de translocation ou suite à une mutation d'un des composants de Sec61. Bien que *S. cerevisiae* soit le seul organisme où deux translocons soient caractérisés, il est intéressant de noter que les mammifères possèdent aussi un homologue de la sous-unité α du translocon (mais pas de la sous-unité β) [43]. La présence de translocons alternatifs chez les eucaryotes supérieurs n'est donc pas totalement exclue.

1.5.4 Oligomérisation du translocon

Les études cristallographiques du translocon de l'archée *M. jannaschii* indiquent qu'un seul hétérotrimère (SecYE β ou Sec61 $\alpha\beta\gamma$) forme le pore de translocation [29]. Paradoxalement, des études précédentes avaient montré que le complexe de translocation était composé d'oligomères [30]. Ainsi, des images par microscopie électronique à basse résolution indiquent la présence de trois ou quatre hétérotrimères Sec61 $\alpha\beta\gamma$ associés sous forme d'un anneau autour d'un centre de 20 Å, qu'on croyait être le pore lui-même [183] (Figure 1.9). L'association multimérique de Sec61 a aussi été prédite par des reconstitutions tridimensionnelles du complexe ribosome-translocon [66,203]. Chez la bactérie, des gels d'électrophorèse bleu-natif combinés à des analyses de densité électronique ont révélé non seulement la présence de multimères, mais également de dimères de SecYEG [204]. Enfin, des analyses par transfert d'énergie de résonance entre molécules fluorescentes (FRET) ont également montré que les complexes Sec61 avaient une tendance naturelle à s'oligomériser [205]. Ainsi, le translocon peut former une structure quaternaire multimérique à la fois chez les mammifères et les bactéries.

Néanmoins, puisqu'un seul hétérotrimère Sec61 $\alpha\beta\gamma$ est suffisant pour la translocation, l'intérêt biologique de cette oligomérisation demeure non résolu. Chez la bactérie, on sait que la dimérisation de deux translocons est requise pour le recrutement de SecA (voir section 1.3.3.1), mais les archées et les mammifères sont dépourvus de cette protéine. Chez les eucaryotes, on sait cependant que la formation de la structure annulaire du translocon requiert la présence de ribosomes [183], et que la structure quaternaire est dynamique durant la translocation [206]. Ainsi, les oligomères de Sec61 pourraient servir à stabiliser l'interaction ribosome-translocon ou encore à faciliter sa dissociation après la translocation. Il a aussi été proposé que l'association des oligomères de Sec61 α pourrait permettre de former un pore plus grand pouvant aller jusqu'à 40 Å de diamètre, tel qu'observé par des expériences d'extinction de fluorescence [207]. Alternativement, les multimères de Sec61 pourraient jouer un rôle dans le recrutement de partenaires d'interaction alternatifs du translocon [35]. Dans tous les cas, l'oligomérisation du translocon apparaît comme un mécanisme cellulaire dynamique pouvant affecter la translocation à de nombreux niveaux.

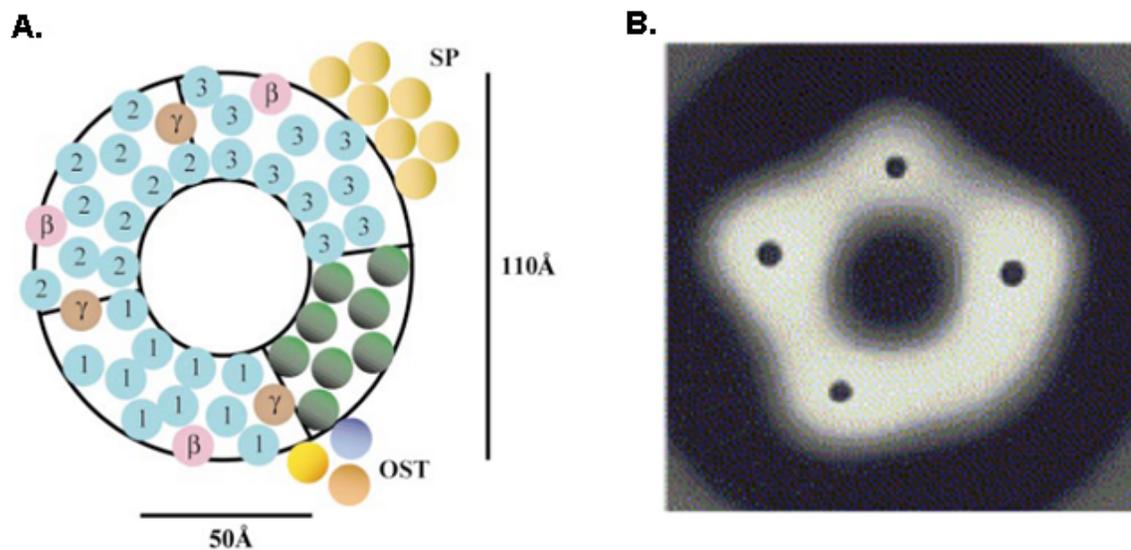


Figure 1.9 L'oligomérisation du translocon

A. Schéma tiré de (Johnson *et al.*, 1999) [149] présentant une vue aérienne d'un hypothétique oligomère de translocons Sec61 $\alpha\beta\gamma$. Chaque cercle représente un domaine transmembranaire de l'une des sous-unités du translocon ou d'une protéine associée. Trois translocons associés à une seule protéine TRAM représentée en vert sont arbitrairement présentés. **B.** Carte de projection basse résolution de la structure quaternaire du translocon tiré de (Hanein, 1996)[183]. Chaque point noir représente un hétérotrimère de Sec61 $\alpha\beta\gamma$.

1.6 La sous-unité β du translocon

Le rôle des sous-unités α et γ du translocon sont bien connus (section 1.5.1). Il en va différemment de la sous-unité β , la seule protéine non essentielle du complexe qui n'est pas absolument requise pour la translocation. Malgré tout, cette protéine est conservée entre les espèces, témoignant de son rôle universel important, et se retrouve dans tous les organismes étudiés à ce jour [1]. Étant donné que plusieurs fonctions ont été proposées pour cette protéine selon les espèces, j'introduis l'ensemble de nos connaissances actuelles sur cette sous-unité dans une perspective évolutive.

1.6.1 SecG chez les bactéries

La protéine SecG (homologue de Sec61 β) est la sous-unité du complexe SecYEG la plus énigmatique. SecG coprécipite avec le complexe SecYE, mais n'est pas requise pour la translocation [208,209]. Malgré tout, SecG stimule la translocation *in vitro* dans des vésicules reconstituées, et sa surexpression accélère la cinétique d'exportation des protéines [210,211]. La délétion de SecG entraîne une diminution de sécrétion et une thermosensibilité à 20°C, mais seulement dans certaines souches particulières de *E. coli* qui présentent également une mutation de *glpR*, une protéine de régulation du glycérol-3-phosphate [212]. Étonnamment, différents criblages de suppression des phénotypes associés à la délétion de SecG ont identifié une vaste gamme de protéines impliquées dans le métabolisme des phospholipides [213,214]. Toutes ces indications suggèrent que SecG est particulièrement important lorsque la fluidité membranaire est réduite, que ce soit à cause d'une baisse de température ou d'un problème au niveau de la membrane. En accord avec cette idée, il a été montré que SecG stimule le cycle d'insertion/déinsertion membranaire de SecA, le moteur ATPase de la translocation [215]. L'effet de stimulation de SecG est particulièrement important à basse température, alors que l'insertion de SecA s'effectue plus difficilement.

Du côté structurel, SecG est une protéine de 110 acides aminés composée de trois régions hydrophobes [11]. Deux de ces régions ont été démontrées comme étant transmembranaires par fusion PhoA et études de protéolyse, alors que la région

intermédiaire semble être cytosolique [216]. Remarquablement, SecG subit une inversion de topologie intramembranaire de ses deux TMDs durant la translocation SecA-dépendante [216]. La même inversion de topologie est observée avec un dimère de SecG stabilisé par des ponts disulfure, témoignant de l'aspect hautement dynamique de cette protéine [217]. En fait, il a été montré que l'inversion de topologie de SecG était essentielle à la stimulation de la translocation par SecA [215]. En outre, la majorité des mutations *prl* de SecG sont localisées dans ces régions hydrophobes [211,218], qui ont également été montrées pour participer à la reconnaissance des signaux peptidiques lors de la translocation des protéines [219]. Ainsi, le rôle stimulateur de SecG semble régulé par un changement conformationnel de ses TMDs.

Enfin, il est à noter que la similarité de séquence de SecG par rapport à Sec61 β est beaucoup plus faible que celle des sous-unités Y et E par rapport aux sous-unités α et γ . Néanmoins, il existe un lien évolutif certain entre SecG et la sous-unité β du translocon [1]. Ceci suggère que la fonction de SecG aurait pu être modifiée entre les bactéries et les mammifères, d'autant que SecA est absent chez les eucaryotes et les archées. De plus, aucune inversion de topologie n'a été observée pour la sous-unité β du translocon chez d'autres organismes que la bactérie.

1.6.2 Sec β chez les archées

Les archées constituent un groupe taxonomique extrêmement diversifié distinct des bactéries et des eucaryotes. On retrouve des archées dans les environnements les plus extrêmes (pH proche de 0, température supérieure à 100°C ou inférieure à 0°C, etc.), mais également dans les environnements courants comme des lacs, des sols ou l'intestin des animaux. Les archées constituent près de 20 % de la biomasse [220].

Le complexe de translocation des archées (SecYE β), a été entièrement cristallographié (voir section 1.3.3). Ces études ont révélé un rôle structurel accessoire de Sec β , dû à sa faible interaction avec SecY et sa localisation en périphérie de l'interface SecYE [29]. Plusieurs indices indiquent que cette structure est représentative de l'ensemble des translocons.

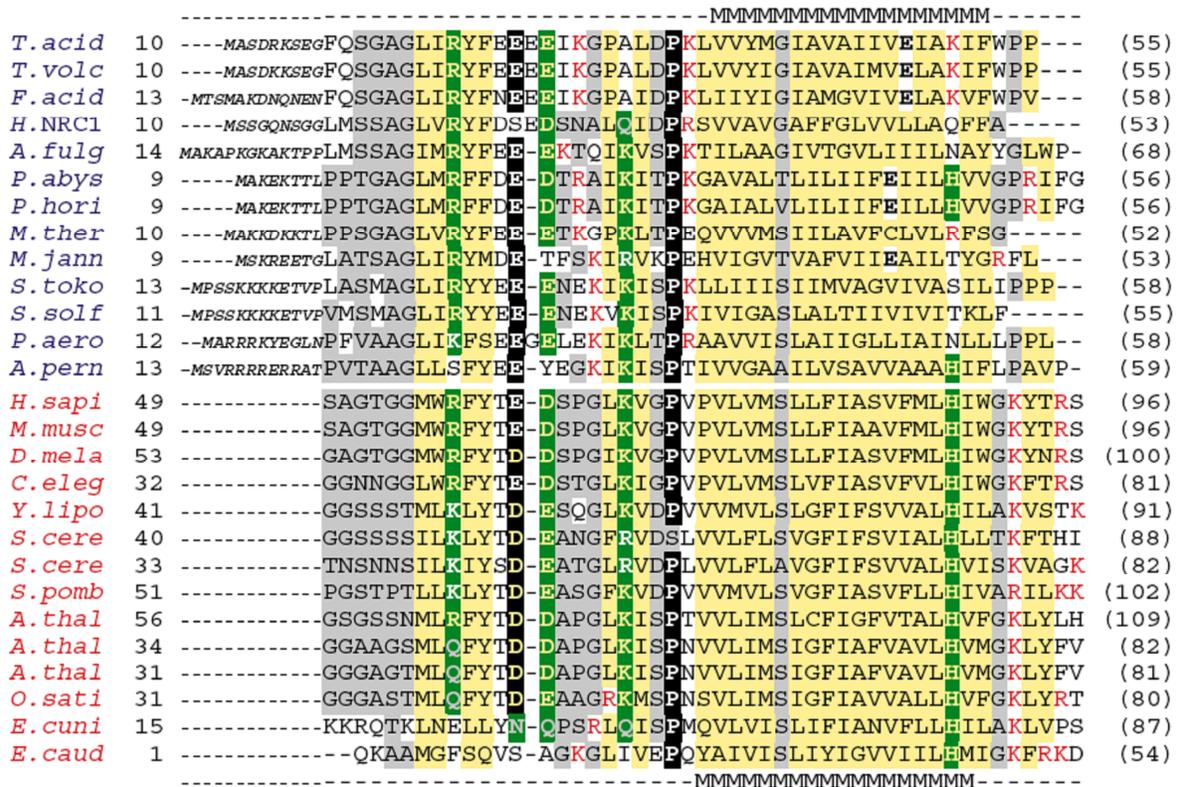


Figure 1.10 Alignement de séquences de la sous-unité β du translocon

Schéma tiré de (Kinch *et al.*, 2002) [221] présentant un alignement du motif structural conservé de différents homologues de Sec61 β allant de l'archée (en bleu) aux eucaryotes (en rouge). Les résidus les plus conservés sont marqués ainsi : petits en gris, hydrophobes en jaunes, ultraconservés en noirs, polaires en verts, chargés positivement en rouges. Les résidus du domaine transmembranaire sont marqués en haut et en bas de l'alignement par la lettre M.

Outre les renseignements structuraux, l'archée a aussi fourni des informations phylogéniques importantes sur la sous-unité β [1]. Ainsi, l'étude de Sec β chez l'archée a permis d'identifier les régions ultraconservées qui pourraient soutenir une fonction particulière. Grâce aux séquences de 13 archées distinctes, le groupe de Nick V. Grishin a en effet identifié un motif de 45 acides aminés conservé entre les archées et les eucaryotes [221] (Figure 1.10). Ce motif est composé du domaine transmembranaire hydrophobe de Sec61 β , d'une petite queue C-terminale et d'une courte région N-terminale composée de plusieurs petits acides aminés rapprochés. Ces trois régions sont séparées par des résidus conservés chargés positivement qui aident à l'orientation de la protéine dans la membrane. Fait intéressant, les homologues de Sec61 β des archées ne possèdent que de 55 à 68 acides aminés, comparativement à 80 à 109 chez les eucaryotes. Ceci s'explique par un domaine N-terminal significativement tronqué par rapport aux eucaryotes, suggérant un rôle de moindre importance de cette région. Ainsi, l'analyse globale de tous les homologues de Sec β indique que le TMD de la protéine constitue la région la plus conservée à travers les espèces.

1.6.3 Sbh1/2 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

La levure à bourgeons *S. cerevisiae* (communément appelée levure du boulanger ou levure à bière) est un modèle historiquement utilisé pour l'étude du translocon. En purifiant la fraction des protéines membranaires associées aux ribosomes (RAMP), le groupe de Tom A. Rapoport [146] a reconstitué pour la première fois le mécanisme de translocation chez la levure. Tout comme chez l'humain [150], un homologue de Sec61 β , nommé Sbh1p pour « Sec61 beta homolog 1 », a été découvert dans l'appareil de translocation. Une immunoprécipitation de Sbh1p permet de récupérer tout le complexe de sécrétion, démontrant qu'il s'agit bien d'une sous-unité du translocon de levure. Fait intéressant, le translocon peut également être purifié en absence de ribosomes et permettre de reconstituer la translocation post-traductionnelle *in vitro* lorsque toutes les protéines associées (Sec62p, Sec63p, etc.) sont présentes. L'homologue de Sec61 β de *S. cerevisiae* fait donc à la fois partie du complexe de translocation co- et post-traductionnelle.

1.6.3.1 Sbh1p

Au niveau structural, Sbh1p (renommé ici SC_Sec61 β 1 pour fins de clarté) est constitué d'une séquence de 82 acides aminés comportant un seul domaine transmembranaire. La protéine SC_Sec61 β 1 est localisée au réticulum endoplasmique et co-localise avec BiP, qu'elle soit endogène, exprimée avec un tag ou surexprimée [222]. Remarquablement, SC_Sec61 β 1 s'intègre de façon post-traductionnelle aux microsomes bruts, avec son domaine N-terminal exposé au cytosol, démontrant qu'il s'agit d'une protéine membranaire de type TA (tail-anchored).

En parallèle, le groupe de Sirkka Keränen [222] a découvert SC_Sec61 β 1 par une approche génétique de suppression multicopie. Cette technique est très utile chez les levures pour détecter des interactions fonctionnelles entre protéines. Ainsi, SC_Sec61 β 1 a été initialement identifié comme suppresseur de l'allèle *sec15-1*, un mutant thermosensible du complexe exocyste. SC_Sec61 β 1 complémente aussi les allèles thermosensibles des mutants de la sous-unité α , *sec61-2* et *sec61-3*, mais pas des mutants des protéines de translocation post-traductionnelle *sec62-1* et *sec63-1*. Des analyses plus poussées ont aussi montré une interaction fonctionnelle par complémentation des allèles *sec3-2*, *sec6-24* et *sec8-9*, trois autres mutants du complexe exocyste, indiquant une interaction entre ce complexe et la sous-unité β du translocon [116]. Cette interaction fonctionnelle s'accompagne d'ailleurs d'une interaction physique, puisque SC_Sec61 β coimmunoprécipite avec Sec15p, Sec8p, Sec4p et Rtn1p, des protéines associées au complexe exocyste [116,197]. De plus, la surexpression de SC_Sec61 β 1 augmente la sécrétion d'une protéine endogène, l'invertase, jusqu'à 40 %, et d'une protéine rapporteuse, l' α -amylase, jusqu'à 2,3 fois [223]. À l'opposé, les cellules *sbh1* Δ sécrètent seulement 59 % de l' α -amylase de la souche sauvage [197]. Ces résultats suggèrent que la sous-unité β du translocon favorise l'exocytose chez la levure à bière, bien que le mécanisme exact ne soit pas connu.

1.6.3.2 Sbh2p

Par un criblage d'hybridation hétérologue d'ADN, un deuxième homologue de la sous-unité β du translocon a aussi été identifié chez *S. cerevisiae*, nommé Sbh2p

(SC_Sec61 β 2) [222]. À ce titre, la levure du boulanger constitue une exception, puisqu'il s'agit du seul unicellulaire séquencé à ce jour à posséder plus d'un homologue de Sec61 β [1]. Les deux paralogues sont identiques à 53 % entre eux, et proviennent probablement de la duplication d'un gène ancêtre commun. La délétion de *SBH1* (*sbh1 Δ*) ou *SBH2* (*sbh2 Δ*) est viable et n'entraîne aucun défaut de croissance, mais la double délétion (*sbh1 Δ sbh2 Δ*) cause une thermosensibilité importante à 38°C [196,222].

Le rôle des deux homologues de Sec61 β chez *S. cerevisiae* a été étudié par le groupe de Thomas Sommer [196] et de Jussi Jäntti [197]. La délétion de *SBH1* ou *SBH2* seule ne semble pas entraîner d'effet majeur sur la translocation, mais la double délétion cause des défauts de translocation (accumulation de précurseurs du facteur α) et une réduction de la vitesse de translocation *in vitro*, indiquant que la sous-unité β a un effet cinétique sur la translocation. Les deux voies de translocation, co- et post-traductionnelle, voient leur efficacité diminuer dans les souches *sbh1 Δ sbh2 Δ* , surtout à haute température, bien que la voie co-traductionnelle soit davantage affectée. Par contre, la double délétion *sbh1 Δ sbh2 Δ* n'a aucun effet sur la rétrotranslocation d'un mutant du précurseur du facteur α (*p Δ gpr α f*), suggérant que la sous-unité β du translocon ne participe pas au ERAD de toutes les protéines chez *S. cerevisiae* [197]. Enfin, des interactions fonctionnelles ont été montrées entre SC_Sec61 β et le SRP, suggérant que la sous-unité β participe à la reconnaissance des translocons libres lors de la translocation co-traductionnelle [199].

En somme, ni SC_Sec61 β 1, ni SC_Sec61 β 2 ne sont essentiels à la translocation, et les deux protéines semblent avoir des fonctions redondantes. Néanmoins, de façon surprenante, ces deux homologues ne font pas partie du même complexe de translocation. En effet, alors que SC_Sec61 β 1 fait partie du translocon « classique » Sec61, SC_Sec61 β 2 est plutôt retrouvé dans le deuxième translocon de *S. cerevisiae*, nommé Ssh1 [196]. SC_Sec61 β 1 et SC_Sec61 β 2 ne peuvent pas changer de complexe tant que leur sous-unité α respective est présente, mais SC_Sec61 β 2 peut s'associer à Sec61p si SC_Sec61 β 1 et Ssh1p sont délétés simultanément [199]. L'avantage évolutif de cette duplication du translocon, qui semble propre à la levure à bourgeons, n'est pas connu, mais pourrait permettre une régulation plus précise de la translocation en plus de servir de voie de sauvetage en cas de mauvais fonctionnement de la voie Sec61.

1.6.3.3 Le domaine transmembranaire de SC_Sec61 β

Afin d'identifier la fonction de SC_Sec61 β , différents mutants de la protéine ont été construits [197]. Ces études ont révélé que, étonnamment, les 26 acides aminés du TMD de SC_Sec61 β sont nécessaires et suffisants pour compléter de nombreux phénotypes des cellules *sbh1* Δ *sbh2* Δ de *S. cerevisiae*. Ainsi, le TMD de la protéine renverse la sensibilité à 38°C ainsi que les défauts de translocation co- et post-traductionnelle causés par la double délétion des deux homologues de Sec61 β . Le TMD est aussi capable de former un complexe avec la sous-unité α et γ du translocon, démontrant sa bonne localisation dans le RE. En outre, le TMD lie également Rtn1p, une protéine impliquée dans la structuration du RE cortical [224], en absence des sous-unités α et γ . Ceci démontre que le TMD de Sec61 β est également localisé en dehors du complexe de translocation. Ces résultats ont été confirmés par une deuxième étude, qui a montré que le domaine N-terminal de SC_Sec61 β n'était pas nécessaire aux interactions avec le SRP [199]. En fait, la seule fonction strictement associée au domaine N-terminal de SC_Sec61 β consiste en l'interaction fonctionnelle avec la protéine exocyste Sec15p [197].

Quant au TMD, sa seule fonction précise connue consiste en son rôle d'ancre membranaire et de signal de localisation au RE. Les résidus de cette région hydrophobe sont reconnus par le complexe GET (Golgi ER trafficking), qui cible la protéine au RE et l'intègre dans la membrane post-traductionnellement, par un mécanisme encore inconnu [65]. La délétion du TMD de Sec61 β entraîne l'accumulation de la protéine sous forme de larges agrégats cytosoliques [64,65]. Ceci explique probablement pourquoi aucun mutant de SC_Sec61 β dépourvu du TMD ne complète de fonctions de la protéine totale [197]. Ces résultats suggèrent que le TMD de Sec61 β joue un rôle crucial qui surpasse sa simple fonction d'ancre membranaire. Cependant, la conservation de cette fonction à travers les espèces demeure une question ouverte.

1.6.3.4 Autres partenaires d'interaction de SC_Sec61 β

Enfin, un autre attrait majeur de *S. cerevisiae* pour la recherche provient de la facilité avec laquelle on peut identifier des partenaires d'interaction par criblage

génétique. À l'aide de différents criblages globaux, plusieurs protéines associées à SC_Sec61 β 1 ou SC_Sec61 β 2 ont ainsi été identifiées. En plus de ceux mentionnés précédemment, ces partenaires comprennent : les protéines Spc1p et Spc2p du complexe SP, de multiples sous-unités du complexe OST, la protéine Rpt1 du protéasome 26S, la protéine Sec63p du complexe Sec62/Sec63, ainsi que l'alkaline céramidase Ypc1p, une protéine impliquée dans la synthèse des sphingolipides [7,80,84,225,226]. Globalement, ces données confirment le rôle central de SP_Sec61 β dans de un large réseau multiprotéique associé à l'appareil de translocation.

1.6.4 Sbh1p chez d'autres levures

La levure du boulanger n'est pas le seul modèle unicellulaire eucaryote où la sous-unité β du translocon a été étudiée (Figure 1.11). En effet, la présence de deux homologues de Sec61 β et de deux translocons distincts chez *S. cerevisiae* constitue un obstacle important à l'interprétation des résultats. En outre, d'autres levures possèdent des avantages particuliers qui rendent ces modèles plus attrayants pour l'étude de la sécrétion.

1.6.4.1 Sbh1p chez *Kluyveromyces lactis*

La levure *K. lactis* est utilisée depuis les années 1950 dans l'industrie alimentaire, notamment comme source de β -galactosidase, une enzyme impliquée dans la production de produits laitiers sans lactose [227]. Actuellement, plus de 40 enzymes commerciales sont produites dans ce système d'expression [227]. Une attention toute particulière a donc été portée à la voie de sécrétion de *K. lactis* dans le but d'améliorer la production.

Puisque la surexpression de SC_Sec61 β 1 augmente la sécrétion chez *S. cerevisiae* (voir section 1.6.3.1), les travaux de Toikkanen *et al.* (2003) ont été poursuivis avec l'homologue de Sec61 β chez *K. lactis* (KL_Sec61 β) [223]. À l'instar de SC_Sec61 β 1, KL_Sec61 β complémente la thermosensibilité de la souche *sbh1 Δ sbh2 Δ* et augmente la sécrétion de l' α -amylase lorsque surexprimé chez *S. cerevisiae*. Ceci témoigne de l'homologie fonctionnelle de ces deux protéines. Néanmoins, KL_Sec61 β ne complémente pas les mutants du complexe exocyste chez la levure à bourgeons, et l'effet

de sa surexpression directement dans *K. lactis* n'a pas été montré. Ceci indique que KL_Sec61 β possède certaines différences par rapport à son homologue chez *S. cerevisiae*.

1.6.4.2 Sbh1p chez *Yarrowia lipolytica*

Parmi les autres alternatives à *S. cerevisiae* pour la production industrielle de protéines hétérologues, la levure qui fournit la meilleure performance globale en termes de sécrétion est sans nul doute *Yarrowia lipolytica* [228]. Cette levure filamenteuse dimorphique, pouvant exister sous forme unicellulaire ou hyphale, est d'ailleurs utilisée abondamment en industrie pour la production d'acide citrique et d'autres acides organiques [229]. Un avantage majeur de *Y. lipolytica* réside aussi dans le fait qu'à l'instar des cellules de mammifères, cette levure utilise majoritairement la voie de translocation co-translationnelle [171], tandis que chez *S. cerevisiae*, la voie post-translationnelle est prédominante. Ainsi, les mécanismes de translocation et le rôle de Sec61 β dans cet organisme sont probablement plus proches des humains.

L'homologue de Sec61 β de *Y. lipolytica* (YL_Sec61 β) a été identifié par criblage de complémentation de la thermosensibilité des cellules *sbh1* Δ *sbh2* Δ de *S. cerevisiae* par le groupe de Claude Gaillardin [96]. Ainsi, tout comme KL_Sec61 β , YL_Sec61 β est un homologue fonctionnel de Sec61 β . De plus, comme dans les autres microorganismes, le gène de YL_Sec61 β n'est pas essentiel à la viabilité. Mais contrairement à *S. cerevisiae*, la délétion de YL_Sec61 β n'entraîne aucune réduction de sécrétion de la protéine rapporteuse AEP (alkaline extracellular protein), indiquant une première différence avec la levure à bourgeons. En fait, les phénotypes associés à la délétion de YL_Sec61 β sont tous différents de ceux rencontrés chez *S. cerevisiae*. Parmi ceux-ci, on note la formation de colonies plus lisses dans les cellules Δ *sbh1* par rapport aux cellules sauvages, ainsi qu'une hyper-résistance au SDS (dodécyl sulfate de sodium), un puissant détergent anionique. Remarquablement, les cellules Δ *sbh1* s'avèrent également incapables d'induire la réponse UPR après un traitement à la tunicamycine, un inhibiteur de la glycosylation, et n'accumulent pas de protéines mal repliées dans le RE. Ceci suggère un rôle de YL_Sec61 β dans le contrôle de qualité. Afin d'identifier les protéines

interagissant avec Sec61 β pouvant réguler cette fonction, un criblage de type double-hybride a été entrepris. Le seul candidat obtenu de façon reproductible par cette approche fut la calnexine, une chaperone du RE qui retient les protéines N-glycosylées mal repliées. À l'aide d'une série de mutants, le site d'interaction inter protéique a été identifié dans la région luminale de la calnexine, à proximité de son domaine transmembranaire. Ainsi, un mutant de YL_Sec61 β dépourvu de son TMD et de sa queue C-terminale est incapable de lier la calnexine. Par ailleurs, YL_Sec61 β et la calnexine sont situés dans la même fraction membranaire et forment un complexe incluant la sous-unité α du translocon, mais pas Sec62p. De façon intéressante, l'homologue SC_Sec61 β 2 de *S. cerevisiae* peut lui aussi co-précipiter avec la calnexine de *Y. lipolytica*, suggérant une fonction conservée de cette interaction. Par contre, aucune liaison n'a été rapportée entre SC_Sec61 β 1/2 et la calnexine de *S. cerevisiae* lors de précédentes études de double-hybride [7]. Ces résultats suggèrent néanmoins un lien important entre ces deux protéines impliquées dans le UPR et le ERAD.

1.6.4.3 Sbh1p chez les microsporidies

Les microsporidies constituent un large phylum de parasites intracellulaires obligatoires. Ces parasites regroupent plus de 1300 espèces et peuvent infecter un éventail impressionnant d'eucaryotes, autant chez les vertébrés que les invertébrés [230]. Quatorze espèces peuvent infecter l'humain, dont *Encephalitozoon cuniculi*, qui cause des hépatites et des conjonctivites pouvant être fatales chez les individus immunodéficients. D'autres espèces, comme *Nosema bombycis*, sont dévastatrices pour les producteurs de soie, car elles attaquent les vers qui la produisent. Ces parasites peuvent toutefois avoir des effets positifs pour l'homme, par exemple *Antonospora locustae*, qui sert d'alternative biologique aux insecticides [231]. Les microsporidies sont intéressantes pour l'étude des protéines car ces organismes simples possèdent l'un des plus petits génomes connus chez les eucaryotes (2,3-20 mégabases), avec un niveau de compaction deux fois supérieur à celui de la levure *S. cerevisiae* [232]. En outre, la perte d'un grand nombre de gènes dont la fonction est désormais dévolue à l'hôte a accéléré la vitesse de variation des séquences protéiques, particulièrement dans les régions non essentielles.

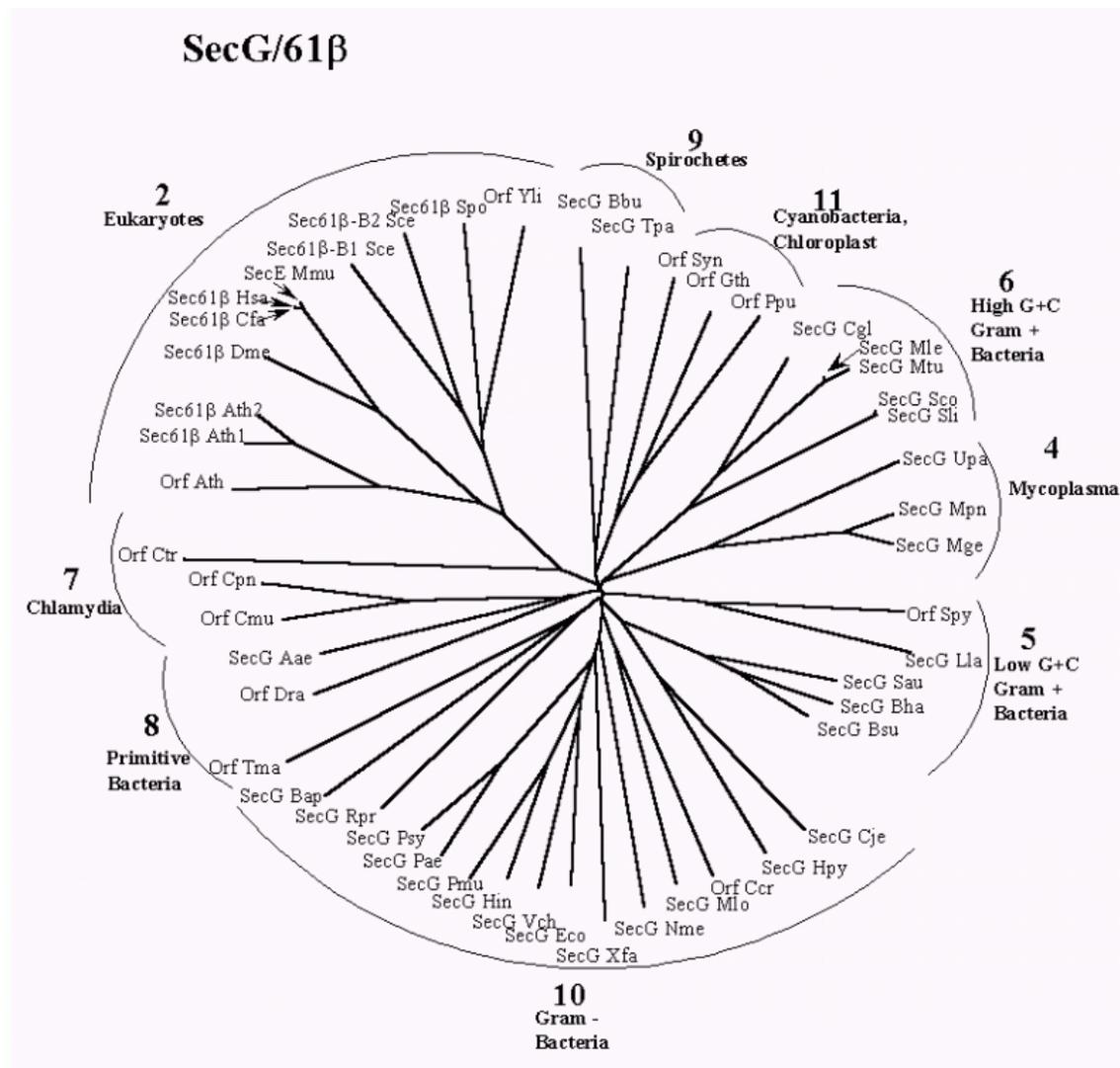


Figure 1.11 Arbre phylogénique de la sous-unité β du translocon

Schéma tiré de (Cao *et al.*, 2003) [1] présentant un arbre phylogénique de la sous-unité β du translocon à travers les espèces, classées dans différents groupes taxonomiques. Chaque être vivant séquencé à ce jour possède au moins un homologue de Sec61 β . Seule la levure *S. cerevisiae* en possède deux, alors que la plante *A. thaliana* en possède trois (dont un dans le chloroplaste). Le schéma montre que la majorité de la diversité de la sous-unité β du translocon se retrouve chez les bactéries (SecG), alors que les homologues eucaryotes présentent une plus faible divergence.

Le séquençage du génome de *E. cuniculi* a révélé la présence d'homologues de Sec61 α et Sec61 γ , mais n'a pu identifier d'homologue de Sec61 β par alignement [232]. Néanmoins, le groupe de Patrick J. Keeling [233] est parvenu à identifier un homologue de Sec61 β chez *A. locustae* (AL_Sec61 β), puis chez *E. cuniculi* (EL_Sec61 β) et *N. bombycis*, par synténie [234]. Les trois homologues de Sec61 β sont conservés à 54 % entre eux, mais présentent une très faible conservation de séquence avec les autres homologues de Sec61 β . Ceci est particulièrement notable pour le domaine N-terminal, qui apparaît significativement tronqué, réduisant la taille protéique totale à 87 acides aminés. De plus, tout comme les bactéries, les microsporidies possèdent un deuxième domaine transmembranaire C-terminal. En fait, pratiquement toute la similarité de séquence avec les homologues de Sec61 β de levure est concentrée dans les 26 acides aminés du domaine transmembranaire. Malgré cette différence importante, les homologues EC_Sec61 β et AL_Sec61 β complètent la thermosensibilité de la délétion de Sec61 β chez *S. cerevisiae*. De plus, les deux homologues sont localisés dans le RE et leur patron de structure secondaire est très similaire à celui des levures et de l'humain. Ceci suggère que malgré une divergence de structure importante, la fonction de la sous-unité β du translocon demeure conservée entre les espèces.

1.6.5 Sec61 β chez les eucaryotes pluricellulaires

Bien que très utiles et faciles d'utilisation, les organismes unicellulaires constituent un modèle d'étude qui diffère parfois des eucaryotes supérieurs. Les résultats obtenus chez les bactéries, les archées et les levures doivent donc être mis en perspective avec ceux obtenus dans d'autres modèles eucaryotes pluricellulaires.

1.6.5.1 Sec61 β chez les plantes

Chez la plante, le système endomembranaire, qui inclut la voie de sécrétion et la vacuole, occupe jusqu'à 90 % du volume cellulaire [235]. La voie de sécrétion est impliquée dans de nombreux processus biologiques, comme le stockage des pigments et la défense contre les pathogènes. Il n'est donc pas surprenant de constater que le translocon Sec61 $\alpha\beta\gamma$ est conservé à travers tout le règne végétal. En fait, alors que la majorité des organismes possèdent un seul homologue de Sec61 β , la plante *Arabidopsis*

thaliana en possède trois, dont une version chloroplastique [1]. Cette duplication est analogue à celle de *S. cerevisiae*, et semble corrélée au nombre de paralogues de la sous-unité α du translocon (trois chez *A. thaliana*).

La sous-unité β du translocon a aussi été étudiée chez *Gymnadenia conopsea* (orchis moucheron), une orchidée psychrophile vivant dans les hautes terres [236]. Dans cet organisme, il a été montré que l'expression de GC_Sec61 β augmente dans les feuilles lorsque celles-ci sont exposées à une température de 4°C. De plus, l'expression de la protéine GC_Sec61 β chez *E. coli* augmente la vitesse de croissance de la bactérie à basse température. Ceci suggère un rôle de Sec61 β dans la résistance au froid, tel que proposé chez les procaryotes.

1.6.5.2 Sec61 β chez la drosophile

Drosophila melanogaster (ou mouche du vinaigre) est un insecte diptère fréquemment utilisé en recherche, en génétique et en biologie du développement. La caractérisation du rôle de l'homologue de Sec61 β chez cet organisme (DM_Sec61 β) par Valcarcel *et al.* [237] constitue la seule étude *in vivo* de cette sous-unité du translocon sur un animal complet.

DM_Sec61 β a été identifié dans un criblage par insertion du transposon «élément P» visant à identifier des mutants de la cuticule embryonnaire. Le mutant DSec61 β ^{P1}, qui possède une insertion du transposon dans le promoteur du gène de DM_Sec61 β , résulte en une diminution importante de l'expression de la sous-unité β du translocon. Contrairement aux organismes unicellulaires, où la délétion de Sec61 β n'est pas létale, les mouches homozygotes pour DSec61 β ^{P1} meurent à la fin de leur développement embryonnaire. De plus, les embryons sont caractérisés par un amincissement majeur de leur cuticule, la rendant transparente, suggérant une diminution de la sécrétion des protéines la constituant. Ce phénotype est d'ailleurs très semblable à celui observé pour des mutants de l'exocytose, renforçant l'idée d'une interaction entre Sec61 β et le complexe exocyste. De plus, dans les œufs issus des cellules germinales DSec61 β ^{P1}, la polarité dorso-ventrale est altérée, mais pas la polarité des segments. Ceci suggère des défauts dans la sécrétion de certaines protéines du développement (comme

Gurken, responsable de la polarité dorso-ventrale), alors que d'autres ne sont pas affectés (comme Wingless, responsable de la polarité de segments). Curieusement, le développement des œufs issus de DSec61 β ^{P1} est favorisé à basse température, sans qu'ils atteignent toutefois un stade assez avancé pour leur éclosion. Enfin, à l'aide d'une approche FRT-FLP recombinase, la mutation DSec61 β ^{P1} a été analysée dans différents tissus adultes. La mutation n'entraîne aucun effet dans l'aile, une légère déficience en photorécepteurs dans l'œil, et une diminution de la longueur dans les pattes. Ces résultats montrent que même si DM_Sec61 β n'est pas essentiel à la survie chez les organismes unicellulaires, sa fonction devient critique pour le développement des métazoaires et pour la fonction de certains tissus pluricellulaires.

1.6.5.3 Sec61 β chez les mammifères

La sous-unité β du translocon a été initialement purifiée chez l'humain [166]. Ce n'est qu'un an plus tard qu'une protéine homologue a été identifiée chez la levure *S. cerevisiae* [150]. Bien que la fonction de Sec61 β n'ait jamais été étudiée *in vivo* chez les mammifères, de nombreuses études ont utilisé l'homologue canin ou humain de Sec61 β en combinaison avec des protéoliposomes membranaires reconstitués pour des études *in vitro* de la protéine.

À ce titre, l'étude la plus importante de l'homologue de Sec61 β des mammifères est celle réalisée par le groupe de Enno Hartmann, qui a montré pour la première fois que le translocon dépourvu de Sec61 β était incapable de transloquer des protéines lorsque le ciblage et l'élongation de la chaîne peptidique étaient simultanés [238]. Toutefois, si on alloue suffisamment de temps pour que le polypeptide interagisse avec le translocon, la translocation a lieu normalement, démontrant que l'effet cinétique de Sec61 β n'est pas absolument essentiel à la translocation *in vitro*. Le groupe a aussi montré que Sec61 β interagit avec SPC25, la Signal Peptidase de mammifère, mais uniquement lorsque le ribosome est associé au translocon, suggérant un changement conformationnel de la sous-unité β du translocon lorsque le ribosome s'y associe. En effet, bien que Sec61 α soit le principal récepteur de ribosome et que Sec61 β ne soit pas requis pour cette interaction, la sous-unité β du translocon lie le ribosome avec autant d'affinité que la sous-unité α [239].

Considérant le rôle cinétique de Sec61 β dans la translocation co-traductionnelle, un deuxième groupe a proposé une fonction enzymatique pour la protéine en tant que GEF de la sous-unité β du SR [240]. Ainsi, il a été montré que Sec61 β accélérât l'échange du GDP pour un GTP de SR β , mais uniquement si ce dernier était associé au translocon co-traductionnel. Dans le même esprit, un autre facteur de ribosylation de l'ADP, ARL-6, lie également Sec61 β dans des cellules érythroleucémiques [241]. Toutefois, le présumé domaine GEF de Sec61 β n'est pas conservé entre les espèces, et la fonction GEF directe n'a pas été démontrée. Ainsi, un rôle indirect de Sec61 β dans la reconnaissance de translocons libres par le SR, comme chez *S. cerevisiae*, demeure possible chez les mammifères [199].

Enfin, pour identifier des partenaires d'interaction de Sec61 β , plusieurs études de pontage, de coimmunoprécipitation et de double-hybride ont aussi été réalisées. Parmi les partenaires identifiés les plus intéressants, on compte hSec10p, une protéine du complexe exocyste humain. Sec6p et Sec8p sont aussi retrouvées en complexe avec Sec61 β , confirmant les résultats obtenus chez *S. cerevisiae*, qui suggèrent une association de la sous-unité β du translocon avec le complexe exocyste pour le transport vésiculaire. En fait, la majorité des interactions observées chez *S. cerevisiae* ont également été retrouvées chez les mammifères, dont celles entre Sec61 β , le complexe OST et Sec62/Sec63 [61]. Enfin, plusieurs groupes ont montré que Sec61 β participait au processus de rétrotranslocation et de dégradation des protéines lors du ERAD [124,242]. Notamment, Sec61 β est ponté à ApoB et CFTR lors de leur rétrotranslocation dans le cytosol [243,244]. Ainsi, le rôle de Sec61 β dans la rétrotranslocation apparaît particulièrement important pour certaines protéines, dont le récepteur de l'EGF (epidermal growth factor), qui doit être transloqué dans le cytoplasme et transporté au noyau suite à la liaison à son substrat [245]. En effet, dans les cellules HeLa, la déplétion de Sec61 β bloque complètement la voie d'activation de l'EGF.

En somme, le rôle exact de Sec61 β demeure énigmatique, car les fonctions proposées pour la protéine sont souvent indirectes ou incompatibles avec les résultats obtenus chez d'autres espèces. Sec61 β apparaît pourtant crucial pour de nombreuses voies métaboliques, et son rôle ne semble pas exclusivement relié à la translocation.

1.7 Projet de recherche

Notre laboratoire a récemment identifié Sec61 β dans un criblage de surexpression visant à remplacer la fonction essentielle de la calnexine, une chaperone du RE impliquée dans le repliement des protéines sécrétées. Ceci suggère une nouvelle fonction potentielle de Sec61 β jamais répertoriée à ce jour. Nos études ont par la suite mis en lumière une série de fonctions spécifiques de la sous-unité β du translocon centrées autour de son domaine transmembranaire hautement conservé.

1.7.1 Choix du modèle

Puisque la voie de sécrétion est conservée entre les espèces, il est avantageux d'utiliser différents organismes modèles pour l'étudier. Parmi ces modèles, la levure représente un organisme de choix à cause de sa facilité d'utilisation, de son taux de croissance rapide, de son génome séquencé et des nombreux outils biochimiques et génétiques qu'elle permet d'employer. La grande majorité de nos connaissances sur la voie de sécrétion et la translocation proviennent d'ailleurs d'études réalisées chez la levure du boulanger *S. cerevisiae* [246]. En outre, la levure est utilisée depuis des années comme système biotechnologique pour la production de protéines hétérologues, avec une efficacité de production en constante amélioration [4]. L'étude de la voie de sécrétion chez la levure possède donc un double avantage : élucider les mécanismes fondamentaux propres aux eucaryotes avec implications potentielles chez l'humain et améliorer génétiquement la voie de sécrétion pour faciliter la production de protéines recombinantes.

Pour mon étude, j'ai choisi la levure fissipare *Schizosaccharomyces pombe*, qui combine les avantages de *S. cerevisiae*, mais s'approche davantage de l'humain par son mode de division et sa génétique. De plus, contrairement à *S. cerevisiae*, *S. pombe* possède un seul homologue de Sec61 β et un seul translocon. En outre, *S. pombe* utilise principalement la voie de translocation co-translationnelle, à l'instar des cellules de mammifères, contrairement à *S. cerevisiae*, qui utilise majoritairement la voie post-translationnelle [60,247]. Enfin, comme la translocation n'a jamais été étudiée chez la

levure à fission, mes travaux sont avant-gardistes et pourront poser les premières balises visant à faire de *S. pombe* un modèle alternatif à *S. cerevisiae* pour l'étude du translocon. Enfin, étant donné que *S. pombe* est plus efficace que *S. cerevisiae* en termes de production de protéines hétérologues [248], mes travaux pourront également avoir des retombées biotechnologiques à long terme.

1.7.2 Objectif de recherche

Grâce à la levure, la voie de sécrétion a été décortiquée en profondeur au cours des deux dernières décennies. Néanmoins, certaines fonctions de base des machines moléculaires qui composent la voie de sécrétion restent indéterminées. C'est notamment le cas de Sec61 β , la seule sous-unité du translocon dont le rôle demeure méconnu. Tel que détaillé à la section 1.6, de nombreuses fonctions espèces-dépendantes ont été proposées pour cette protéine, sans qu'aucun consensus ne soit atteint. L'objectif de mon projet de recherche consiste à élucider le rôle de Sec61 β chez la levure *S. pombe*. La caractérisation de l'homologue de Sec61 β chez la levure à fission permettra de découvrir de nouvelles fonctions pour cette protéine et de confirmer ou d'infirmer des fonctions suggérées chez d'autres organismes. Je souhaite ainsi faire des ponts entre différents modèles en ralliant nos connaissances sur la sous-unité β des levures et des autres organismes, dont l'humain. L'objectif ultime de mon projet de recherche consiste à établir une fonction principale unique et conservée pour Sec61 β .

Enfin, je compte également identifier le domaine structurel minimal qui sous-tend cette fonction conservée. Étant donné que le TMD constitue la région la plus fortement conservée de la sous-unité β du translocon et que cette région a été impliquée comme principal domaine d'activité dans deux études différentes chez *S. cerevisiae* (voir section 1.6.3.3), je vérifierai si l'importance de cette région est conservée entre les espèces. Ceci pourrait démontrer une nouvelle fonction d'un TMD en dehors de son rôle d'ancrage à la membrane. Ainsi, le TMD de Sec61 β pourrait servir de modèle pour étudier de nouvelles interactions protéiques intramembranaires.

Chapitre II

Article

Inter-Species Complementation of the Translocon Beta Subunit Requires Only its Transmembrane Domain

Alexandre Leroux and Luis A. Rokeach[†]

Department of Biochemistry, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

[†]To whom the correspondence should be sent at:

Département de Biochimie

Université de Montréal,

Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Tel: 1-514-343-6324

Fax: 1-514-343-2210

luis.rokeach@umontreal.ca

Publié dans la revue *PLoS One* le 5 décembre 2008 [PMID: 19057642].

Running title: Conserved role of Sec61 β TMD

Key words: Sec61 beta, Sbh1, Sbh2, translocon, transmembrane domain, TMD, yeast, complementation, secretion, cold sensitivity, cell-wall, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abbreviations: A, adenine; ER, endoplasmic reticulum; ERAD, ER-associated degradation; HS_Sec61 β , human Sec61 β ; L, leucine; PCC, protein conducting channel; Sbh1, Sec61 beta homolog 1; SC_Sec61 β , Sec61 β homologs from *Saccharomyces cerevisiae*; SP_Sec61 β , Sec61 β homolog from *Schizosaccharomyces pombe*; SR, signal recognition particle receptor; T, thiamine; TMD, transmembrane domain; U, uracil;

Abstract

In eukaryotes, proteins enter the secretory pathway through the translocon pore of the endoplasmic reticulum. This protein translocation channel is composed of three major subunits, called Sec61 α , β and γ in mammals. Unlike the other subunits, the β subunit is dispensable for translocation and cell viability in all organisms studied. Intriguingly, the knockout of the Sec61 β encoding genes results in different phenotypes in different species. Nevertheless, the β subunit shows a high level of sequence similarity across species, suggesting the conservation of a biological function that remains ill-defined. To address its cellular roles, we characterized the homolog of Sec61 β in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (Sbh1p). Here, we show that the knockout of *sbh1*⁺ results in severe cold sensitivity, increased sensitivity to cell-wall stress, and reduced protein secretion at 23°C. Sec61 β homologs from *Saccharomyces cerevisiae* and human complement the knockout of *sbh1*⁺ in *S. pombe*. As in *S. cerevisiae*, the transmembrane domain (TMD) of *S. pombe* Sec61 β is sufficient to complement the phenotypes resulting from the knockout of the entire encoding gene. Remarkably, the TMD of Sec61 β from *S. cerevisiae* and human also complement the gene knockouts in both yeasts. Together, these observations indicate that the TMD of Sec61 β exerts a cellular function that is conserved across species.

Introduction

Protein secretion is an essential process in all organisms. In eukaryotes, entry of proteins into the secretory pathway requires passage across the endoplasmic reticulum (ER) lipid bilayer. Translocation of proteins into the ER is accomplished through a protein conduction channel (PCC) (Simon and Blobel 1991; Rapoport 2007). The PCC is composed of a highly conserved heterotrimeric core called the Sec61 $\alpha\beta\gamma$ complex in eukaryotes, and the SecYEG complex in bacteria (Brundage et al. 1992; Gorlich and Rapoport 1993; Manting and Driessen 2000). The PCC associates with several soluble proteins to form the translocon, the ER translocation machinery (Walter and Lingappa 1986; Wickner et al. 1991). The translocon functions in co-translational translocation of nascent proteins, as well as in the retro-translocation of misfolded polypeptides for degradation in the cytosol by the ER-associated degradation (ERAD) mechanism (Gorlich and Rapoport 1993; Hartmann et al. 1994; Wiertz et al. 1996; Pilon et al. 1997; Nakatsukasa and Brodsky 2008). In addition, the association of the translocon with the tetrameric Sec62/63 complex and the BiP molecular chaperone forms the Sec complex, which is involved in post-translational translocation (Roitsch and Lehle 1988; Deshaies et al. 1991; Panzner et al. 1995). The genomes of all organisms sequenced to date encode at least one homolog of each Sec61 $\alpha\beta\gamma$ /SecYEG subunits, suggesting that these proteins have a universal cellular role (Cao and Saier 2003).

So far, the functions of the α and γ subunits of the PCC are the best understood. The α subunit consists of ten transmembrane segments assembled in an hourglass shape, forming the pore of the channel (Mothes et al. 1994; Van den Berg et al. 2004) and acting as the main ribosome receptor (Kalies et al. 1994; Prinz et al. 2000). The γ subunit is a single-span membrane protein that binds and stabilizes the translocon pore by linking the two halves of the α subunit (Esnault et al. 1994; Van den Berg et al. 2004). By contrast, the precise function of the β subunit, a 10 kD C-tail-anchored transmembrane protein, remains elusive. Interestingly, Sec61 β and its prokaryotic counterpart SecG are the only translocon subunits that are not essential for cell viability in yeast and bacteria (Nishiyama et al. 1994; Finke et al. 1996; Toikkanen et al. 1996; Boisrame et al. 2002). Moreover, mammalian Sec61 β is not required for protein translocation *in vitro*, but has a

kinetic effect on co-translational translocation (Kalies et al. 1998). Likewise, bacterial SecG is dispensable for translocation in reconstituted membrane vesicles, but has a stimulatory effect in this process (Nishiyama et al. 1993). In *S. cerevisiae*, the double knockout of the genes encoding the two paralogs of the translocon β subunits (*SBH1* and *SBH2*) has only a moderate effect on translocation of reporter proteins (Finke et al. 1996; Toikkanen et al. 1996; Feng et al. 2007; Jiang et al. 2008). Regarding protein secretion, the relevance of the function of Sec61 β in co- and post- translational translocation remains unclear as the knockout of the translocon β subunits reduces α -amylase secretion in *S. cerevisiae*, but has no effect in *Yarrowia lipolytica* (Boisrame et al. 2002; Feng et al. 2007).

Based on the phenotypes resulting from its knockout, several cellular roles for the translocon β subunit have been proposed. In prokaryotes, SecG facilitates the membrane insertion/de-insertion cycle of the SecA ATPase, the bacterial translocation motor (Duong and Wickner 1997; Matsumoto et al. 1998). In *S. cerevisiae*, Sbh1p was proposed to act as the guanine nucleotide exchange factor for the signal recognition particle receptor (SR) (Helmers et al. 2003), whereas Sbh2p was suggested to mediate recognition of vacant translocons by functional interactions with the SR (Jiang et al. 2008). Sbh1p also rescues several exocyst mutants in yeasts and coimmunoprecipitates with Sec10p, Sec6p and Sec8p in mammalian cells, three components of the exocyst complex, suggesting a role in vesicular transport (Toikkanen et al. 1996; Lipschutz et al. 2003; Toikkanen et al. 2003). The translocon β subunit was also shown to be recruited to the ER-derived quality control compartment in ERAD (Kondratyev et al. 2007), and to have an accessory function in the unfolded protein response in different organisms (Yamaguchi et al. 1999; Boisrame et al. 2002; Hori et al. 2006; Wang et al. 2008). The diversity of functions proposed for the translocon β subunit suggests that different homologs of this protein have species-specific roles.

Recently, Feng *et al.* (Feng et al. 2007) demonstrated that the transmembrane domain (TMD) of *S. cerevisiae* Sbh1p or Sbh2p are necessary and sufficient to suppress the phenotypes of *sbh1 Δ sbh2 Δ* cells, including heat sensitivity at 38°C, and co-translational translocation defects. This was further confirmed in another study, where N-

terminal truncation mutants of Sbh2p restored normal integration of DPAPB and translocation of CPY in the *sbh1Δsbh2Δ* strain (Jiang et al. 2008). Furthermore, the TMD of Sbh1p is sufficient for co-immunoprecipitation with the translocon α and γ subunits, indicating correct integration and interaction at the Sec61 translocon site (Feng et al. 2007). The TMD of Sbh1p also interacts with Rtn1p, a protein involved in structuring the cortical ER, in absence of other translocon subunits, suggesting a role for the β subunit outside the translocation apparatus (Feng et al. 2007). Taken together, these results suggest that the TMD is the critical region responsible for the undefined function of Sec61 β .

Here, we analyzed the functional conservation of the translocon β subunit and its TMD. We show that the translocon β subunit is not essential in fission yeast at 30°C. However, it is required for growth at low temperature, and its deletion causes SDS sensitivity and reduced protein secretion at 23°C. Overexpression of *sbh1*⁺ also diminishes protein secretion of a model protein, increases sensitivity to cell-wall stress, and causes morphological abnormalities. The phenotypes associated with *sbh1*⁺ deletion are suppressed by the 26 amino acids of the TMD. Remarkably, the TMDs from both *S. cerevisiae* homologs of the translocon β subunit and that from human also complement the deletion phenotypes in fission and budding yeast. These results demonstrate that the TMD function of Sec61 β is conserved and sufficient to exert most biological roles of the full-length protein. These observations pose Sec61 β as a model to study alternative functions of TMDs apart from the anchoring to the ER membrane.

Results

***S. pombe* encodes a single Sec61 β homolog**

Based on Wu-Blast2 analyses of the fission yeast proteome (Lopez et al. 2003), *S. pombe* encodes a single Sec61 β homolog at ORF SPBC2G2.03c (*sbh1*⁺), hereafter designed as SP_Sec61 β for the sake of clarity. The deduced primary sequence of the protein is presented in Figure 1. As expected for a translocon subunit, the predicted protein displays a high level of sequence conservation with both paralogs of *S. cerevisiae* (SC) and that of human (HS). SP_Sec61 β is 35% identical (66% similar) to SC_Sec61 β 1 (Sbh1p), 43% identical (65% similar) to SC_Sec61 β 2 (Sbh2p), and 29% identical (58% similar) to HS_Sec61 β (human Sec61 β). Multiple sequence alignment using Clustal W2 (Chenna et al. 2003) revealed that SP_Sec61 β is evolutionary closer to HS_Sec61 β than its *S. cerevisiae* counterparts (not shown), thus validating our choice of *S. pombe* as a model organism to study the translocon β subunit of higher eukaryotes. Analyses of SP_Sec61 β using various ExPASy proteomic tools (Gasteiger et al. 2003) allowed the identification of a single domain, constituted of a continuous stretch of 26 amino acids near the C-terminus. This hydrophobic tail is predicted to form an alpha helix crossing the lipid bilayer once, with the N-terminus of the protein exposed to the cytoplasm. Thus, as in *S. cerevisiae* and human, SP_Sec61 β is predicted to be a tail-anchored protein. Interestingly, the TMDs of Sec61 β homologs are much more conserved than their N-terminal domains, 53-61% identical from yeast to human as compared to only 18-41% for the cytosolic part. In comparison, the tail anchor of the translocon γ subunit is only 40-50% identical from yeast to human, a level of sequence homology comparable to the entire protein, which is 44-48% identical. This conservation suggests a critical function for the TMD region of Sec61 β homologs, not solely explained by its role as a membrane anchor, especially as almost any stretch of hydrophobic amino acids can perform this function (Vergeres and Waskell 1992).

Overexpression of SP_Sec61 β induces morphological changes and cell-wall sensitivity

To explore its cellular roles in *S. pombe*, we overexpressed the translocon β subunit expecting to exacerbate its function and induce a revealing phenotype. The ORF of SP_Sec61 β was cloned under the control of the strong thiamine-repressible *nmt* promoter in a pREP2 vector (Maundrell 1993). As shown in Figure 2A (upper panel), overexpression of SP_Sec61 β resulted in an elongated phenotype with a single nucleus per cell (see DAPI staining, middle panel). This phenotype was specific to the translocon β subunit because the overexpression of *S. pombe* γ subunit (SP_Sec61 γ) had no effect on cell morphology. Moreover, the elongated phenotype was reverted by addition of thiamine, which represses the promoter; and the phenotype was not observed when expression was driven by a weaker *nmt** promoter (not shown). The elongated phenotype caused by overproduction of SP_Sec61 β was further confirmed by global population analysis using flow cytometry (FACS). As shown in Figure 2A (lower panel), cells overexpressing SP_Sec61 β had an average size (FSC-H) value 1.9 higher than WT. The wider size distribution can be explained by the presence of cells with various altered morphologies, which were either more granulated, had bigger vesicles or displayed an aberrant number of septa in ~10% of cases (not shown).

To assess if the elongated phenotype is associated with membrane and/or cell-wall defects, we performed an SDS resistance assay at various temperatures (Figure 2B). SDS is a strong detergent that disturbs the cytoplasmic membrane when the cell-wall is compromised, thus resulting in a dead-cell halo that can be measured (Sirisattha et al. 2004). In these conditions, cells overexpressing SP_Sec61 β were up to 1.8 more sensitive to SDS as compared to the vector control at 30°C. In comparison, cells overexpressing SP_Sec61 γ were only 1.3 times more sensitive at this temperature. At 23°C, the strains overproducing the β or γ subunits were both 1.4 times more sensitive than the vector control. As addition of 1.2 M sorbitol, an osmotic stabilizer (Osumi et al. 1989), did not rescue the SDS sensitivity nor the elongated cell size (not shown), it is unlikely that these phenotypes are only due to an incorrect cell-wall formation. These results demonstrate that the overexpression of SP_Sec61 β alters cellular morphology, accompanied by a higher sensitivity to membrane stress, suggesting a potential role of this protein in the coordination between cell-membrane growth and the cell-cycle in fission yeast.

Cells depleted of SP_Sec61 β are cold-sensitive

To investigate whether SP_Sec61 β is essential for viability, a *sbh1*⁺/ Δ *sbh1::kan*^R diploid strain was sporulated to analyze its meiotic progeny. All spores were viable on YE medium, with a 2:2 segregation of the *kan*^R marker. Deletion of *sbh1*⁺ was confirmed by Northern blotting, Southern blotting and PCR, demonstrating that SP_Sec61 β is not essential for viability (not shown). In contrast to the overexpression of SP_Sec61 β , the deletion of *sbh1*⁺ did not induce morphological changes (Figure 2A). As it was shown in *S. cerevisiae* that deletion of the genes encoding the two translocon β subunits (*SBH1* and *SBH2*) results in heat sensitivity at 38°C (Finke et al. 1996; Toikkanen et al. 1996), we measured the growth of *S. pombe* Δ *sbh1* cells at different temperatures. In contrast to *S. cerevisiae*, Δ *sbh1* cells from *S. pombe* were not heat-sensitive (not shown), but the deletion resulted in severe cold sensitivity at 23°C (Figure 2C). Normal growth was not restored by replacing the cells at 30°C after incubation at 23°C for 7 days, indicating that growth is permanently arrested or that most Δ *sbh1* cells are dead (not shown). In addition, Δ *sbh1* cells were 2.2 times more sensitive to SDS than WT cells at 23°C, while sensitivity was similar at 30°C (Figure 2B). Transformation of *sbh1*⁺ on a plasmid under the medium strength *nmt*^{*} promoter was sufficient to rescue to WT levels the cold- and SDS-sensitivity (Figure 2B-C). Globally, these results demonstrate that while SP_Sec61 β is not essential for cell viability at 30°C, it is critical at low temperature.

The levels of SP_Sec61 β modulate secretion

Because the knockout of Sec61 β was reported to lower protein secretion in *S. cerevisiae*, but not in *Y. lipolytica* (Boisrame et al. 2002; Feng et al. 2007), we wanted to assess the importance of SP_Sec61 β in protein secretion. To this end, we used a previously characterized genomic cassette expressing the reporter protein cellulase from *Aspergillus aculeatus* (Hajjar et al. 2007). The activity of secreted cellulase was measured during 7 days at different temperatures to evaluate the rate of secretion of each strain. As shown in Figure 3B, the secretion rate was not reduced in Δ *sbh1* cells at 30°C, but was reduced to 82% of the control strain at 23°C. Thus, the kinetic effect of the translocon β subunit on secretion is only observed in conditions where secretion is

already considerably diminished, such as at low temperature (secretion rate 2.6-fold lower than at 30°C, Figure 3A).

In *S. cerevisiae*, overexpression of the endogenous translocon β subunit or the *Kluyveromyces lactis* homolog increases the secretion efficiency of α -amylase (Toikkanen et al. 2004). By contrast, in fission yeast, we show that overproduction of the translocon β subunit reduces the secretion rate of cellulase (Figure 3B). Again, this effect was more pronounced at 23°C (72% of the WT value) than at 30°C (91% of the WT value). This reduction is not an unspecific effect caused by saturation of the ER, as overexpression of the translocon γ subunit did not alter the secretion rate. These results support the idea that even though SP_Sec61 β is not essential for growth at normal temperature, a correct SP_Sec61 β level is important for efficient protein secretion, especially at low temperature.

Sec61 β is functionally conserved between species

As described above, the knockout of *sbh1*⁺ results in cold-sensitive phenotypes in *S. pombe*. Interestingly, in budding yeast, the double deletion of both paralogs of Sec61 β , hereafter designated as SC_Sec61 β 1 and SC_Sec61 β 2, results in heat sensitivity instead of cold sensitivity (Finke et al. 1996; Toikkanen et al. 1996). Nevertheless, we reasoned that if the function of Sec61 β is conserved there should be cross-species complementation in spite of the opposite temperature phenotypes found in *S. pombe* versus *S. cerevisiae*. As shown in Figure 4A, both Sec61 β paralogs of *S. cerevisiae* complemented the cold sensitivity of the *S. pombe* $\Delta sbh1$ strain as efficiently as the endogenous translocon β subunit. Moreover, SC_Sec61 β 1 and SC_Sec61 β 2 also fully reversed the SDS sensitivity of the *S. pombe* $\Delta sbh1$ strain (Figure 4C). Similarly, SP_Sec61 β complemented the heat sensitivity of the *sbh1* $\Delta sbh2$ *S. cerevisiae* strain (Figure 4B). This effect was specific to the translocon β subunit, as the γ subunit homologs of *S. pombe* (SP_Sec61 γ) and *S. cerevisiae* (SC_Sec61 γ) were unable to complement the temperature-dependent phenotypes in either yeast.

To investigate the possibility of a functional conservation with higher eukaryotes, we transformed the human homolog of Sec61 β (HS_Sec61 β) in the Sec61 β knockout

strain of both *S. pombe* and *S. cerevisiae*. Strikingly, HS_Sec61 β also complemented the cold sensitivity and SDS sensitivity of the *S. pombe* $\Delta sbh1$ strain, as well as the heat sensitivity of the *S. cerevisiae* $sbh1\Delta sbh2\Delta$ strain (Figure 4, line 5). Hence, despite distinct phenotypes resulting from the deletion of translocon β subunit in two different yeast species, the function of Sec61 β appears to be conserved from yeast to human.

The transmembrane domain of Sec61 β is sufficient for heterologous complementation

Next, we wanted to define the domain of Sec61 β responsible for the inter-species complementation. Bioinformatic analyses revealed that the most conserved region of Sec61 β in all species studied is mapped to its TMD (Kinch et al. 2002). Moreover, the TMD of SC_Sec61 β 1 is sufficient to rescue the heat sensitivity of $sbh1\Delta sbh2\Delta$ cells, and to associate with the translocon α and γ subunits (Feng et al. 2007). Therefore, we tested if the TMD of different Sec61 β homologs could rescue the temperature-sensitive phenotypes in *S. pombe* and *S. cerevisiae* knockout strains. We found that the 26 amino acids of the tail anchor of SP_Sec61 β are sufficient to complement the cold sensitivity (Figure 5A), SDS sensitivity (Figure 5C) and secretion defects (Figure 3B) of the *S. pombe* $\Delta sbh1$ strain to levels equivalent to the full-length protein. The TMDs of the other Sec61 β homologs tested were also able to fully complement the defects of the $\Delta sbh1$ strain, indicating that the fundamental function of the TMD is conserved between species (Figure 5A-C). Likewise, all Sec61 β TMDs complemented the heat sensitivity of the $sbh1\Delta sbh2\Delta$ *S. cerevisiae* strain (Figure 5B). Again, complementation was specific to the TMD of Sec61 β , as the TMD from Sec61 γ (Figure 5, line 5) and calnexin (not shown) failed to suppress the phenotypes of the $sbh1\Delta sbh2\Delta$ *S. cerevisiae* strain. Collectively, these results indicate that the tail anchor of Sec61 β is sufficient to complement the knockout of the entire protein, and that this can be indistinctively accomplished by homologous transmembrane domains ranging from yeast to human. This further confirms that the diverse phenotypes associated with the deletion of Sec61 β in distinct species are not due to divergence in the amino acid sequences, but rather they reflect different downstream effects of a conserved Sec61 β function supported by the TMD.

Discussion

We have characterized for the first time the Sec61 β homolog from fission yeast. We describe *S. pombe*-specific phenotypes resulting from the overproduction or the lack of this protein, revealing the involvement of SP_Sec61 β in cellular morphology, stress resistance and protein secretion. These *S. pombe* phenotypes are distinct from those observed in *S. cerevisiae* (Finke et al. 1996; Toikkanen et al. 1996; Boisrame et al. 2002; Feng et al. 2007). Nevertheless, the Sec61 β homologs from *S. pombe*, *S. cerevisiae* and human complement the phenotypes of knockout strains of both fission yeast and budding yeast, to a level comparable to that of the endogenous proteins. Remarkably, the transmembrane domains of Sec61 β homologs are sufficient for heterologous complementation, demonstrating that the TMD region supports a fundamental biological function that is conserved across species.

Sec61 β is not essential for survival in microorganisms, but is required for development in *Drosophila* (Finke et al. 1996; Toikkanen et al. 1996; Valcarcel et al. 1999; Boisrame et al. 2002). In *S. pombe*, we show that Sec61 β is dispensable for growth at optimal temperature, but becomes critical at low temperature (Figure 2-3). Cold sensitivity was also observed for the *Escherichia coli* SecG deletion (Nishiyama et al. 1994), although it was dependent on a second mutation in *glpR*, involved in glycerol phosphate regulation (Flower 2001). In bacteria, the translocation process itself is cold-sensitive, presumably because membrane insertion of the SecA ATPase motor, which is mediated by SecG, is reduced at low temperature (Pogliano and Beckwith 1993; Matsumoto et al. 1998). In eukaryotes, a role for Sec61 β in cold resistance was proposed in the *Gymnadenia conopsea* psychrophile plant (Yang et al. 2007). Thus, the heat-sensitive phenotype observed in *sbh1* Δ *sbh2* Δ cells of *S. cerevisiae* (Finke et al. 1996; Toikkanen et al. 1996) does not reflect a universal phenotype. A possibility is that the differences between the two organisms reflect the prevalence of co- vs post-translational translocation processes in each yeast.

Interestingly, the SDS sensitivity of Δ *sbh1* cells in *S. pombe* contrasts with the SDS resistance of Δ *sbh1* cells observed in *Y. lipolytica* (Boisrame et al. 2002). In

addition, in *Y. lipolytica*, cells genetically depleted of Sec61 β form colonies displaying morphological changes, while in *S. pombe*, only the overexpression of Sec61 β affected cellular morphology and not colony formation. As morphology and SDS resistance are linked to cell-wall biosynthesis, these opposite effects could be due to differences in the composition of the cell-wall of these two yeasts (Vega and Dominguez 1986). Since we observed that the translocon β subunit levels also affect cell size, it remains possible that SP_Sec61 β is involved in the coordination of cell-membrane growth in fission yeast.

Regarding the effect of Sec61 β on secretion, it appears correlated with the efficiency of this process in each yeast. As *S. cerevisiae* is somewhat inefficient for secretion (Muller et al. 1998), the impact of Sec61 β deletion is more apparent in this yeast (47% diminution) (Feng et al. 2007), while in *Y. lipolytica*, which is more competent for secretion, no difference are observed (Boisrame et al. 2002). In fission yeast, the importance of Sec61 β is revealed at 23°C, when the secretion rate of the WT strain is already reduced by 62% as compared to 30°C (Figure 3). The different phenotypes observed for the Sec61 β -knockout in *S. pombe* as compared to *S. cerevisiae* and *Y. lipolytica* suggested that different homologs could have distinct functions. However, the lack of the translocon β subunit could affect more severely the secretion of certain proteins, thus providing an alternative explanation for the diverse, and sometimes contrasting, phenotypes associated with deletion or overexpression of Sec61 β among species.

Importantly, we show that despite these phenotypic differences, SP_Sec61 β is able to complement *sbh1* Δ *sbh2* Δ in budding yeast. Similarly, both SC_Sec61 β paralogs complement the cold and SDS sensitivity in *S. pombe*. This is in accordance with previous reports that Sec61 β homologs from *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *Antonospora locustae* and *Encephalitozoon cuniculi* rescue the heat sensitivity of *S. cerevisiae*, indicating that they are functional homologs (Boisrame et al. 2002; Toikkanen et al. 2004; Slamovits et al. 2006). Here we demonstrate that this functional complementation is possible even with higher eukaryotes, as the human homolog of Sec61 β also complements the knockout in *S. pombe* and *S. cerevisiae*. These results further suggest that the distinct phenotypes associated with the Sec61 β deletion are

caused by downstream effects resulting from loss of a common function of the translocon β subunit that can be performed by any homolog.

Phylogenetic studies on Sec61 β /Sbh1p/SecE revealed that the consensus region for this protein is located at the hydrophobic peak corresponding to its TMD, while the N-terminal domain is more divergent and disordered (Cao and Saier 2003; Van den Berg et al. 2004). In many archaea, the N-terminal portion of Sec61 β homologs is almost twice smaller than their mammalian counterparts. In some eukaryotes, such as parasitic microsporidia, the N-terminal region of Sec61 β is practically as short as in archaea, and the protein still complements heat sensitivity of *S. cerevisiae sbh1 Δ sbh2 Δ* cells (Slamovits et al. 2006). Domain mapping of SC_Sec61 β showed that the N-terminal part is dispensable for normal rates of co-translational translocation, heat resistance, association with other translocon subunits and interaction with the SR (Feng et al. 2007; Jiang et al. 2008). This suggests that the TMD of Sec61 β is the critical region for protein function, while the larger N-terminal cytosolic part plays secondary roles. In this paper, we show that the fundamental function of the TMD of Sec61 β is conserved among distant species. Indeed, the *S. pombe*, *S. cerevisiae* and human TMD homologs complemented various defects caused by Sec61 β deletion in fission and budding yeasts, to levels comparable to the entire protein. This property is inherent to the TMD of Sec61 β , since other transmembrane sequences did not suppress the phenotypes associated with the Sec61 β -knockout in fission and budding yeast.

To date, the only precise function ascribed to the TMD of Sec61 β is its role as a tail anchor and ER localization signal. Disruption of this domain results in accumulation of Sec61 β in large cytoplasmic puncta (Stefanovic and Hegde 2007; Schuldiner et al. 2008), while N-terminal fragments of Sec61 β devoid of the TMD are unable to complement any known function of the protein in *S. cerevisiae* (Feng et al. 2007). Insertion of Sec61 β into the ER is not spontaneous, but requires recognition of the TMD by a post-translational targeting machinery, TRC40/Asna1 in mammals or the GET complex in yeast (Stefanovic and Hegde 2007; Schuldiner et al. 2008). Thus, it is conceivable that specific residues of the TMD are essential to recruit this complex to the ER membrane. Yet, other tail-anchored proteins, including the essential translocon γ

subunit, display lower conservation of the TMD than the β subunit, suggesting a key function for this domain in Sec61 β . Indeed, apart from its adaptor role in the translocon, the TMD of SC_Sec61 β 1 was also found in a distinct complex including Rtn1p, an exocyst-associated protein involved in ER reticulation (De Craene et al. 2006), suggesting additional localizations of Sec61 β in the ER (Feng et al. 2007). Nevertheless, the TMD of SC_Sec61 β 2, which is part of the second translocon complex in budding yeast (the Ssh1 complex) (Finke et al. 1996; Wilkinson et al. 2001; Wittke et al. 2002), also complements cold- and SDS- sensitivity in *S. pombe* (Figure 5). This suggests a redundant and conserved role for this domain. Considering the small size of these hydrophobic sequences, it is unlikely that it exerts a catalytic function, but interactions with conserved transmembrane proteins could mediate the central TMD function. As Sec61 β was also shown in crosslinking experiments to form dimers (Kalies et al. 1998), a role of the TMD in translocon oligomerization cannot be excluded (Hanein et al. 1996). The demonstration of a scaffolding or a recruiting function for the TMD of Sec61 β awaits further experimentation.

In sum, our results demonstrate a conserved biological role for the TMD of Sec61 β . Our observations support the notion that single-span TMDs have other functions than anchoring in the lipid bilayer. Indeed, many TMDs have been implicated in protein complex assembly, oligomerization, helix packing, transmembrane interactions and signal transduction (Moore et al. 2008). Sec61 β from *S. pombe* appears as an interesting model for elucidation of the cellular roles of a highly conserved TMD present in every living kingdom.

Materials and Methods

Strains and media

S. pombe strains were cultured in Edinburgh Minimal Medium (EMM) supplemented with required nutrients (Alfa 1993). *S. cerevisiae* strains were grown in synthetic defined media (SD) lacking appropriate amino acids (Sherman 1981). All strains were grown aerobically at 30°C unless stated otherwise. G418 was used at a concentration of 150 µg/mL. Yeast strains used in this study are listed in Table 1.

Plasmid constructions and transformation

Plasmids used in this study are described in Table 2. All oligonucleotide sequences are available upon request. The coding sequences of *sbh1*⁺ and *sss1*⁺ were amplified by PCR from a *S. pombe* cDNA library. Forward primers contained a *Nde*I restriction site followed by a sequence encoding the V5 epitope tag. Reverse primers contained a *Bam*HI restriction site. The entire ORFs were cloned into the pREP42 and pREP2 vectors (Maundrell 1993), at the *Nde*I and *Bam*HI sites. pREP42 contains a medium strength thiamine-repressible *nmt** promoter, while pREP2 contains a strong *nmt* promoter for overexpression (Forsburg and Sherman 1997). As previously described in *S. cerevisiae* (Feng et al. 2007), addition of a N-terminal tag on Sec61β had no effect on overexpression phenotypes nor complementation phenotypes (not shown). Amplification of the *SBH1* and *SBH2* genes was similarly achieved except that *S. cerevisiae* genomic DNA was used and no V5 tag was added. Amplification of *SEC61B* was carried out using a human cDNA bank as template. No V5 tag was added, and a *Bgl*II site was used instead of *Bam*HI. Cloning of *SBH1*, *SBH2* and *SEC61B* in pREP42 was performed as for *sbh1*⁺. For TMD constructs, the sequences encoding the 26 amino acids of the conserved transmembrane domains of each protein, as mapped by HMMTOP (Tusnady and Simon 1998), were cloned (see Figure 1 for amino-acid sequences). All TMD sequences were amplified to encode a V5 tag on the N-terminal side of the protein, and inserted into pREP42 using *Nde*I and *Bam*HI restriction sites. For cloning in p415, amplification of *sbh1*⁺, *SBH1*, *SBH2*, *SEC61B* and TMD constructs was carried out as

before but with primers containing *Bam*HI and *Xho*I restriction sites instead of *Nde*I and *Bam*HI, respectively. *SSSI* and *SSSI_TMD* were amplified from *S. cerevisiae* genomic DNA, adding a c-MYC tag instead of a V5 tag. The amplified sequences were inserted into the *Bam*HI/*Xho*I restriction sites of p415. All constructs were verified using standard DNA sequencing methods. Transformations were done by the PEG (Polyethylene glycol)/lithium acetate procedure (Elbe 1992). Plasmids derived from pREP42 were transformed into SP15039 and SP15074 (see below), while plasmids derived from pREP2 were transformed into SP556 and SP15073. Plasmids derived from p415 were transformed into SC3232. Transformations were confirmed by prototrophy and Western blotting.

Sporulation and mating

Strain SP15039 ($\Delta sbh1^+$) was obtained by sporulation of the heterozygous diploid BG_3365 (*h+/h+ ade6-M210/ade6-M216 leu1-32/leu1-32 ura4-D18/ura4-D18 sbh1⁺/Δsbh1::kan^R*) purchased from Bioneer (Daejeon, Korea). After identification of sporulating diploids by iodine staining, tetrads were dissected on EMM plates supplemented with adenine, uracil, leucine and histidine (AULH), using a Nikon Eclipse E400 micromanipulator. $\Delta sbh1$ cells were identified as G418 resistant, and the knockout was confirmed by PCR, Northern blotting and Southern blotting. Strains SP15073 and SP15074 were obtained by mating SP15039 with SP11033 (*h- his3-D1 leu1-32::adh1p_cell_3HA_adh1t_kan^R ura4-D18 Δcnx1::his3⁺ + pREP41cnx1⁺*) (Hajjar et al. 2007), which expresses *Aspergillus aculeatus* cellulase I under the control of the *adh1p* promoter. After mating on EMM+AULH plates, sporulation was induced in liquid EMM+G418 medium with low amounts of nitrogen. Asci were then subjected to random spore analysis (Jannatipour and Rokeach 1995). Clones bearing the *his3-D1* deletion were identified by histidine auxotrophy. Clones expressing the essential calnexin gene at the *cnx1⁺* locus instead of the pREP41*cnx1⁺* plasmid (leucine marker) were identified by leucine auxotrophy. Clones expressing cellulase were identified by the blue halo created on plates containing 0.1% (w/v) AZCL-HE-Cellulose chromogenic substrate (MegaZyme, North Rocks, N.S.W., Australia). $\Delta sbh1$ clones (SP15074) were identified

by their cold sensitivity at 23°C. The genomic background of each strain was further confirmed by multiple PCR analyses.

Microscopy imaging

Differential interference contrast (DIC) Nomarski imaging and DAPI-staining microscopy were carried out as previously described (Guerin et al. 2008). Microscopy analyses were performed with a fluorescence inverted microscope Nikon TE2000U. Images were acquired using a motion-picture camera CCD coolSnapFX M[®] 12 bit, and treated with UIC Metamorph[®] software. Flow cytometry analyses (FACS) were done using a FACS Calibur device (Becton Dickinson Biosciences) on 10,000 cells after dilution of exponential cultures to $OD_{595} = 0.5$ in PBS buffer (136 mM NaCl, 25 mM KCl, 12 mM NaHPO₄, 18 mM KH₂PO₄ pH 7.4).

Phenotypic assays

The sodium dodecyl sulfate (SDS) sensitivity measurements were carried out as described previously (Turcotte et al. 2007). Briefly, exponentially growing cells were spread on EMM+AL top agar (0.7%), following which 10 µL of 10% SDS was added on a small 3M paper at the center of each plate. After 3-5 days of incubation at 30°C or 23°C, area of the sensitivity halo was measured and reported on the WT value at 30°C. For temperature sensitivity assays, exponential cultures of each strain were diluted to $OD_{595} = 0.5$, serially diluted (10^{-1} - 10^{-4}), spotted on solid media (EMM+AL for *S. pombe* or SD-L for *S. cerevisiae*), and incubated at the indicated temperatures (7 days for *S. pombe* or 5 days for *S. cerevisiae*). All results are representative of at least 3 independent experiments.

Cellulase secretion assays

Cellulase secretion (Hajjar et al. 2007) was quantified by activity halo measurements at 30°C or 23°C. An equivalent of 0.2 OD_{595} of exponentially growing cells derived from strains SP15073 (WT) or SP15074 ($\Delta sbh1$) were spotted on EMM+ALH supplemented with 0.1% (w/v) AZCL-HE-Cellulose. The area of the blue halo created by secreted cellulase activity was measured each day during 7 days after

time zero, which was adjusted for every strain as the moment when the halo exceeds area of the colony (all colonies were of equal size). Each measure is the mean of 3 plates. Secretion rate was calculated for each strain by averaging the slope of independent experiments and divided them by the control strain value (100%) at the corresponding temperature.

Acknowledgments

We thank Bernhard Dobberstein and Randy Schekman for kind gifts of antibodies. We thank Tom A. Rapoport, Jaana Toikkanen and Jussi Jääntti for *S. cerevisiae* strains, antibodies and useful ideas. Pascal Chartrand is acknowledged for fruitful discussions as well as for plasmids and antibodies. Finally, we thank all the members of the Luis A. Rokeach lab for critical reading of the manuscript and technical assistance. This work was supported by a NSERC grant (#171325) to Luis A. Rokeach and by a NSERC scholarship to Alexandre Leroux.

Literature cited

- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., and Warbrick, E. . 1993. *Experiments with Fission Yeasts: Laboratory Course Manual*.
- Basi, G., Schmid, E., and Maundrell, K. 1993. TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* 123: 131-136.
- Boisrame, A., Chasles, M., Babour, A., Beckerich, J.M., and Gaillardin, C. 2002. Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* 115: 4947-4956.
- Brundage, L., Fimmel, C.J., Mizushima, S., and Wickner, W. 1992. SecY, SecE, and band 1 form the membrane-embedded domain of *Escherichia coli* preprotein translocase. *J Biol Chem* 267: 4166-4170.
- Cao, T.B., and Saier, M.H., Jr. 2003. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim Biophys Acta* 1609: 115-125.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G., and Thompson, J.D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497-3500.
- De Craene, J.O., Coleman, J., Estrada de Martin, P., Pypaert, M., Anderson, S., Yates, J.R., 3rd, Ferro-Novick, S., and Novick, P. 2006. Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 17: 3009-3020.
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., and Schekman, R. 1991. Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349: 806-808.
- Duong, F., and Wickner, W. 1997. Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J* 16: 2756-2768.
- Elbe, R. 1992. A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13: 18-19.
- Esnault, Y., Feldheim, D., Blondel, M.O., Schekman, R., and Kepes, F. 1994. SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J Biol Chem* 269: 27478-27485.
- Feng, D., Zhao, X., Soromani, C., Toikkanen, J., Romisch, K., Vembar, S.S., Brodsky, J.L., Keranen, S., and Jantti, J. 2007. The transmembrane domain is sufficient for Sbh1p function, its association with the Sec61 complex, and interaction with Rtn1p. *J Biol Chem* 282: 30618-30628.
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., and Sommer, T. 1996. A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J* 15: 1482-1494.
- Flower, A.M. 2001. SecG function and phospholipid metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 2006-2012.
- Forsburg, S.L., and Sherman, D.A. 1997. General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene* 191: 191-195.

- Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R.D., and Bairoch, A. 2003. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31: 3784-3788.
- Gorlich, D., and Rapoport, T.A. 1993. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75: 615-630.
- Guerin, R., Arseneault, G., Dumont, S., and Rokeach, L.A. 2008. Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by ER Stress in the Fission Yeast. *Mol Biol Cell*.
- Hajjar, F., Beaugard, P.B., and Rokeach, L.A. 2007. The 160 N-terminal residues of calnexin define a novel region supporting viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 24: 89-103.
- Hanein, D., Matlack, K.E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K.U., Miller, K.R., Rapoport, T.A., and Akey, C.W. 1996. Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87: 721-732.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Gorlich, D., Jentsch, S., and Rapoport, T.A. 1994. Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367: 654-657.
- Helmers, J., Schmidt, D., Glavy, J.S., Blobel, G., and Schwartz, T. 2003. The β -Subunit of the Protein-conducting Channel of the Endoplasmic Reticulum Functions as the Guanine Nucleotide Exchange Factor for the β -Subunit of the Signal Recognition Particle Receptor. *J. Biol. Chem.* 278: 23686-23690.
- Hori, O., Miyazaki, M., Tamatani, T., Ozawa, K., Takano, K., Okabe, M., Ikawa, M., Hartmann, E., Mai, P., Stern, D.M., et al. 2006. Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress. *Mol Cell Biol* 26: 4257-4267.
- Jannatipour, M., and Rokeach, L.A. 1995. The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J Biol Chem* 270: 4845-4853.
- Jiang, Y., Cheng, Z., Mandon, E.C., and Gilmore, R. 2008. An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. *J Cell Biol* 180: 1149-1161.
- Kalies, K.U., Gorlich, D., and Rapoport, T.A. 1994. Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol* 126: 925-934.
- Kalies, K.U., Rapoport, T.A., and Hartmann, E. 1998. The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol* 141: 887-894.
- Kinch, L.N., Saier, M.H., Jr., and Grishin, N.V. 2002. Sec61beta--a component of the archaeal protein secretory system. *Trends Biochem Sci* 27: 170-171.
- Kondratyev, M., Avezov, E., Shenkman, M., Groisman, B., and Lederkremer, G.Z. 2007. PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress. *Exp Cell Res* 313: 3395-3407.
- Lipschutz, J.H., Lingappa, V.R., and Mostov, K.E. 2003. The exocyst affects protein synthesis by acting on the translocation machinery of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 278: 20954-20960.
- Lopez, R., Silventoinen, V., Robinson, S., Kibria, A., and Gish, W. 2003. WU-Blast2 server at the European Bioinformatics Institute. *Nucleic Acids Res* 31: 3795-3798.

- Manting, E.H., and Driessen, A.J. 2000. Escherichia coli translocase: the unravelling of a molecular machine. *Mol Microbiol* 37: 226-238.
- Matsumoto, G., Mori, H., and Ito, K. 1998. Roles of SecG in ATP- and SecA-dependent protein translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13567-13572.
- Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123: 127-130.
- Moore, D.T., Berger, B.W., and DeGrado, W.F. 2008. Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. *Structure* 16: 991-1001.
- Mothes, W., Prehn, S., and Rapoport, T.A. 1994. Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* 13: 3973-3982.
- Muller, S., Sandal, T., Kamp-Hansen, P., and Dalboge, H. 1998. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14: 1267-1283.
- Nakatsukasa, K., and Brodsky, J.L. 2008. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* 9: 861-870.
- Nishiyama, K., Hanada, M., and Tokuda, H. 1994. Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J* 13: 3272-3277.
- Nishiyama, K., Mizushima, S., and Tokuda, H. 1993. A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J* 12: 3409-3415.
- Osumi, M., Yamada, N., Kobori, H., Taki, A., Naito, N., Baba, M., and Nagatani, T. 1989. Cell wall formation in regenerating protoplasts of *Schizosaccharomyces pombe*: study by high resolution, low voltage scanning electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 38: 457-468.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., and Rapoport, T.A. 1995. Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81: 561-570.
- Pilon, M., Schekman, R., and Romisch, K. 1997. Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16: 4540-4548.
- Pogliano, K.J., and Beckwith, J. 1993. The Cs sec mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics* 133: 763-773.
- Prinz, A., Hartmann, E., and Kalies, K.U. 2000. Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 381: 1025-1029.
- Rapoport, T.A. 2007. Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450: 663-669.
- Roitsch, T., and Lehle, L. 1988. Post-translational translocation of polypeptides across the mammalian endoplasmic reticulum membrane is size and ribosome dependent. *Eur J Biochem* 174: 699-705.

- Schuldiner, M., Metz, J., Schmid, V., Denic, V., Rakwalska, M., Schmitt, H.D., Schwappach, B., and Weissman, J.S. 2008. The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* 134: 634-645.
- Sherman, F., Fink, G. R., and Hicks, J. B. 1981. *Methods in Yeast Genetics*.
- Simon, S.M., and Blobel, G. 1991. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65: 371-380.
- Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E., and Iwahashi, H. 2004. Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Res* 38: 61-70.
- Slamovits, C.H., Burri, L., and Keeling, P.J. 2006. Characterization of a divergent Sec61beta gene in microsporidia. *J Mol Biol* 359: 1196-1202.
- Stefanovic, S., and Hegde, R.S. 2007. Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128: 1147-1159.
- Toikkanen, J., Gatti, E., Takei, K., Saloheimo, M., Olkkonen, V.M., Soderlund, H., De Camilli, P., and Keranen, S. 1996. Yeast protein translocation complex: isolation of two genes SEB1 and SEB2 encoding proteins homologous to the Sec61 beta subunit. *Yeast* 12: 425-438.
- Toikkanen, J.H., Miller, K.J., Soderlund, H., Jantti, J., and Keranen, S. 2003. The {beta} Subunit of the Sec61p Endoplasmic Reticulum Translocon Interacts with the Exocyst Complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278: 20946-20953.
- Toikkanen, J.H., Sundqvist, L., and Keranen, S. 2004. *Kluyveromyces lactis* SSO1 and SEB1 genes are functional in *Saccharomyces cerevisiae* and enhance production of secreted proteins when overexpressed. *Yeast* 21: 1045-1055.
- Turcotte, C., Roux, A., Beauregard, P.B., Guerin, R., Senechal, P., Hajjar, F., and Rokeach, L.A. 2007. The calnexin-independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 7: 196-208.
- Tusnady, G.E., and Simon, I. 1998. Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: application to topology prediction. *J Mol Biol* 283: 489-506.
- Valcarcel, R., Weber, U., Jackson, D.B., Benes, V., Ansorge, W., Bohmann, D., and Mlodzik, M. 1999. Sec61beta, a subunit of the protein translocation channel, is required during *Drosophila* development. *J Cell Sci* 112 (Pt 23): 4389-4396.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M., Jr., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., and Rapoport, T.A. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44.
- Vega, R., and Dominguez, A. 1986. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Yarrowia lipolytica*. *Arch. Microbiol.* 144: 124-130.
- Vergeres, G., and Waskell, L. 1992. Expression of cytochrome b5 in yeast and characterization of mutants of the membrane-anchoring domain. *J Biol Chem* 267: 12583-12591.
- Walter, P., and Lingappa, V.R. 1986. Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 2: 499-516.
- Wang, B., Heath-Engel, H., Zhang, D., Nguyen, N., Thomas, D.Y., Hanrahan, J.W., and Shore, G.C. 2008. BAP31 interacts with Sec61 translocons and promotes retrotranslocation of CFTRDeltaF508 via the derlin-1 complex. *Cell* 133: 1080-1092.

- Wickner, W., Driessen, A.J., and Hartl, F.U. 1991. The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu Rev Biochem* 60: 101-124.
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., and Ploegh, H.L. 1996. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384: 432-438.
- Wilkinson, B.M., Tyson, J.R., and Stirling, C.J. 2001. Ssh1p determines the translocation and dislocation capacities of the yeast endoplasmic reticulum. *Dev Cell* 1: 401-409.
- Wittke, S., Dunnwald, M., Albertsen, M., and Johnsson, N. 2002. Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13: 2223-2232.
- Yamaguchi, A., Hori, O., Stern, D.M., Hartmann, E., Ogawa, S., and Tohyama, M. 1999. Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol* 147: 1195-1204.
- Yang, Z.J., Zhou, J.P., Li, G.R., Zhang, Y., and Ren, Z.L. 2007. [Cloning and expression of *Gymnadenia conopsea* GcSec61beta gene encoding endoplasmic reticulum membrane translocation channel protein]. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 33: 354-360.

Tables

Table I. Yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
<i>S. pombe</i>		
SP556	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18</i>	Paul Nurse Lab
SP15039	<i>h+ ade6-M210 leu1-32 ura4-D18 Δsbh1::kan^R</i>	Bioneer
SP15073	<i>h+ ade6-M210 his3-D1 leu1-32::adh1p_cell_3HA_adh1t_kan^R ura4-D18</i>	This study
SP15074	<i>h- ade6-M216 his3-D1 leu1-32::adh1p_cell_3HA_adh1t_kan^R ura4-D18 Δsbh1::kan^R</i>	This study
<i>S. cerevisiae</i>		
NY179	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52</i>	Peter Novick Lab
SC3232	<i>MATa sbh1Δ::kan^R sbh2Δ::hph^R leu2-3,112 ura3-52</i>	Jussi Jäntti Lab

Table II. Plasmids used in this study

Plasmid	Features	Source
<i>S. pombe</i>		
pREP42	Multicopy <i>S. pombe</i> expression vector with <i>ura4⁺</i> selectable marker and mild <i>nmt*</i> promoter	(Basi et al. 1993; Maundrell 1993)
pREP42-SP_ <i>sbh1</i>	pREP42 containing <i>S. pombe sbh1⁺</i> tagged with V5 (N-terminal)	This study
pREP42-SC_ <i>SBH1</i>	pREP42 containing <i>S. cerevisiae SBH1</i>	This study
pREP42-SC_ <i>SBH2</i>	pREP42 containing <i>S. cerevisiae SBH2</i>	This study
pREP42-HS_ <i>SEC61B</i>	pREP42 containing human <i>SEC61B</i>	This study
pREP42-SP_ <i>sss1</i>	pREP42 containing <i>S. pombe sss1⁺</i> tagged with V5 (N-terminal)	This study
pREP42-SP_ <i>sbh1TMD</i>	pREP42 containing <i>S. pombe V5-sbh1_TMD</i> (amino acids 68 to 93)	This study
pREP42-SC_ <i>SBH1TMD</i>	pREP42 containing <i>S. cerevisiae V5-SBH1_TMD</i> (amino acids 50 to 75)	This study
pREP42-SC_ <i>SBH2TMD</i>	pREP42 containing <i>S. cerevisiae V5-SBH2_TMD</i> (amino acids 57 to 82)	This study
pREP42-HS_ <i>SEC61BTMD</i>	pREP42 containing Human <i>V5-SEC61B_TMD</i> (amino acids 66 to 91)	This study
pREP42-SP_ <i>sss1TMD</i>	pREP42 containing <i>S. pombe V5-sss1_TMD</i> (amino acids 30 to 55)	This study
pREP2	Multicopy <i>S. pombe</i> expression vector with <i>ura4⁺</i> selectable marker and strong <i>nmt</i> promoter	(Basi et al. 1993; Maundrell 1993)
pREP2-SP_ <i>sbh1</i>	pREP2 containing <i>S. pombe sbh1⁺</i> tagged with V5 (N-terminal)	This study
pREP2-SP_ <i>sss1</i>	pREP2 containing <i>S. pombe sss1⁺</i> tagged with V5 (N-terminal)	This study
<i>S. cerevisiae</i>		
p415	pRS415 containing Venus fluorescent protein under <i>ADH1</i> promoter and <i>LEU2</i> marker. (Venus was removed in the other constructions)	Pascal Chartrand Lab
p415-SP_ <i>sbh1</i>	p415 containing <i>S. pombe sbh1⁺</i> tagged with V5 (N-terminal)	This study
p415-SC_ <i>SBH1</i>	p415 containing <i>S. cerevisiae SBH1</i>	This study
p415-SC_ <i>SBH2</i>	p415 containing <i>S. cerevisiae SBH2</i>	This study
p415-HS_ <i>SEC61B</i>	p415 containing Human <i>SEC61B</i>	This study
p415-SC_ <i>SSS1</i>	p415 containing <i>S. cerevisiae SSS1</i> tagged with c-MYC (N-terminal)	This study
p415-SP_ <i>sbh1TMD</i>	p415 containing <i>S. pombe V5-sbh1_TMD</i> (amino acids 68 to 93)	This study
p415-SC_ <i>SBH1TMD</i>	p415 containing <i>S. cerevisiae V5-SBH1_TMD</i> (amino acids 50 to 75)	This study
p415-SC_ <i>SBH2TMD</i>	p415 containing <i>S. cerevisiae V5-SBH2_TMD</i> (amino acids 57 to 82)	This study
p415-HS_ <i>SEC61BTMD</i>	p415 containing Human <i>V5-SEC61B_TMD</i> (amino acids 66 to 91)	This study
p415-SC_ <i>SSS1TMD</i>	p415 containing <i>S. cerevisiae c-MYC-SSS1_TMD</i> (amino acids 49 to 71)	This study

Figures

```

SP_Sec61β  1  MSSTKASG SVKNSAASAPGGPKSQIRRRAAVEKNTKESNSGPAGARAAGAP  51
SC_Sec61β1 1  -----MSSPTPPGGQRTLQKRKQSS--OKVAASAPKKN-----T  33
SC_Sec61β2 1  -----MAASVPPGGQRILOKRRQAOSIKEKQAKQTPSTSTROAGYG  40
HS_Sec61β  1  MPGPTPSG--TNVGS SGRSPSKAVAAARAAGSTVRQRKNASCGRSAGRTTS  49

SP_Sec61β  52  GSTPTLLKLYTDEASGFKVDPVVVMVLSVGF IASVFL LHI VARILKKFASE  102
SC_Sec61β1 34  NSNNSILK IYSDEATGLRVDPLVVLFLAVGF IFSVVALHVISKVAGKLF--  82
SC_Sec61β2 41  GSSSSILKLYTDEANGFRVDSL VVLF LSVGF IFSVIALHLLTKFTHII---  88
HS_Sec61β  50  AGTGGMWRFYTEDSPGLKVGPV PVLVMSLLFIASVFMLHIWGKYTRS----  96

```

Transmembrane domain

Figure 1. The translocon β subunit is conserved from yeast to human

Amino-acid sequence comparison between translocon beta subunits of *S. pombe* (SP_Sec61 β), *S. cerevisiae* (SC_Sec61 β 1 and SC_Sec61 β 2) and human (HS_Sec61 β). Identical amino acids are shaded in black, similar amino acids are shaded in grey. The predicted conserved transmembrane domain is underlined.

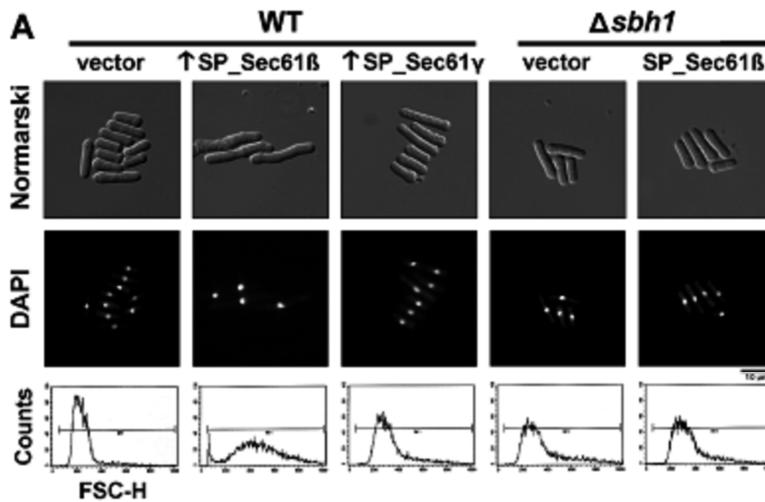


Figure 2. Phenotypes associated with the knockout and overexpression of SP_Sec61 β

(A) Morphologic comparison between strains. WT cells (SP556), cells overexpressing *S. pombe* translocon β subunit ($\uparrow SP_Sec61\beta$) or γ subunit ($\uparrow SP_Sec61\gamma$) and cells deleted for the SP_Sec61 β encoding gene (SP15039, $\Delta sbh1$) with or without a plasmid encoding SP_Sec61 β were cultured to exponential phase, stained with DAPI (as nuclear marker) and analyzed by Normarski (upper panel) or fluorescent microscopy (middle panel). Cell size distribution was assessed by cell sorting of 10,000 cells (lower panel).

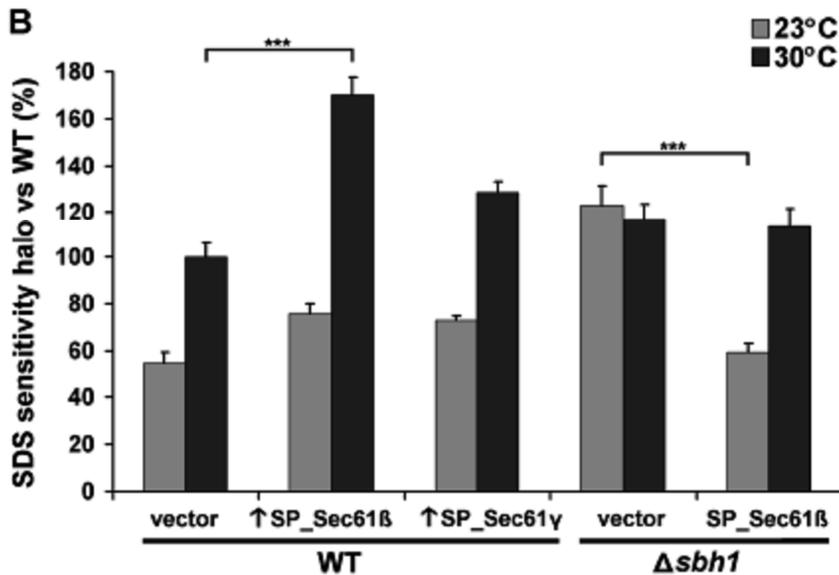


Figure 2. Phenotypes associated with the knockout and overexpression of $SP_Sec61\beta$

(B) SDS sensitivity comparison between strains. Three exponential cultures of WT and $\Delta sbh1$ cells bearing the indicated plasmids were spread on top-agar MM+AL, following which a drop of 10 μ L of SDS 10% was added on the center of each plate. After 3-5 days of incubation at the indicated temperatures, the area of the dead-cell halo was measured and reported to the WT strain at 30°C (100%). Data shown are mean \pm standard deviation of three or more independent experiments. *** indicates $p < 0.001$ for Student's t-test.

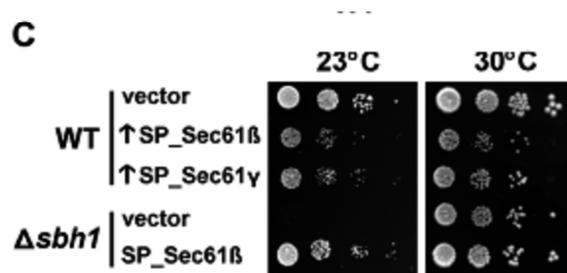


Figure 2. Phenotypes associated with the knockout and overexpression of SP_Sec61β

(C) Growth of WT and *Δsbh1* strains devoid or overexpressing SP_Sec61β or SP_Sec61γ at different temperatures. Exponential cultures were serially-diluted (10^{-1} - 10^{-4}) and spotted on EMM+AL plates. Growth was monitored for 7 days at the indicated temperatures. Results are representative of three or more independent experiments.

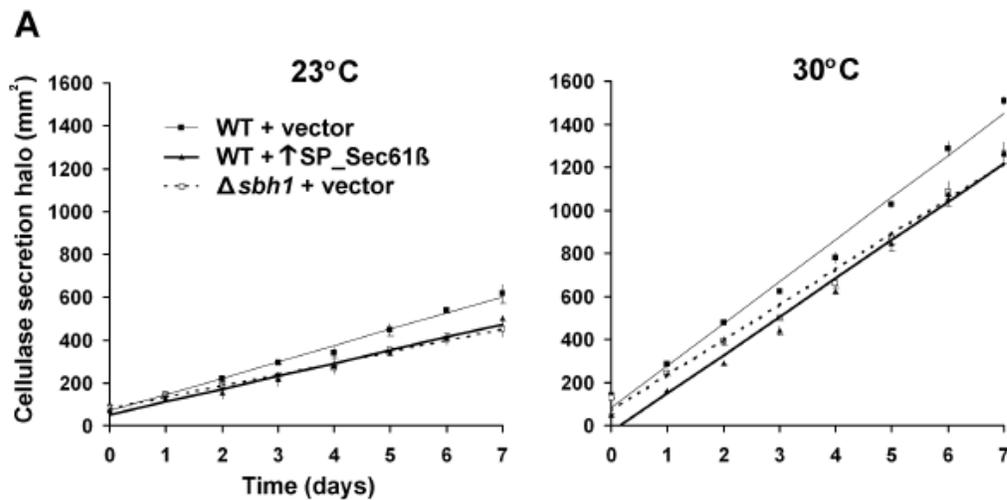


Figure 3. Effects of SP_Sec61 β levels on protein secretion(A) Cellulase secretion efficiency at different temperatures. WT (SP15073) and $\Delta sbh1$ (SP15074) cells expressing *A. aculeatus* cellulase from a genomic cassette under the control of the *adh1p* promoter, and bearing the empty vector or a plasmid overexpressing (\uparrow) SP_Sec61 β were analyzed for secretion. Cells were grown to exponential phase and spotted on EMM+ALH plates supplemented with 0.1% AZCL-HE-cellulose as substrate. The area of the blue halo created after cleavage of the chromogenic substrate by secreted cellulase was monitored for 7 days at 30°C or at 23°C. Time zero represents the moment when area of the halo exceeds the area under the colony. Each point is the mean \pm standard deviation of three independent cultures.

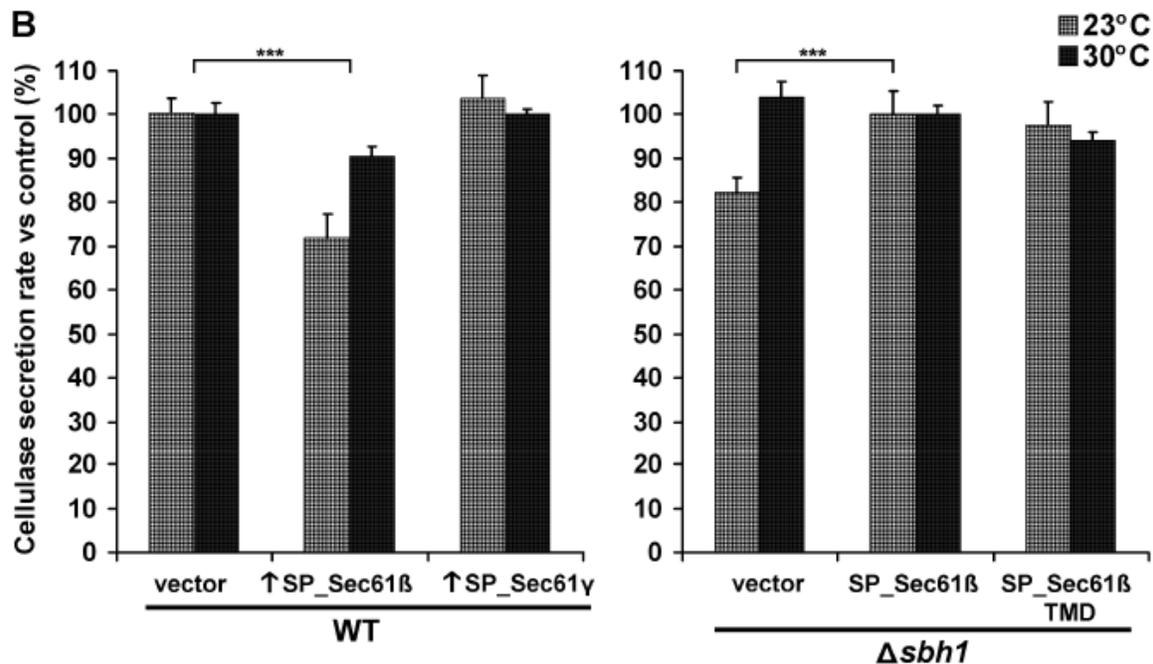


Figure 3. Effects of SP_Sec61β levels on protein secretion

(B) Rate of cellulase secretion at different temperatures. Secretion rates for strains presented in (A) were calculated as the mean slope of three independent cultures, using the WT value (left panel) or the complemented knockout (right panel) at the corresponding temperature as 100% (\pm standard deviation). WT cells overexpressing SP_Sec61γ and $\Delta sbh1$ cells bearing a plasmid encoding SP_Sec61β or its transmembrane domain only (TMD) are shown as controls. *** indicates $p < 0.001$ for Student's t-test.

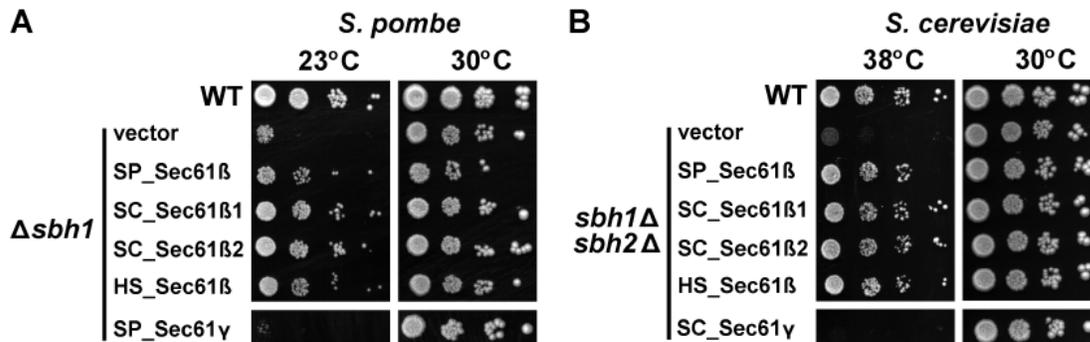


Figure 4. Different homologs complement the phenotypes of the Sec61 β knockout in fission and budding yeast(A) Cold sensitivity of *S. pombe* $\Delta sbh1$ cells is rescued by different Sec61 β homologs. *S. pombe* $\Delta sbh1$ cells (SP15039) expressing different Sec61 β homologs from *S. pombe* (SP), *S. cerevisiae* (SC) or human (HS) were serially-diluted (10^{-1} - 10^{-4}) and spotted on MM+AL plates. Growth was monitored during 7 days at the indicated temperatures. SP_Sec61 γ was used as a negative control. Results are representative of three or more independent experiments.

(B) Heat sensitivity of *S. cerevisiae* $sbh1\Delta sbh2\Delta$ cells is rescued by different Sec61 β homologs. *S. cerevisiae* $sbh1\Delta sbh2\Delta$ cells (SC3232) expressing Sec61 β homologs from *S. pombe* (SP), *S. cerevisiae* (SC) or human (HS) were serially-diluted (10^{-1} - 10^{-4}) and spotted on SD-L plates. Growth was monitored during 5 days at the indicated temperatures. SC_Sec61 γ was used as a negative control. Results are representative of three or more independent experiments.

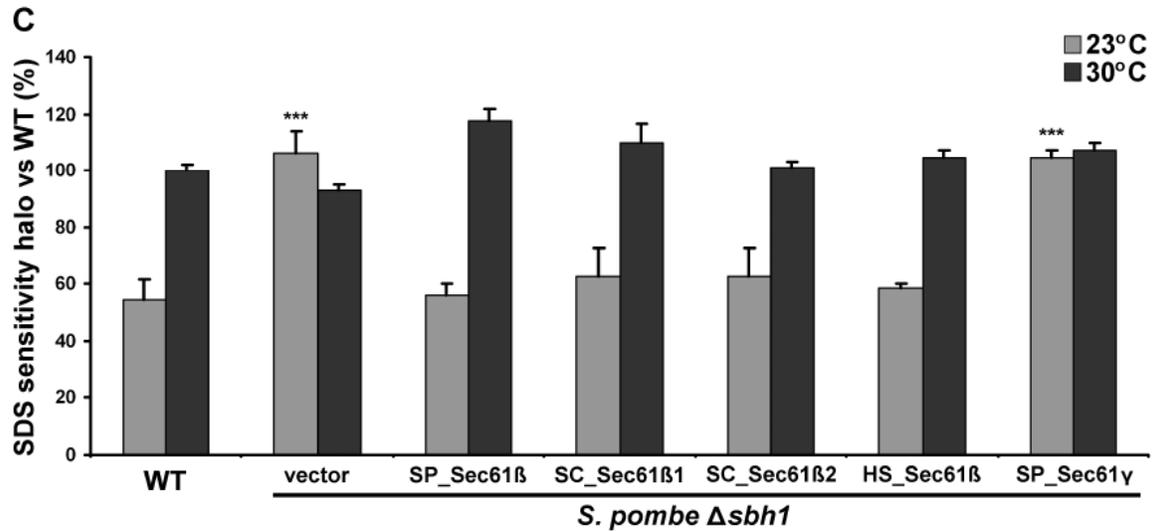


Figure 4. Different homologs complement the phenotypes of the Sec61β knockout in fission and budding yeast

(C) Suppression of *S. pombe* Δ*sbh1* SDS sensitivity by different Sec61β homologs. SDS-sensitivity halo was measured after 3-5 days of incubation at the indicated temperatures for cultures of the strains presented in (A). Data shown are mean ± standard deviation of three or more independent experiments. *** indicates $p < 0.001$ for Student's t-test versus WT.

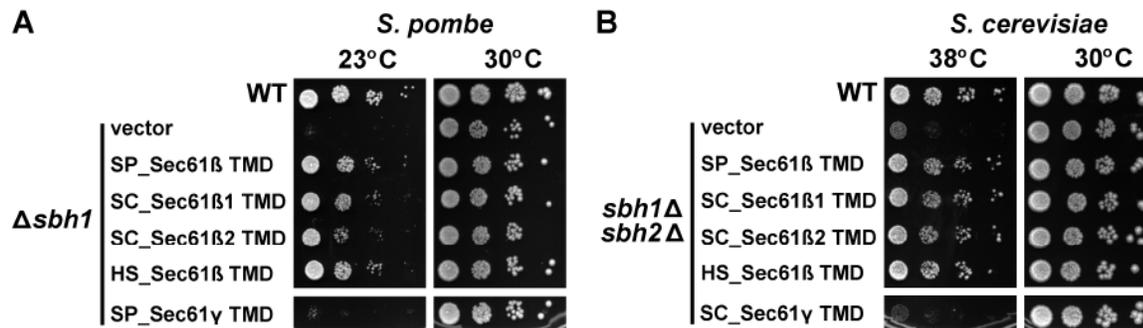


Figure 5. The transmembrane domain (TMD) of different Sec61 β homologs is sufficient to complement the knockout of the whole gene in fission and budding yeast(A) Cold sensitivity of *S. pombe* $\Delta sbh1$ cells (SP15039) and (B) heat sensitivity of *S. cerevisiae* *sbh1* Δ *sbh2* Δ cells (SC3232) are rescued by the TMD of different Sec61 β homologs. $\Delta sbh1$ and *sbh1* Δ *sbh2* Δ cells expressing the 26 amino acids of the TMD of Sec61 β homologs from *S. pombe* (SP), *S. cerevisiae* (SC) and human (HS) were serial-diluted (10^{-1} - 10^{-4}) and spotted on MM+AL plates or SD-L plates. Growth was monitored during 5 days for *S. cerevisiae* and 7 days for *S. pombe* at the indicated temperatures. Sec61 γ from *S. pombe* (SP) or *S. cerevisiae* (SC) were used as negative controls. Results are representative of three or more independent experiments.

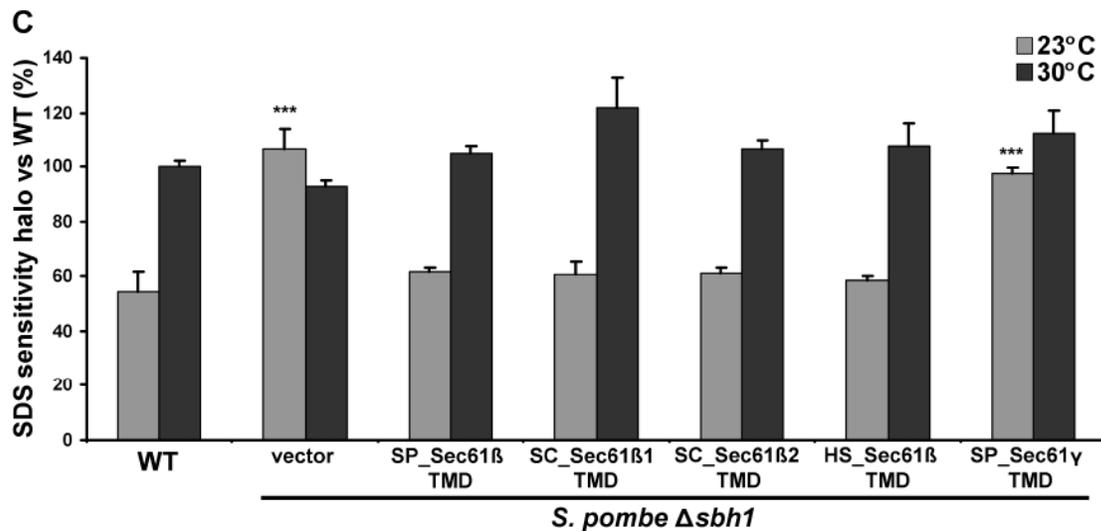


Figure 5. The transmembrane domain (TMD) of different Sec61 β homologs is sufficient to complement the knockout of the whole gene in fission and budding yeast

(C) Suppression of *S. pombe* $\Delta sbh1$ SDS sensitivity by the TMD of different Sec61 β homologs. SDS-sensitivity halo was measured after 3-5 days of incubation at the indicated temperatures for cultures of the strains presented in (A). Data shown are mean \pm standard deviation of three or more independent experiments. *** indicates $p < 0.001$ for Student's t-test versus WT.

Chapitre III

Discussion

3.1 Retour sur la problématique

La sécrétion des protéines est un processus qui touche toutes les cellules et qui a un effet direct sur notre vie quotidienne. Que ce soit pour guérir le diabète ou pour produire des enzymes industrielles à grande échelle, la compréhension de cette voie métabolique est primordiale au développement de nouvelles applications biotechnologiques et pharmaceutiques. En tant que porte d'entrée de la voie de sécrétion, le translocon constitue un acteur clé dans la sécrétion des protéines en régulant directement l'efficacité de la voie. Pendant des années, les chercheurs ont étudié avec minutie et rigueur la fonction et la structure des composantes de ce large complexe multiprotéique, pour ne laisser que Sec61 β , la sous-unité paradoxale du translocon, comme mystère non résolu. Grâce à mon projet de recherche, un pas de plus est franchi dans la compréhension de cette protéine énigmatique.

D'abord, mon étude caractérise pour la première fois la sous-unité β du translocon chez *S. pombe*, une levure à fission beaucoup plus proche des mammifères que ne l'est la levure du boulanger. Des phénotypes spécifiques à *S. pombe* sont observés suite à la délétion de SP_Sec61 β , dont une sensibilité au froid drastique, accompagnée d'une sensibilité au SDS et des défauts de sécrétion à basse température. Des phénotypes sont aussi associés à la surexpression de la protéine, dont une élongation cellulaire et une diminution de la sécrétion. Ensuite, je montre que plusieurs homologues de Sec61 β , présentant pourtant des séquences d'acides aminés différentes, sont tout aussi capables que la protéine endogène de compléter les phénotypes de la délétion chez *S. pombe* et *S. cerevisiae*. Ceci démontre que la sous-unité β du translocon accomplit une fonction conservée de la levure à l'homme, et suggère que les phénotypes spécifiques observés entre diverses espèces sont dus à des différences indépendantes de la structure de Sec61 β . Enfin, de façon remarquable, je montre que le domaine transmembranaire (TMD) de la sous-unité β du translocon est suffisant à lui seul pour compléter plusieurs phénotypes de la délétion dans deux levures distinctes, peu importe de quel organisme le TMD de Sec61 β provient. Ces résultats renforcent l'idée selon laquelle les TMDs à passage transmembranaire unique peuvent avoir des rôles surpassant un simple ancrage membranaire [249]. Globalement, mes résultats posent Sec61 β comme un excellent

modèle d'étude pour élucider cette fonction primordiale d'un TMD hautement conservé entre les espèces.

3.2 Regard sur les différents phénotypes associés à Sec61 β

L'étude de la sous-unité β du translocon chez la levure à fission a permis d'identifier de multiples phénotypes associés à sa délétion ou sa surexpression. Étonnamment, la plupart des phénotypes ainsi découverts sont très distincts, voire opposés, aux phénotypes associés à cette protéine dans d'autres organismes. Plusieurs facteurs pourraient être à l'origine de ces différences.

3.2.1 Différences structurelles des homologues

L'explication la plus simple pour les multiples phénotypes associés à Sec61 β dans différentes espèces serait que chaque homologue supporte une fonction spécifique. Ainsi, on pourrait supposer qu'au cours de l'évolution, des mutations progressives ont modifié la fonction de la protéine pour l'adapter aux besoins de chaque espèce. Ceci semble particulièrement évident pour l'homologue procaryote de la sous-unité β , SecG. En effet, l'inversion de topologie des deux domaines transmembranaires de SecG autour d'une région charnière hydrophobe, qui facilite l'insertion membranaire et l'activité ATPase de SecA, est un phénotype exclusivement observé chez les bactéries [215,216]. Les eucaryotes et les archées sont dépourvus non seulement d'un second TMD, mais aussi de SecA [27]. En outre, SecG est extrêmement divergent du point de vue structurel comparé à Sec61 β , si bien qu'on a longtemps cru qu'il n'y avait pas de lien évolutif entre ces protéines, avant qu'un lien éloigné ne soit finalement démontré [1]. Dans le même esprit, le présumé domaine GEF de SC_Sec61 β n'est retrouvé qu'avec une très faible similarité de séquence dans d'autres espèces [240], ce qui pourrait expliquer une fonction spécifique de *S. cerevisiae*. Toutefois, en général, il s'avère très difficile d'expliquer chaque phénotype associé à Sec61 β par de simples divergences de séquence, pour plusieurs raisons. D'abord, chez les eucaryotes, la sous-unité β est très conservée, même entre des espèces qui présentent des phénotypes distincts associés à la délétion [1] (Figure 1). Ensuite, Sec61 β ne présente pratiquement aucun domaine dans sa région N-

terminal qui pourrait expliquer des fonctions particulières de la protéine (site de phosphorylation, motif de reconnaissance protéique, etc.). De plus, même si le domaine N-terminal de Sec61 β semble déstructuré [29], il se superpose bien d'une espèce à l'autre, si bien que des contraintes structurelles majeures ne peuvent pas expliquer ses différentes fonctions [11]. Enfin, de façon importante, mon étude démontre que plusieurs homologues de Sec61 β (*S. cerevisiae*, *S. pombe* et humain) peuvent tous intercomplémenter les phénotypes associés à la délétion de Sec61 β . Ceci suggère que des divergences de séquence ne sont pas responsables de plusieurs phénotypes associés à la sous-unité β , puisque chaque homologue de Sec61 β peut les compléter au même niveau que la protéine endogène. Ainsi, chaque phénotype doit être évalué indépendamment pour déterminer si l'effet observé est véritablement spécifique à la sous-unité β de l'organisme en question, ou résulterait plutôt d'une différence située en aval d'une fonction conservée de Sec61 β à travers les espèces. Par exemple, il serait intéressant de tester si SecE peut également compléter les phénotypes de Sec61 β chez *S. pombe* et *S. cerevisiae*.

3.2.2 Différences dans des voies métaboliques

Si des homologues distincts de Sec61 β peuvent compléter la délétion du gène aussi bien que la protéine endogène, c'est que les phénotypes spécifiques de chaque espèce sont dus à autre chose que des différences de séquence dans cette protéine. Ainsi, il faut chercher ailleurs l'explication à la thermosensibilité opposée des cellules dépourvues de Sec61 β chez *S. pombe* et *S. cerevisiae* (Figure 2C). À ce titre, la sensibilité au froid de *S. pombe* semble plus facile à expliquer. En effet, il est connu que la voie de sécrétion est intrinsèquement sensible au froid [250], notamment parce que la fluidité membranaire diminue à basse température [251]. Plusieurs mutants de la voie *sec* bactérienne et eucaryote sont sensibles au froid plutôt qu'au chaud [252]. De plus, la translocation *in vitro* est diminuée à basse température, autant chez les bactéries que chez l'humain [137,210]. Enfin, l'homologue de Sec61 β de *Gymnadenia conopsea*, une plante psychrophyle, est surexprimé à basse température [236]. Chez *S. pombe*, je montre en outre que SP_Sec61 β est nécessaire pour éviter une diminution de sécrétion à 23°C. Donc, c'est plutôt l'absence de sensibilité au froid de *S. cerevisiae* qui est inattendue.

Comme *S. cerevisiae* est également une exception au niveau du mode de translocation prédominant (post-traductionnel plutôt que co-traductionnel [247]), on pourrait émettre l'hypothèse que les différences de thermosensibilité sont dues à des différences dans les voies de translocation de chaque levure. Pour tester cette idée, il serait intéressant de vérifier si la délétion de Sec61 β chez *Y. lipolytica*, une autre levure utilisant majoritairement la voie co-traductionnelle, rend également les cellules sensibles à basse température plutôt qu'à haute température.

En effet, outre *S. cerevisiae*, *Y. lipolytica* apparaît également comme un bon modèle de comparaison, à la fois à cause de sa ressemblance par rapport à *S. pombe* au niveau de la sécrétion des protéines et de sa différence en tant que levure polymorphique. Notamment, les cellules $\Delta sbh1$ de *Y. lipolytica* forment des colonies dont la morphologie est altérée et sont hyper-résistantes au SDS [96]. À l'inverse, chez *S. pombe*, les cellules deviennent très sensibles au SDS, et c'est la surexpression de SP_Sec61 β plutôt que sa délétion qui cause une altération de la morphologie cellulaire (Figure 2A-B). Ainsi, il semble y avoir des effets opposés des homologues de Sec61 β sur l'intégrité et la morphologie des différentes levures. À supposer que ces différences ne soient pas dues à des divergences de séquence de Sec61 β , il est possible qu'elles soient plutôt reliées à des différences dans la formation et la composition de la paroi de ces levures. En effet, *Y. lipolytica* présente une architecture de paroi très différente de *S. pombe* [253].

Par ailleurs, deux autres phénotypes intéressants ont été rapportés chez *Y. lipolytica*, mais pas chez *S. cerevisiae*, à savoir l'effet de YL_Sec61 β sur la réponse UPR et l'interaction physique avec la calnexine, une chaperone du RE [96]. En testant ces deux phénotypes chez la levure à fission, j'ai montré que SP_Sec61 β n'avait pas d'effet notable sur le UPR (voir Annexe 4.1), mais que la protéine était retrouvée en complexe avec la calnexine et BiP, une autre chaperone du RE située à proximité du translocon (voir Annexe 4.2). Ces résultats indiquent que Sec61 β fait partie d'un large complexe multiprotéique, et renforce l'idée selon laquelle le translocon forme un supercomplexe stabilisé par de multiples interactions moléculaires [84]. Il serait intéressant de poursuivre ces investigations pour déterminer l'importance de ces interactions, d'autant que la liaison semble située à proximité du domaine

transmembranaire de Sec61 β , et que le TMD de la calnexine a été impliqué dans plusieurs processus métaboliques, dont l'apoptose en réponse à des stress du RE [254].

3.2.3 Différences dans le sécrétome

Enfin, il est également possible que les nombreux phénotypes associés à Sec61 β soient causés par des différences dans les protéines sécrétées lorsque la protéine est délétée ou surexprimée. En effet, chez *S. cerevisiae*, la double délétion des paralogues de SC_Sec61 β cause une diminution drastique de la sécrétion d'une protéine rapporteuse (47 %), alors que sa surexpression l'augmente jusqu'à 2,3 fois [197,223]. Par contre, chez *Y. lipolytica* et *S. pombe* ([96] et Figure 3), la délétion de Sec61 β n'affecte pas la sécrétion à température normale. Ainsi, l'effet du niveau d'expression de Sec61 β sur la sécrétion n'est apparent que chez la levure du boulanger, réputée pour sa faible efficacité de sécrétion [248]. Remarquablement, chez *S. pombe*, une diminution de la sécrétion des cellules $\Delta sbh1$ est observée à basse température, alors que la sécrétion est déjà diminuée de l'ordre de 62 % (Figure 3). En combinaison avec les résultats de translocation *in vitro* réalisés chez les mammifères, qui ont montré un rôle cinétique non essentiel de Sec61 β [238], ces données supportent l'idée que Sec61 β n'est crucial pour la sécrétion que si la voie est ralentie ou perturbée. Comme *S. cerevisiae* n'est pas très compétent pour la sécrétion [248], il apparaît donc logique que la délétion de la sous-unité β du translocon ait un effet plus marqué dans cette levure [197]. Ceci pourrait également expliquer pourquoi Sec61 β complémente des mutants du complexe exocyste et pourquoi Sec61 β est synthétique létal avec des mutants du SR [115,199]. À l'opposé, comme *S. pombe* est beaucoup plus compétent pour la sécrétion, l'effet de la délétion de Sec61 β pourrait n'être observable que lorsque la sécrétion est déjà sévèrement diminuée, comme c'est le cas à basse température. En outre, le fait qu'une surexpression de Sec61 β diminue également la sécrétion chez *S. pombe* suggère que le processus est déjà optimisé chez la levure à fission, et qu'une hausse additionnelle de Sec61 β ne fait que perturber l'homéostasie du translocon (ratio normal des sous-unités de 1:1:1). Pour poursuivre ces études, il serait intéressant de tester l'importance de SP_Sec61 β dans d'autres conditions qui perturbent la sécrétion, comme des mutants du complexe exocyste, des mutants de d'autres sous-unités du translocon et des mutants du SR.

3.3 L'importance du domaine transmembranaire de Sec61 β

En somme, mon étude démontre que les différences de séquence entre homologues de Sec61 β ne sont pas responsables de tous les phénotypes associés à la protéine, mais que ces derniers pourraient être expliqués par des différences dans le métabolisme de chaque organisme. C'est donc dire que Sec61 β possède une fonction universelle pouvant être réalisée par tous ses homologues, mais que cette fonction se répercute en aval différemment selon les espèces. Il reste donc à déterminer quelle est cette fonction universelle de Sec61 β , et quel est son siège structural dans la protéine. Ici, je franchis une étape importante dans cette direction en démontrant que le domaine transmembranaire de Sec61 β est capable à lui seul de compléter des phénotypes associés à la protéine entière, et que cette fonction du TMD est conservée d'une espèce à l'autre (Figure 4 et 5). Plusieurs fonctions potentielles du TMD de la sous-unité β du translocon peuvent expliquer ces résultats.

3.3.1 Rôle d'ancre membranaire et de localisation cellulaire

La sous-unité β du translocon est une protéine de type TA [62]. En tant que telle, son TMD joue un rôle fondamental à la fois en tant qu'ancre membranaire et en tant que signal de localisation au RE [222]. Bien que le mécanisme d'intégration des protéines TA ne soit pas bien connu, l'ATPase responsable de la reconnaissance et du ciblage des protéines TA a récemment été identifiée. Chez les mammifères, c'est le complexe TRC40/Asna1 qui reconnaît spécifiquement le TMD de Sec61 β , alors que chez *S. cerevisiae*, c'est le complexe GET (Golgi ER trafficking) qui accomplit la même fonction [64,65]. Étonnamment, les complexes TRC40/Asna1 et GET ne sont pas essentiels à la viabilité, démontrant que l'ensemble des protéines TA ne sont pas requises ou que leur faible insertion spontanée est suffisante pour assurer la survie. La délétion de ces complexes entraîne l'accumulation de Sec61 β et des autres protéines TA sous forme d'agrégats insolubles dans le cytosol [65]. Un phénotype identique est aussi observé lorsqu'on retire le TMD de Sec61 β , ce qui explique probablement pourquoi aucun mutant N-terminal de Sec61 β ne peut compléter de phénotypes de la délétion [64]. Il apparaît donc que le TMD de Sec61 β est suffisant à lui seul pour diriger son intégration

membranaire, bien que les motifs structuraux précis nécessaires à cette fonction demeurent inconnus. Ceci est confirmé par le fait que le TMD de Sec61 β interagit avec les sous-unités α et γ du translocon, démontrant son intégration membranaire correcte [197]. Ici, je montre que plusieurs homologues du TMD de Sec61 β peuvent compléter des fonctions de la protéine entière dans deux levures distinctes. Ceci suggère fortement que tous les TMDs (dont celui de l'humain) sont intégrés correctement à la membrane à la fois chez *S. pombe* et *S. cerevisiae*, ce qui implique que les complexes TRC40/Asn1 et GET emploient les mêmes motifs structuraux pour discriminer parmi les protéines TA et les autres TMDs qui sont reconnus par le complexe SRP. En se servant d'alignements de séquences de Sec61 β combinés à une approche de mutagenèse dirigée, on pourrait arriver à identifier les résidus essentiels à l'intégration membranaire et ainsi résoudre ce mystère encore non élucidé.

3.3.2 Interactions intramembranaires

On a longtemps crû que les TMDs à simple passage transmembranaire agissaient uniquement comme ancras membranaires, alors que les interactions protéiques étaient soutenues par les parties N- et C- terminales des protéines. Toutefois, de nombreuses études récentes démentent cette vision, en montrant que les interactions intramembranaires sont importantes pour plusieurs fonctions protéiques (revue dans [249]). Dans le cas de Sec61 β , le groupe de Jussi Jääntti (2007) [197] a montré que le TMD était suffisant pour maintenir l'interaction avec les sous-unités α et γ du translocon, indiquant non seulement une insertion membranaire correcte, mais aussi une localisation précise au pore de translocation. Ceci vient confirmer les résultats cristallographiques obtenus chez l'archée qui montrent que Sec61 β lie le translocon par son hélice α hydrophobe, à l'intérieur de la membrane lipidique [29]. Mais les interactions transmembranaires ne s'arrêtent pas là. En effet, il a été montré que le TMD de Sec61 β pouvait également lier Rtn1p, une protéine de structuration du RE, en absence des autres protéines du translocon, indiquant au moins une localisation alternative de la sous-unité β dans la membrane [197]. Comme Rtn1p est associé au complexe exocyste [224], et que Sec61 β lie également différentes protéines de ce complexe [115], on pourrait supposer que c'est grâce à son TMD que Sec61 β interagit avec ces partenaires transmembranaires.

Si Sec61 β possédait effectivement deux localisations alternatives, ceci pourrait expliquer comment la protéine arrive à s'associer à la fois au translocon, situé dans le RE, et au complexe exocyste, majoritairement situé dans la membrane cytoplasmique. Enfin, il est intéressant de noter que le TMD de Sec61 β possède certains résidus extrêmement conservés dans pratiquement toutes les archées et les eucaryotes [221] (Figure 1.10). Or, le programme bioinformatique Helical Wheel (disponible à l'adresse <http://www.site.uottawa.ca/~turcotte/>) prédit que ces résidus ultraconservés du TMD sont tous localisés sur la même face de l'hélice α hydrophobe, contrairement au TMD de d'autres protéines TA (dont Sec61 γ), où les résidus conservés sont répartis uniformément (voir Annexe 4.3). Ceci suggère qu'une face précise du TMD de Sec61 β est responsable d'une interaction protéique cruciale à son activité. Dans cette optique, la substitution d'un résidu ultraconservé du TMD par un résidu hydrophobe standard, comme l'alanine, ne devrait pas perturber l'intégration membranaire de la protéine, mais pourrait empêcher les interactions intramembranaires entre TMDs. Si l'interaction protéique bloquée était essentielle à la fonction de Sec61 β , ceci devrait renverser la complémentation des phénotypes de délétion. Pour tester cette hypothèse, le résidu le plus conservé de Sec61 β , l'histidine en position 23 du TMD, a été substitué par une alanine, afin de déterminer si cette mutation empêchait la complémentation de la sensibilité au froid des cellules $\Delta sbh1$. Tel qu'observé dans l'Annexe 4.3, la mutation n'a pas empêché la complémentation, indiquant que ce résidu n'est pas essentiel pour compléter le phénotype. À l'avenir, il serait toutefois intéressant de poursuivre ces analyses avec d'autres résidus ultraconservés afin d'identifier ceux qui sont requis pour la complémentation. Étant donné que les TMDs de Sec61 γ et de la calnexine sont incapables de compléter les cellules $\Delta sbh1$, il paraît certain qu'au moins un résidu particulier du domaine transmembranaire de Sec61 β est responsable de l'effet observé.

3.3.3 Rôle stabilisateur

Dans la quête d'une fonction universelle soutenue par le TMD de Sec61 β , l'hypothèse des interactions intramembranaires est attrayante mais possède toutefois un inconvénient : peu de protéines sont conservées entre toutes les espèces. Or, pour qu'une protéine non essentielle à la viabilité soit aussi conservée que Sec61 β , il faut qu'elle joue

une fonction primordiale qui confère un avantage évolutif important chez tous les organismes. Étant donné que même les parasites intracellulaires obligatoires comme les microsporidies possèdent un homologue de Sec61 β (presque exclusivement constitué du TMD de la protéine) [233], on peut supposer que si le rôle essentiel de Sec61 β requiert des interactions protéiques, ces protéines seront retrouvées chez tous les organismes. Ainsi, Rtn1p, une protéine qui lie le TMD de Sec61 β , n'apparaît pas comme un bon candidat pour soutenir une fonction universelle, car cette protéine est absente des archées, des bactéries et de plusieurs eucaryotes. À l'inverse, puisque la sous-unité α du translocon lie également le TMD de Sec61 β et qu'on trouve un homologue de cette protéine chez tous les êtres vivants, il est tentant de spéculer que cette interaction est essentielle, par exemple en stabilisant le pore de translocation. En support de cette hypothèse, il a été montré que Sec61 β représente la sous-unité la plus stable du translocon [153], et que SecG stabilisait des mutants de SecE chez la bactérie [37]. Malgré le fait que les études *in vitro* aient démontré un rôle non essentiel de Sec61 β durant la translocation [238], il reste donc possible que, *in vivo*, le TMD de Sec61 β soit important pour maintenir la structure du translocon. Alternativement, le rôle stabilisateur du TMD pourrait être indirect en servant d'échafaudage pour le recrutement de protéines stabilisatrices universelles. À ce titre, l'interaction fonctionnelle entre Sec61 β et le SR, nécessaire au recrutement de translocons libres chez *S. cerevisiae*, apparaît comme un bon candidat d'interaction conservée [199]. En effet, le SRP et le SR sont des protéines qu'on retrouve chez tous les organismes [1]. De futures études pourraient résoudre cette hypothèse en mesurant les niveaux d'expression et de dégradation du translocon et du SR en présence et en absence de Sec61 β .

3.3.4 Rôle d'oligomérisation

Enfin, il a été montré que les TMDs de certaines protéines pouvaient agir comme catalyseurs dans l'oligomérisation de protéines transmembranaires [249]. Ainsi, même si le TMD de Sec61 β apparaît trop petit pour soutenir une fonction enzymatique quelconque, il pourrait néanmoins supporter une fonction d'échafaudage ou d'oligomérisation. En effet, un nombre grandissant d'études démontrent que le translocon n'agit pas seul dans la membrane, mais qu'il est composé d'oligomères [183]. Chez la

bactérie, il a même été démontré que la translocation ne pouvait avoir lieu que si au moins deux protéines SecY étaient associées [35]. Présentement, on ignore l'importance de l'oligomérisation du translocon chez les eucaryotes, mais on pourrait supposer qu'elle est aussi primordiale que chez les bactéries. Étant donné que la sous-unité β du translocon forme des dimères chez les mammifères [238], il reste donc possible que le TMD de Sec61 β représente le domaine primordial nécessaire à l'oligomérisation du translocon. Ceci pourrait être vérifié chez *S. pombe* par des études de pontage ou suite à la purification *in vitro* de SP_Sec61 β et de son TMD.

3.4 Conclusion et perspectives

En somme, mon projet de recherche est innovateur à de nombreux égards. En plus de constituer la première caractérisation de Sec61 β et de ses phénotypes associés chez *S. pombe*, plusieurs conclusions générales peuvent être tirées quant à la fonction de la sous-unité β du translocon dans toutes les espèces : d'abord, que cette fonction peut être accomplie par n'importe quel homologue de Sec61 β allant de la levure à l'humain; et ensuite, qu'elle est réalisée par le domaine transmembranaire de la protéine. En outre, plusieurs pistes de solution sont proposées dans la discussion pour élucider la fonction précise de Sec61 β . Ci-bas, je propose des expériences pertinentes pour poursuivre mes recherches.

3.4.1 Suite du projet

Au terme de ce projet, il est recommandé de :

- Faire une étude rationnelle du TMD de Sec61 β par mutagénèse dirigée afin d'identifier les résidus cruciaux pour sa fonction.
- Identifier des partenaires d'interaction du TMD de Sec61 β par une approche de pontage ou de purification *in vitro* (ex : Tap-Tag).

- Étudier la complémentation des fonctions de Sec61 β sur une perspective encore plus large, notamment en incluant l'homologue éloigné SecG bactérien ainsi que celui de *Y. lipolytica*.
- Continuer les recherches sur le lien entre Sec61 β et la calnexine, qui apparaît comme un candidat potentiel intéressant pour une interaction intramembranaire.
- Poursuivre les investigations sur le lien entre Rtn1p, le complexe exocyste et le TMD de Sec61 β par des études d'interaction et de complémentation fonctionnelle des mutants.
- Vérifier l'hypothèse du rôle stabilisateur du TMD de Sec61 β en mesurant l'expression et la dégradation des composantes du translocon, en utilisant des mutants instables au besoin.
- Développer des anticorps dirigés contre SP_Sec61 β et son TMD à l'aide d'un vecteur d'expression bactérien pour faciliter les expérimentations futures.

3.4.2 Retombées à long terme

L'étude de la fonction de base de Sec61 β pourrait avoir des répercussions dans plusieurs domaines. Ainsi, mes résultats pourraient intéresser non seulement ceux travaillant sur la translocation et la sécrétion, deux processus métaboliques fondamentaux de tous les êtres vivants, mais également ceux travaillant sur les protéines TA en général (dont Sec61 β est l'archétype), ainsi que ceux qui étudient les interactions intramembranaires, un domaine d'étude pionnier qui pourrait révolutionner nos perceptions des régions transmembranaires protéiques. À long terme, des retombées positives sont aussi possibles pour les compagnies biotechnologiques qui tentent d'augmenter l'efficacité de sécrétion dans des organismes hétérologues. Étant donné que le translocon agit comme barrière et gardien du RE, c'est un candidat de choix pour l'étude des mutations visant à augmenter les limites naturelles de sécrétion d'un organisme.

Annexes

Les annexes présentées ici sont des résultats obtenus durant le cours de ma maîtrise qui n'ont pas encore été publiés.

4.1 Effet de la délétion de SP_Sec61 β sur la réponse UPR

Chez *Y. lipolytica*, la délétion de Sec61 β entraîne une diminution de la réponse UPR [96]. Pour en arriver à cette conclusion, le groupe de Claude Gaillardin a exposé les cellules pendant 3h à 10 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamycine, un inhibiteur de la N-glycosylation [255], puis a mesuré l'induction de la chaperone BiP par Western Blot. En présence de tunicamycine, les cellules sauvages ont surexprimé BiP de l'ordre de 2-3 fois, alors que les cellules $\Delta sbh1$ sont demeurées inchangées. De plus, contrairement aux cellules sauvages, les cellules $\Delta sbh1$ n'accumulent pas de protéines non glycosylées, même si une protéase mutante est exprimée dans le RE [96]. Ces résultats sont intéressants car ils suggèrent que YL_Sec61 β est impliqué dans la régulation de la réponse UPR, et que sa délétion bloque l'accumulation de protéines mal repliées lors d'un stress du RE.

Afin de vérifier si ce phénotype était spécifique à *Y. lipolytica* ou bien si on pouvait observer le même effet chez *S. pombe*, l'expérience d'induction du UPR a été reproduite dans notre système modèle. Les cellules sauvages ou $\Delta sbh1$ de *S. pombe*, avec ou sans complémentation par un plasmide d'expression de SP_Sec61 β , ont été cultivées jusqu'à la phase exponentielle, puis les cellules ont été traitées ou non avec 10 $\mu\text{g/mL}$ de tunicamycine pendant 2h. Comme on peut le voir à la Figure 4.1, toutes les souches ont surexprimé BiP de façon équivalente suite au traitement avec la tunicamycine, indiquant que la réponse UPR n'est pas altérée par la délétion de *sbh1*⁺ chez *S. pombe*. Ceci suggère que le phénotype observé chez *Y. lipolytica* est spécifique à cette levure, d'autant que l'expérience n'a jamais été reproduite dans aucun autre laboratoire. Il serait toutefois intéressant de vérifier l'induction du UPR dans les cellules *sbh1* $\Delta sbh2$ Δ de *S. cerevisiae* ou encore suite à la surexpression de SP_Sec61 β chez la levure à fission.

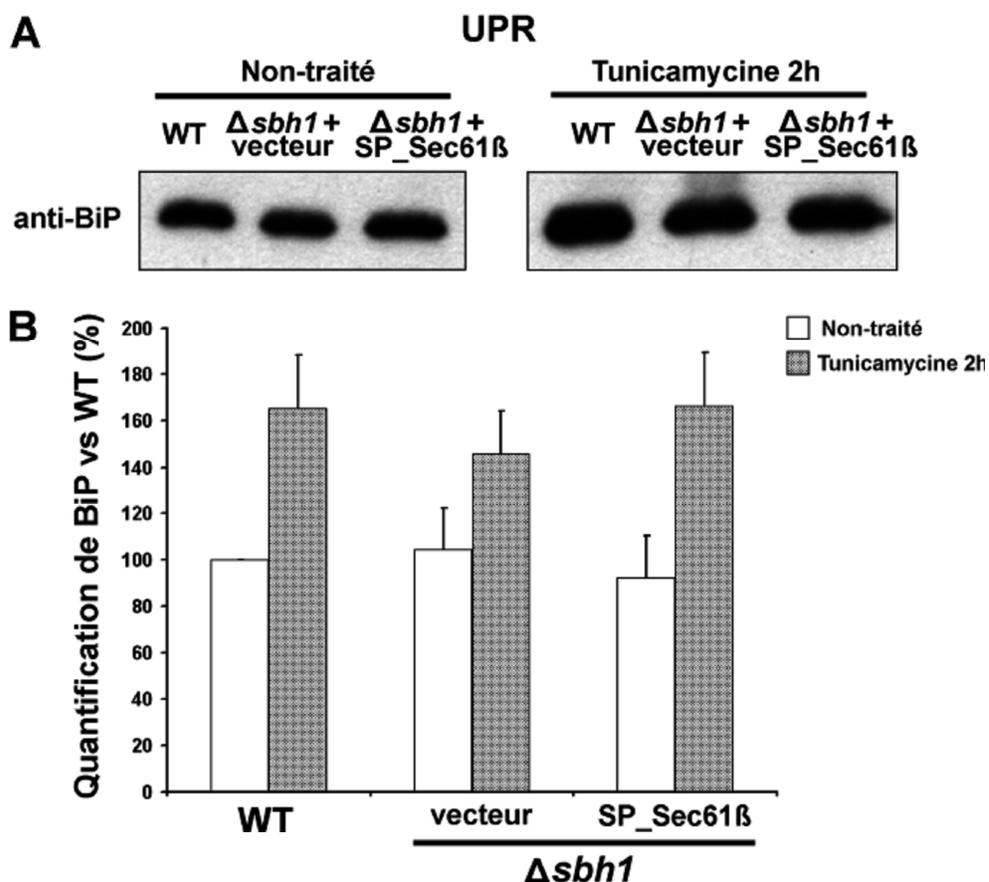


Figure 4.1 Réponse UPR des cellules $\Delta sbh1$

(A) Les souches WT et $\Delta sbh1$ exprimant ou non SP_Sec61 β sur plasmide ont été incubées jusqu'à la phase exponentielle, puis leur DO₅₉₅ a été ajustée à 0,5, et les cellules ont été traitées ou non avec 10 μ g/mL de tunicamycine pendant 2h. Un Western Blot a ensuite été réalisé à partir des extraits protéiques totaux de chaque culture avec des anticorps dirigés contre BiP de *S. pombe* (dilution 1:10.000). Le résultat présenté est représentatif de trois expériences indépendantes.

(B) Quantification des signaux protéiques observés en (A), réalisée par le programme QuantityOne (Biorad). Les bandes ont été normalisées par rapport au Rouge Ponceau puis divisées par la valeur du WT non traité (100 %). L'histogramme indique la moyenne \pm l'écart-type de trois expériences indépendantes.

4.2 Coimmunoprécipitation de SP_Sec61 β

Le groupe de Claude Gaillardin [96] a également montré que YL_Sec61 β liait la calnexine, par une expérience de double-hybride confirmée par coimmunoprécipitation. Étant donné que SP_Sec61 β a été initialement découvert par notre laboratoire dans un criblage de suppression de l'essentialité de la calnexine, il est possible qu'un lien physique et fonctionnel unisse la calnexine et la sous-unité β du translocon chez la levure à fission. De précédentes expériences de notre laboratoire réalisées avec une version étiquetée en C-terminale de SP_Sec61 β n'avaient pas permis de détecter la formation d'un complexe avec la calnexine. Toutefois, les études réalisées chez *Y. lipolytica* suggèrent que le domaine d'interaction entre la calnexine et Sec61 β est localisé du côté luminal, très près du TMD des deux protéines [96]. Ainsi, étiqueter Sec61 β sur sa courte queue luminale pourrait empêcher l'interaction avec la calnexine. À la lumière de ces résultats, l'expérience de coimmunoprécipitation de la calnexine a été répétée en utilisant une version de SP_Sec61 β étiquetée du côté N-terminal cytosolique plutôt que C-terminal. Tel qu'observé à la Figure 4.2, un complexe est bien observé entre la calnexine et SP_Sec61 β dans ces conditions. L'interaction semble spécifique, car aucun complexe n'est observé dans le contrôle négatif dépourvu de SP_Sec61 β étiqueté.

Comme il a aussi été montré que la chaperone luminale BiP lie la calnexine chez *S. pombe* [256], un Western Blot dirigé contre cette protéine a été réalisé. La Figure 4.2 montre que BiP est toujours détecté en complexe avec la calnexine même en présence de SP_Sec61 β , indiquant que les deux interactions ne sont pas mutuellement exclusives. Ceci suggère que SP_Sec61 β forme un complexe incluant au moins deux chaperones à proximité du translocon, ce qui pourrait représenter une fonction importante de la protéine. Pour confirmer ces résultats, il faudrait réaliser l'immunoprécipitation inverse, avec BiP ou SP_Sec61 β comme cible, puis vérifier la présence des autres sous-unités du translocon dans le complexe (α et γ). Après coup, il serait intéressant de vérifier si le TMD de Sec61 β est responsable de cette liaison physique en utilisant divers mutants de la protéine. Étant donné que le domaine d'interaction de la calnexine est très près de son TMD à la fois pour l'interaction avec BiP et avec YL_Sec61 β , cette chaperone luminale constitue un bon candidat pour une interaction intramembranaire avec Sec61 β .

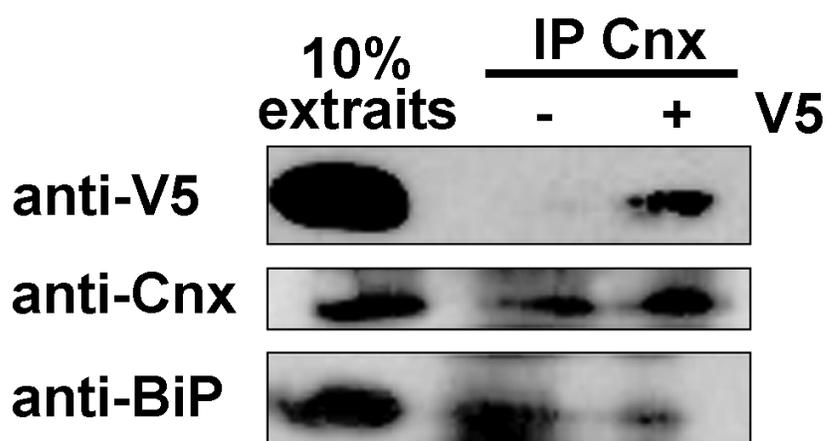


Figure 4.2 Coimmunoprécipitation de SP_Sec61 β avec la calnexine et BiP

Les extraits protéiques totaux d'une souche WT exprimant ou non SP_Sec61 β étiquetée avec l'épitope V5 en N-terminal ont été immunoprécipités pendant 16h à 4°C avec des anticorps dirigés contre la calnexine de *S. pombe* (dilution 1:400). Après quatre lavages au tampon IPP, des Western Blot successifs ont été réalisés avec des anticorps dirigés contre V5, la calnexine et BiP, respectivement, après lavage de la membrane entre chaque anticorps. La première colonne montre un chargement de 10 % d'extraits protéiques qui ont été traités par une solution pré-immune plutôt qu'avec l'anticorps contre la calnexine.

4.3 Mutagenèse dirigée du TMD de SP_Sec61 β

Nos résultats indiquent que le TMD de Sec61 β est capable à lui seul de compléter plusieurs fonctions de la protéine entière. Afin d'identifier les résidus essentiels à cette complémentation, une mutagenèse dirigée a été entreprise. Considérant le fait que la fonction du TMD de Sec61 β semble conservée à travers les espèces, on peut supposer que les acides aminés importants de la protéine seront également conservés. Or, un alignement de toutes les séquences de la sous-unité β du translocon (voir Figure 1.10) a permis d'identifier quatre résidus ultraconservés dans le TMD (Figure 4.3A). Ces résidus sont localisés sur la même face de l'hélice α hydrophobe du domaine transmembranaire, suggérant une potentielle interface de liaison protéique (Figure 4.3B). Si ces résidus sont effectivement importants pour l'activité du TMD de Sec61 β , alors leur mutagenèse devrait bloquer la complémentation de la thermosensibilité des cellules $\Delta sbh1$. Pour vérifier cette idée, la séquence codante de l'histidine en position 23 du TMD a été mutée. Cet acide aminé précis a été choisi car il s'agit d'un résidu polaire chargé qu'on retrouve relativement rarement dans une hélice hydrophobe. Comme il s'agit de surcroît du résidu le plus conservé à travers les espèces, il apparaît possible qu'il joue un rôle important dans le TMD. L'histidine ultraconservée a été remplacée par une alanine, un petit résidu hydrophobe, afin d'éviter de perturber l'insertion membranaire du TMD. Tel qu'observé à la Figure 4.3C, la mutation H \rightarrow A du TMD de Sec61 β n'a cependant pas empêché la complémentation de la thermosensibilité au froid des cellules $\Delta sbh1$, indiquant que le TMD est toujours fonctionnel malgré cette mutation.

À l'avenir, il serait intéressant de poursuivre ces investigations en mutant les autres résidus ultraconservés du TMD de Sec61 β . Étant donné que le TMD de d'autres protéines, comme Sec61 γ (une protéine TA) et la calnexine (une protéine transmembranaire de type I) se sont avérés incapables de compléter la thermosensibilité des cellules $\Delta sbh1$, certains résidus précis du TMD de la sous-unité β du translocon sont certainement responsables de l'effet observé. Si l'approche de mutagenèse simple s'avère inefficace, il serait également possible de muter la séquence de plusieurs résidus simultanément, ou encore de perturber la structure du TMD en introduisant des acides aminés à forte contrainte structurale, comme une proline.

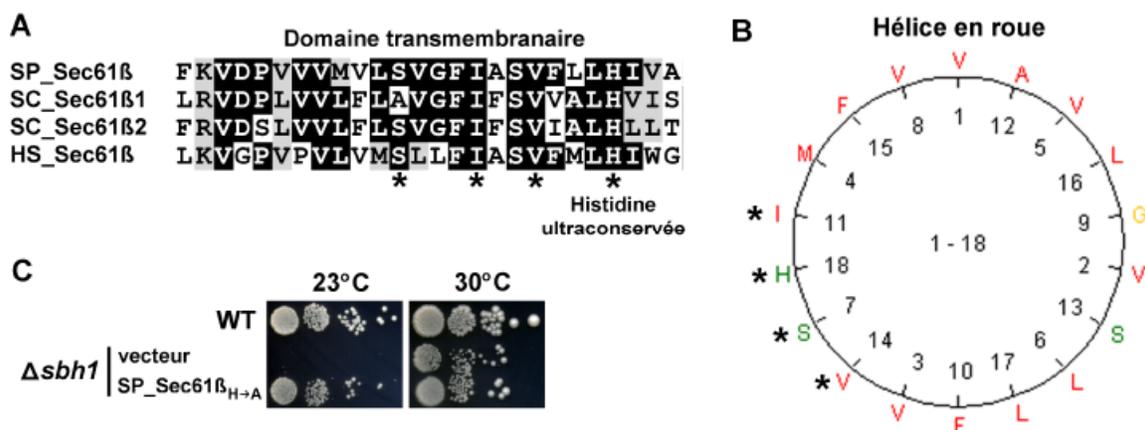


Figure 4.3 Mutagenèse dirigée du TMD de SP_Sec61β

(A) Alignement de séquences des domaines transmembranaires des homologues de Sec61β de *S. pombe* (SP), *S. cerevisiae* (SC) et de l'humain (HS). Les quatre résidus du TMD de Sec61β les plus conservés à travers les espèces sont marqués par des étoiles (*). La quatrième étoile indique l'histidine ultraconservée de Sec61β, qu'on retrouve autant chez les eucaryotes que les archées.

(B) Schéma de type « hélice en roue » de l'hélice α formée par le TMD de SP_Sec61β, réalisé par le programme Helical Wheel (<http://www.site.uottawa.ca/~turcotte/>). Les résidus hydrophobes sont marqués en rouge, les résidus polaires en vert et les petits résidus en jaune. Les quatre résidus ultraconservés du TMD de Sec61β, localisés sur la même face de l'hélice, sont marqués par des étoiles (*).

(C) Complémentation de la sensibilité au froid des cellules $\Delta sbh1$ par un mutant du TMD de SP_Sec61β. L'histidine ultraconservée du TMD de SP_Sec61β a été mutée par une alanine. Après transformation du mutant ou du vecteur vide dans une souche $\Delta sbh1$, les cellules ont été incubées jusqu'à la phase exponentielle, normalisées à $DO_{595}=0,5$, diluées en série (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}), placées sur pétri MM+AL et incubées pendant 7 jours aux températures indiquées.

4.4 Phénomène Cin, identification du gène *isp6*⁺ et lien avec SP_Sec61 β

La calnexine est une chaperone du RE essentielle à la viabilité cellulaire chez *S. pombe* [257,258]. Toutefois, notre laboratoire a montré que dans certaines conditions, les cellules pouvaient devenir indépendantes de la calnexine pour leur survie, un état nommé Cin (pour Calnexine indépendant), par opposition à Cdn (pour Calnexine dépendant) [259]. L'apparition de l'état Cin est rendue possible par l'emploi de cellules où la calnexine génomique a été délétée puis réintroduite sur plasmide. Les cellules Cdn sont incapables de perdre le plasmide codant pour la calnexine, sauf si un inducteur de l'état Cin est présent, auquel cas les cellules perdent le plasmide à un haut taux. La perte du plasmide de la calnexine est vérifiée par l'apparition d'auxotrophie et par Western Blot. Afin d'identifier les gènes inducteurs de l'état Cin chez *S. pombe*, des criblages de surexpression et d'insertion ont été entrepris.

Le criblage de surexpression, consistant à transformer une banque d'ADNc sur le plasmide pREP3X dans des cellules Cdn, a permis d'identifier SP_Sec61 β comme inducteur de l'état Cin. Ces résultats ont été confirmés par clonage et retransformation du plasmide pREP3X-Sec61 β dans des cellules Cdn, résultant en l'apparition de 30 % de cellules Cin, comparativement à 40-50 % pour un autre inducteur connu, pREP2-cif-cmyc (Figure 4.4A). Il semble qu'une surexpression élevée de Sec61 β soit requise pour l'induction, car un plasmide pREP82 de plus faible expression n'induit pas l'état Cin. Par ailleurs, la délétion de *sbh1*⁺ n'empêche pas l'induction de cellules Cin par cif-cmyc, indiquant que SP_Sec61 β n'est pas essentiel à l'apparition de cet état. Ainsi, ces résultats suggèrent que SP_Sec61 β joue un rôle indirect dans l'induction de l'état Cin. Étant donné que les cellules Cin ont une morphologie altérée plus petite et ronde que les cellules sauvages [260], alors que la surexpression de SP_Sec61 β entraîne un allongement cellulaire (Figure 2A), on pourrait spéculer que la perte de la calnexine soit une façon pour la cellule de rétablir la morphologie normale lorsque la sous-unité β du translocon est surexprimée.

A

Souche	% Cellules Cin
Cdn + vecteur	0%
Cdn + pREP82- <i>sbh1</i> ⁺	0%
Cdn + pREP3X- <i>sbh1</i> ⁺	30%
Cdn + pREP2- <i>cif-cmyc</i>	40%
CdnΔ <i>sbh1</i> + pREP1- <i>cif-cmyc</i>	47%
Cdn + pREP2- <i>isp6</i> ⁺	85% *

* Résultat non confirmé par Western Blot

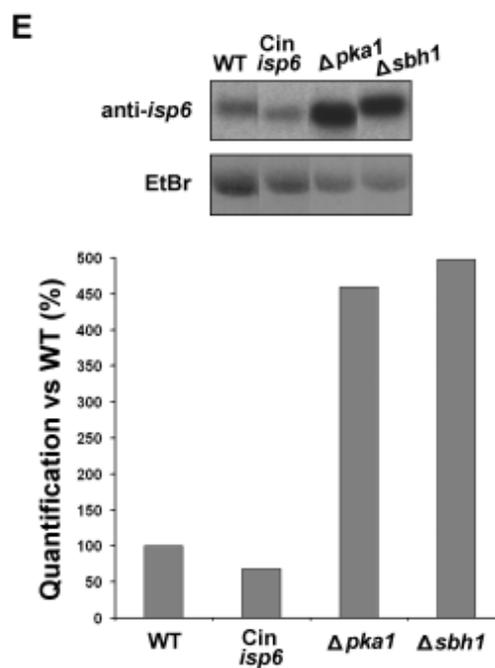
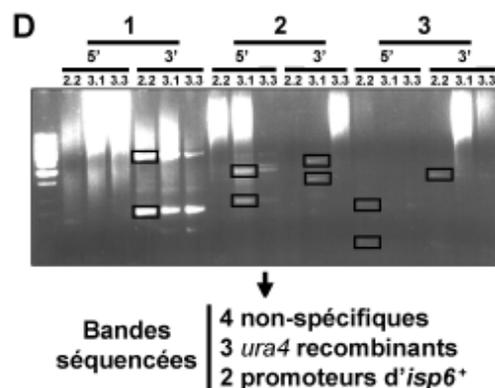
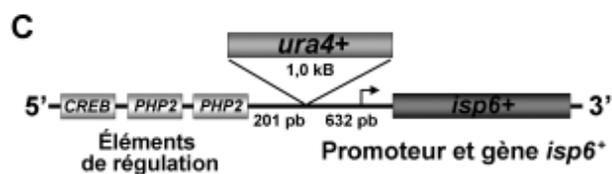
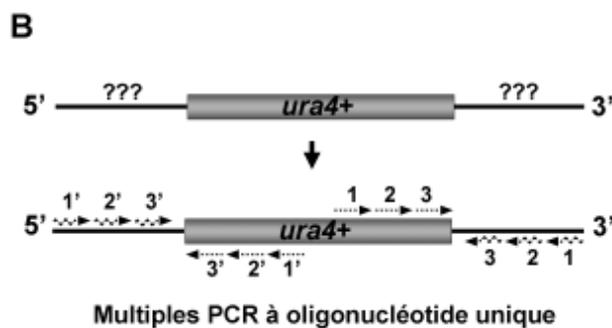


Figure 4.4 Rôle d'Isp6p et de SP_Sec61β dans le phénomène Cin

(A) Induction de l'état Cin par différents plasmides dans les souches Cdn et CdnΔ*sbh1*. Le vecteur vide a été utilisé comme contrôle négatif, et la surexpression de cif-cmyc (un inducteur de Cin) comme contrôle positif. pREP82 est un vecteur de faible expression, alors que pREP3X, pREP1 et pREP2 sont des vecteurs de surexpression. Les pourcentages de cellules Cin ont été obtenus par calcul de l'apparition des cellules auxotrophes sur milieu solide après trois saturations en milieu liquide. Les résultats présentés sont la moyenne de 104 colonies obtenues à partir de trois cultures indépendantes, et ont été vérifiés par Western Blot sauf indication contraire.

(B) Stratégie de SON PCR. La cassette *ura4*⁺ est insérée aléatoirement dans le génome. Pour identifier les régions flanquantes inconnues, on réalise une première PCR avec des oligonucléotides s'hybridant spécifiquement en 5' ou en 3' de la cassette, et de façon non-spécifique dans la région flanquante. On répète ensuite une PCR similaire (2 et 3) en utilisant des oligonucléotides de plus en plus proches des extrémités de la cassette.

(C) Résultat du SON PCR pour les candidats Cin 2.2, 3.1 et 3.3. Neuf bandes ont été amplifiées, purifiées et séquencées. Sept bandes se sont avérées non-spécifiques, mais deux correspondaient au promoteur du gène *isp6*⁺.

(D) Localisation génomique de la cassette *ura4*⁺ dans les candidats Cin 2.2, 3.1 et 3.3. La cassette est située à 632 pb en 5' du gène *isp6*⁺, en amont de son promoteur, et à 201 pb en aval des trois éléments régulateurs du gène *isp6*⁺. À noter, la cassette *ura4*⁺ est tronquée et ne fait que 1,0 kb au lieu de 1,7 kb. Les trois insertions sont localisées dans la même région du promoteur pour les trois candidats Cin *isp6*.

(E) Northern Blot contre *isp6* réalisé sur des extraits d'ARN totaux obtenus à partir de cultures exponentielles des souches WT, Cin *isp6*, Δ*pkal* et Δ*sbh1*. Le bromure d'éthidium (EtBr) est montré comme contrôle de chargement (ARN ribosomique). Dans le panneau du bas, les bandes ont été quantifiées à l'aide du programme QuantityOne (Biorad), normalisées par rapport au EtBr et divisées par la valeur du WT (100 %).

Le second criblage réalisé afin d'induire l'état Cin consistait en une insertion aléatoire d'une cassette *ura4⁺* dans le génome de *S. pombe*. Grâce à cette méthode, 11 insertions inductrices de l'état Cin ont été identifiées. Afin d'identifier la localisation génomique précise de ces insertions, une approche de PCR par ligation à l'aide d'adapteurs a été réalisée. Cette approche a permis d'identifier l'insertion à proximité du gène *cif1⁺*, un inducteur de l'état Cin, dans 8 candidats sur 11. Les trois autres candidats (2.2, 3.1 et 3.3) étant plus difficiles à identifier, une approche alternative de SON PCR a été entreprise. Cette méthode, détaillée dans (Antal, 2004)[261], utilise un seul oligonucléotide pour amplifier les régions flanquantes de la cassette *ura4⁺*. D'un côté, l'oligonucléotide s'hybride spécifiquement sur la cassette, et de l'autre, il s'hybride de façon non-spécifique sur la région flanquante, permettant l'amplification de plusieurs bandes. En répétant ces étapes avec différents oligonucléotides de plus en plus près de l'extrémité de la cassette *ura4⁺*, on peut amplifier des bandes de plus en plus spécifiques aux régions flanquantes (Figure 4.4B). Grâce à cette technique, neuf bandes d'amplification ont été séquencées pour les trois candidats manquants du criblage d'insertion (Figure 4.4C). Sept de ces bandes étaient non-spécifiques, mais deux représentaient le promoteur du gène *isp6⁺*. L'insertion de la cassette *ura4⁺* à 632 pb en 5' de ce gène a ensuite été confirmée par une série de PCR spécifiques à *isp6⁺* (Figure 4.4D). Les cellules Cin induites de cette façon ont été nommées Cin *isp6*

Le gène *isp6⁺* a été initialement découvert lors d'un criblage d'identification des gènes induits durant le développement sexuel chez *S. pombe* [262]. La protéine Isp6p est une protéase à sérine de la famille des subtilisines, homologue de la protéinase B (PrB) chez *S. cerevisiae* [263]. Sa fonction consiste à dégrader les protéines dans la vacuole et à activer d'autres protéases durant l'autophagie, particulièrement lorsque la cellule manque d'azote [264]. De façon intéressante, l'insertion de la cassette *ura4⁺* est localisée entre le promoteur d'*isp6⁺* et trois éléments régulateurs [265], suggérant que le gène est toujours exprimé, mais qu'il est dérégulé. Afin de tester cette hypothèse, un Northern Blot contre l'ARN d'*isp6* a été réalisé dans différentes souches. Tel qu'observé à la Figure 4.4E, les cellules Cin *isp6* expriment toujours le gène, mais à un niveau légèrement inférieur aux cellules sauvages. Par comparaison, la délétion de *Pka1*, un régulateur négatif d'*isp6⁺* [265], cause une surexpression du gène de l'ordre de 450 %. Étonnamment, un contrôle

fortuit de l'expérience a montré que la délétion de *sbh1*⁺ induisait également une surexpression d'*isp6*⁺ comparable à celle causée par la délétion de Pka1. Bien que le mécanisme reliant Isp6p et Sec61 β demeure inconnu, il serait intéressant de pousser plus à fond la question, d'autant qu'Isp6p semble également impliqué dans la régulation de la calnexine (résultats non publiés). En effet, il est intéressant de constater que la surexpression d'Isp6p induit l'état Cin à un haut niveau (Figure 4.4A), et que les niveaux d'expression de Sec61 β , de la calnexine et d'Isp6p affectent tous la sécrétion des protéines chez *S. pombe*. Il demeure donc possible que ces trois protéines fassent partie d'un même réseau régulateur, dont l'état Cin pourrait être le reflet.

Bibliographie

1. Cao TB, Saier MH, Jr. (2003) The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. *Biochim Biophys Acta* 1609: 115-125.
2. Aridor M, Hannan LA (2002) Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic* 3: 781-790.
3. Schmitt CK, Meysick KC, O'Brien AD (1999) Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg Infect Dis* 5: 224-234.
4. Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D (2005) Recombinant protein production in yeasts. *Mol Biotechnol* 31: 245-259.
5. (2006) The Global Biotech Report 2006: The Rise Of The Biotech Blockbusters. [Market Report] (250p), publié par Visiongain.
6. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC (2002) Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol* 13: 345-351.
7. Miller JP, Lo RS, Ben-Hur A, Desmarais C, Stagljar I, et al. (2005) Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12123-12128.
8. Rothman JE (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372: 55-63.
9. Rothman JE, Orci L (1992) Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* 355: 409-415.
10. Kaiser CA, Gimeno RE, Shaywitz DA (1997) Protein secretion, membrane biogenesis, and endocytosis. In: Pringle, J. R., Broach, J. R. and Jones, E. W. (Eds.). *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 91-228.
11. Veenendaal AK, van der Does C, Driessen AJ (2004) The protein-conducting channel SecYEG. *Biochim Biophys Acta* 1694: 81-95.
12. Pugsley AP (1993) The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57: 50-108.
13. von Heijne G, Manoil C (1990) Membrane proteins: from sequence to structure. *Protein Eng* 4: 109-112.
14. Emr SD, Hanley-Way S, Silhavy TJ (1981) Suppressor mutations that restore export of a protein with a defective signal sequence. *Cell* 23: 79-88.
15. Oliver DB, Beckwith J (1981) E. coli mutant pleiotropically defective in the export of secreted proteins. *Cell* 25: 765-772.
16. Akimaru J, Matsuyama S, Tokuda H, Mizushima S (1991) Reconstitution of a protein translocation system containing purified SecY, SecE, and SecA from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6545-6549.
17. Wickner W, Driessen AJ, Hartl FU (1991) The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane. *Annu Rev Biochem* 60: 101-124.
18. Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* 450: 663-669.
19. van der Wolk JP, de Wit JG, Driessen AJ (1997) The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J* 16: 7297-7304.

20. Schiebel E, Driessen AJ, Hartl FU, Wickner W (1991) Delta mu H⁺ and ATP function at different steps of the catalytic cycle of preprotein translocase. *Cell* 64: 927-939.
21. Pogliano KJ, Beckwith J (1994) Genetic and molecular characterization of the *Escherichia coli* secD operon and its products. *J Bacteriol* 176: 804-814.
22. Duong F, Wickner W (1997) Distinct catalytic roles of the SecYE, SecG and SecDFyajC subunits of preprotein translocase holoenzyme. *EMBO J* 16: 2756-2768.
23. Dalbey RE (1991) Leader peptidase. *Mol Microbiol* 5: 2855-2860.
24. Natale P, Bruser T, Driessen AJ (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1735-1756.
25. Bingle LE, Bailey CM, Pallen MJ (2008) Type VI secretion: a beginner's guide. *Curr Opin Microbiol* 11: 3-8.
26. Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 692-744.
27. Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J (1997) Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* 91: 563-566.
28. Breyton C, Haase W, Rapoport TA, Kuhlbrandt W, Collinson I (2002) Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG. *Nature* 418: 662-665.
29. Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, et al. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44.
30. Eichler J, Duong F (2004) Break on through to the other side--the Sec translocon. *Trends Biochem Sci* 29: 221-223.
31. Gumbart J, Schulten K (2006) Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophys J* 90: 2356-2367.
32. Harris CR, Silhavy TJ (1999) Mapping an interface of SecY (PrlA) and SecE (PrlG) by using synthetic phenotypes and in vivo cross-linking. *J Bacteriol* 181: 3438-3444.
33. Crowley KS, Liao S, Worrell VE, Reinhart GD, Johnson AE (1994) Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78: 461-471.
34. Tani K, Tokuda H, Mizushima S (1990) Translocation of ProOmpA possessing an intramolecular disulfide bridge into membrane vesicles of *Escherichia coli*. Effect of membrane energization. *J Biol Chem* 265: 17341-17347.
35. Osborne AR, Rapoport TA (2007) Protein translocation is mediated by oligomers of the SecY complex with one SecY copy forming the channel. *Cell* 129: 97-110.
36. Akiyama Y, Kihara A, Tokuda H, Ito K (1996) FtsH (HflB) is an ATP-dependent protease selectively acting on SecY and some other membrane proteins. *J Biol Chem* 271: 31196-31201.
37. Nishiyama K, Mizushima S, Tokuda H (1995) Preferential interaction of Sec-G with Sec-E stabilizes an unstable Sec-E derivative in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 217-223.

38. Palade G (1975) Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* 189: 867.
39. Novick P, Schekman R (1979) Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1858-1862.
40. Novick P, Field C, Schekman R (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21: 205-215.
41. Novick P, Ferro S, Schekman R (1981) Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25: 461-469.
42. Deshaies RJ, Schekman R (1987) A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 105: 633-645.
43. Stephenson K (2005) Sec-dependent protein translocation across biological membranes: evolutionary conservation of an essential protein transport pathway (review). *Mol Membr Biol* 22: 17-28.
44. Blobel G (2000) Protein targeting (Nobel lecture). *Chembiochem* 1: 86-102.
45. Briggs MS, Cornell DG, Dluhy RA, Gierasch LM (1986) Conformations of signal peptides induced by lipids suggest initial steps in protein export. *Science* 233: 206-208.
46. von Heijne G (1990) Protein targeting signals. *Curr Opin Cell Biol* 2: 604-608.
47. Martoglio B, Dobberstein B (1998) Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8: 410-415.
48. Belin D, Guzman LM, Bost S, Konakova M, Silva F, et al. (2004) Functional activity of eukaryotic signal sequences in *Escherichia coli*: the ovalbumin family of serine protease inhibitors. *J Mol Biol* 335: 437-453.
49. Department of Biology CoAaS, University of Miami (Accédé le 2008-10-28) The secretory pathway : a model. URL : <http://porpaxbiomiamiedu/~cmallery/150/cells/sf5x8bjpg>.
50. Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P (2001) The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70: 755-775.
51. Walter P, Blobel G (1980) Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 7112-7116.
52. Walter P, Blobel G (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299: 691-698.
53. Kurzchalia TV, Wiedmann M, Girshovich AS, Bochkareva ES, Bielka H, et al. (1986) The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. *Nature* 320: 634-636.
54. Tajima S, Lauffer L, Rath VL, Walter P (1986) The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol* 103: 1167-1178.
55. Connolly T, Gilmore R (1989) The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57: 599-610.

56. Plath K, Rapoport TA (2000) Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 151: 167-178.
57. Park S, Liu G, Topping TB, Cover WH, Randall LL (1988) Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* 239: 1033-1035.
58. Chirico WJ, Waters MG, Blobel G (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332: 805-810.
59. Stirling CJ (1999) Protein targeting to the endoplasmic reticulum in yeast. 1997 Fleming Lecture. *Microbiology* 145 (Pt 5): 991-998.
60. Hann BC, Walter P (1991) The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* 67: 131-144.
61. Meyer HA, Grau H, Kraft R, Kostka S, Prehn S, et al. (2000) Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem* 275: 14550-14557.
62. Spiess M (1995) Heads or tails--what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Lett* 369: 76-79.
63. High S, Flint N, Dobberstein B (1991) Requirements for the membrane insertion of signal-anchor type proteins. *J Cell Biol* 113: 25-34.
64. Stefanovic S, Hegde RS (2007) Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell* 128: 1147-1159.
65. Schuldiner M, Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, et al. (2008) The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell* 134: 634-645.
66. Beckmann R, Spahn CM, Eswar N, Helters J, Penczek PA, et al. (2001) Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* 107: 361-372.
67. Tyedmers J, Lerner M, Bies C, Dudek J, Skowronek MH, et al. (2000) Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 7214-7219.
68. Matlack KE, Misselwitz B, Plath K, Rapoport TA (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97: 553-564.
69. Misselwitz B, Staack O, Rapoport TA (1998) J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol Cell* 2: 593-603.
70. Osborne AR, Rapoport TA, van den Berg B (2005) Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 529-550.
71. Duong F, Wickner W (1998) Sec-dependent membrane protein biogenesis: SecYEG, preprotein hydrophobicity and translocation kinetics control the stop-transfer function. *EMBO J* 17: 696-705.
72. Heinrich SU, Mothes W, Brunner J, Rapoport TA (2000) The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain. *Cell* 102: 233-244.
73. Gumbart J, Schulten K (2007) Structural determinants of lateral gate opening in the protein translocon. *Biochemistry* 46: 11147-11157.
74. Voigt S, Jungnickel B, Hartmann E, Rapoport TA (1996) Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134: 25-35.

75. Mothes W, Heinrich SU, Graf R, Nilsson I, von Heijne G, et al. (1997) Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89: 523-533.
76. Dobson CM (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* 15: 3-16.
77. Anelli T, Sitia R (2008) Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J* 27: 315-327.
78. Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* 35: 149-191.
79. von Heijne G (1994) Signal Peptidases; (von Heijne G, ed), pp. 1-3, R. G. Landes Company, Austin, TX editor.
80. Antonin W, Meyer HA, Hartmann E (2000) Interactions between Spc2p and other components of the endoplasmic reticulum translocation sites of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275: 34068-34072.
81. Knauer R, Lehle L (1999) The oligosaccharyltransferase complex from yeast. *Biochim Biophys Acta* 1426: 259-273.
82. Parodi AJ (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J* 348 Pt 1: 1-13.
83. Helenius A, Aebi M (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-2369.
84. Chavan M, Yan A, Lennarz WJ (2005) Subunits of the Translocon Interact with Components of the Oligosaccharyl Transferase Complex. *J Biol Chem* 280: 22917-22924.
85. Chatterjee S, Mayor S (2001) The GPI-anchor and protein sorting. *Cell Mol Life Sci* 58: 1969-1987.
86. Takeda J, Kinoshita T (1995) GPI-anchor biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 20: 367-371.
87. Shaw PE (2002) Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Rep* 3: 521-526.
88. Schmid FX (1993) Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22: 123-142.
89. Noiva R (1999) Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 10: 481-493.
90. Farquhar R, Honey N, Murrant SJ, Bossier P, Schultz L, et al. (1991) Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 108: 81-89.
91. Pollard MG, Travers KJ, Weissman JS (1998) Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* 1: 171-182.
92. Schonbrunner ER, Schmid FX (1992) Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase improves the efficiency of protein disulfide isomerase as a catalyst of protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4510-4513.
93. Sitia R, Braakman I (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* 426: 891-894.
94. Buck TM, Wright CM, Brodsky JL (2007) The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum. *Semin Cell Dev Biol* 18: 751-761.

95. Haigh NG, Johnson AE (2002) A new role for BiP: closing the aqueous translocon pore during protein integration into the ER membrane. *J Cell Biol* 156: 261-270.
96. Boisrame A, Chasles M, Babour A, Beckerich JM, Gaillardin C (2002) Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Cell Sci* 115: 4947-4956.
97. Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 13: 4456-4469.
98. Caramelo JJ, Parodi AJ (2008) Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles. *J Biol Chem* 283: 10221-10225.
99. Spang A (2008) The life cycle of a transport vesicle. *Cell Mol Life Sci*.
100. Wieland FT, Gleason ML, Serafini TA, Rothman JE (1987) The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *Cell* 50: 289-300.
101. Forster R, Weiss M, Zimmermann T, Reynaud EG, Verissimo F, et al. (2006) Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites. *Curr Biol* 16: 173-179.
102. Malsam J, Kreye S, Sollner TH (2008) Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Mol Life Sci*.
103. Lippincott-Schwartz J, Roberts TH, Hirschberg K (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 557-589.
104. De Matteis MA, Luini A (2008) Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9: 273-284.
105. Rodriguez-Boulan E, Musch A (2005) Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms. *Biochim Biophys Acta* 1744: 455-464.
106. Munro S, Pelham HR (1987) A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell* 48: 899-907.
107. Gu F, Crump CM, Thomas G (2001) Trans-Golgi network sorting. *Cell Mol Life Sci* 58: 1067-1084.
108. Keller P, Simons K (1997) Post-Golgi biosynthetic trafficking. *J Cell Sci* 110 (Pt 24): 3001-3009.
109. Kirchhausen T (1999) Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 705-732.
110. Pauly BS, Drubin DG (2007) Clathrin: an amazing multifunctional dreamcoat? *Cell Host Microbe* 2: 288-290.
111. Traub LM, Kornfeld S (1997) The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr Opin Cell Biol* 9: 527-533.
112. Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.
113. TerBush DR, Maurice T, Roth D, Novick P (1996) The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15: 6483-6494.
114. Guo W, Sacher M, Barrowman J, Ferro-Novick S, Novick P (2000) Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol* 10: 251-255.
115. Guo W, Novick P (2004) The exocyst meets the translocon: a regulatory circuit for secretion and protein synthesis? *Trends Cell Biol* 14: 61-63.

116. Toikkanen JH, Miller KJ, Soderlund H, Jantti J, Keranen S (2003) The {beta} Subunit of the Sec61p Endoplasmic Reticulum Translocon Interacts with the Exocyst Complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278: 20946-20953.
117. Gasch AP, Werner-Washburne M (2002) The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Funct Integr Genomics* 2: 181-192.
118. Ma Y, Hendershot LM (2001) The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell* 107: 827-830.
119. Foufelle F, Ferre P (2007) [Unfolded protein response: its role in physiology and pathophysiology]. *Med Sci (Paris)* 23: 291-296.
120. Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, et al. (2000) Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101: 249-258.
121. Schroder M, Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569: 29-63.
122. Wang B, Heath-Engel H, Zhang D, Nguyen N, Thomas DY, et al. (2008) BAP31 interacts with Sec61 translocons and promotes retrotranslocation of CFTRDeltaF508 via the derlin-1 complex. *Cell* 133: 1080-1092.
123. Yamaguchi A, Hori O, Stern DM, Hartmann E, Ogawa S, et al. (1999) Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol* 147: 1195-1204.
124. Nakatsukasa K, Brodsky JL (2008) The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic* 9: 861-870.
125. Jakob CA, Burda P, Roth J, Aebi M (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* 142: 1223-1233.
126. Hosokawa N, Wada I, Hasegawa K, Yoriyuzi T, Tremblay LO, et al. (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* 2: 415-422.
127. Kim W, Spear ED, Ng DT (2005) Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol Cell* 19: 753-764.
128. Roth J, Yam GH, Fan J, Hirano K, Gaplovska-Kysela K, et al. (2008) Protein quality control: the who's who, the where's and therapeutic escapes. *Histochem Cell Biol* 129: 163-177.
129. Okuda-Shimizu Y, Hendershot LM (2007) Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. *Mol Cell* 28: 544-554.
130. Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, et al. (2002) Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 4: 134-139.
131. Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R (1999) The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28: 295-317.
132. Johnson AE, Haigh NG (2000) The ER translocon and retrotranslocation: is the shift into reverse manual or automatic? *Cell* 102: 709-712.
133. Blobel G, Dobberstein B (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light

- chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67: 835-851.
134. Walter P, Lingappa VR (1986) Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 2: 499-516.
 135. Mothes W, Prehn S, Rapoport TA (1994) Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* 13: 3973-3982.
 136. Krieg UC, Johnson AE, Walter P (1989) Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: identification by photocross-linking of a 39-kD integral membrane glycoprotein as part of a putative translocation tunnel. *J Cell Biol* 109: 2033-2043.
 137. Gorlich D, Rapoport TA (1993) Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75: 615-630.
 138. Nicchitta CV, Blobel G (1990) Assembly of translocation-competent proteoliposomes from detergent-solubilized rough microsomes. *Cell* 60: 259-269.
 139. Sanders SL, Whitfield KM, Vogel JP, Rose MD, Schekman RW (1992) Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* 69: 353-365.
 140. Gorlich D, Prehn S, Hartmann E, Kalies KU, Rapoport TA (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71: 489-503.
 141. Stirling CJ, Rothblatt J, Hosobuchi M, Deshaies R, Schekman R (1992) Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 3: 129-142.
 142. Wilkinson BM, Critchley AJ, Stirling CJ (1996) Determination of the transmembrane topology of yeast Sec61p, an essential component of the endoplasmic reticulum translocation complex. *J Biol Chem* 271: 25590-25597.
 143. Song W, Raden D, Mandon EC, Gilmore R (2000) Role of Sec61alpha in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel. *Cell* 100: 333-343.
 144. Cheng Z, Jiang Y, Mandon EC, Gilmore R (2005) Identification of cytoplasmic residues of Sec61p involved in ribosome binding and cotranslational translocation. *J Cell Biol* 168: 67-77.
 145. Pilon M, Romisch K, Quach D, Schekman R (1998) Sec61p serves multiple roles in secretory precursor binding and translocation into the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 9: 3455-3473.
 146. Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* 81: 561-570.
 147. Pilon M, Schekman R, Romisch K (1997) Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16: 4540-4548.
 148. Junne T, Schwede T, Goder V, Spiess M (2007) Mutations in the Sec61p channel affecting signal sequence recognition and membrane protein topology. *J Biol Chem* 282: 33201-33209.

149. Johnson AE, van Waes MA (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 799-842.
150. Hartmann E, Sommer T, Prehn S, Gorlich D, Jentsch S, et al. (1994) Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* 367: 654-657.
151. Esnault Y, Blondel MO, Deshaies RJ, Scheckman R, Kepes F (1993) The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 12: 4083-4093.
152. Beswick V, Brodsky JL, Kepes F, Neumann JM, Sanson A, et al. (1998) Expression, purification, and characterization of Sss1p, an essential component of the yeast Sec61p protein translocation complex. *Protein Expr Purif* 13: 423-432.
153. Biederer T, Volkwein C, Sommer T (1996) Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 15: 2069-2076.
154. Wilkinson BM, Esnault Y, Craven RA, Skiba F, Fieschi J, et al. (1997) Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. *EMBO J* 16: 4549-4559.
155. Esnault Y, Feldheim D, Blondel MO, Schekman R, Kepes F (1994) SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J Biol Chem* 269: 27478-27485.
156. Scheper W, Thaminy S, Kais S, Stagljar I, Romisch K (2003) Coordination of N-glycosylation and protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane by Sss1 protein. *J Biol Chem* 278: 37998-38003.
157. Gorlich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA (1992) A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* 357: 47-52.
158. High S, Martoglio B, Gorlich D, Andersen SS, Ashford AJ, et al. (1993) Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence. *J Biol Chem* 268: 26745-26751.
159. Sakaguchi M, Ueguchi C, Ito K, Omura T (1991) Yeast gene which suppresses the defect in protein export of a secY mutant of *E. coli*. *J Biochem* 109: 799-802.
160. Schroder K, Martoglio B, Hofmann M, Holscher C, Hartmann E, et al. (1999) Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4. *EMBO J* 18: 4804-4815.
161. Hori O, Miyazaki M, Tamatani T, Ozawa K, Takano K, et al. (2006) Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress. *Mol Cell Biol* 26: 4257-4267.
162. Walter P, Johnson AE (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* 10: 87-119.
163. Rapiejko PJ, Gilmore R (1997) Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell* 89: 703-713.
164. Powers T, Walter P (1997) Co-translational protein targeting catalyzed by the *Escherichia coli* signal recognition particle and its receptor. *EMBO J* 16: 4880-4886.

165. Yu YH, Sabatini DD, Kreibich G (1990) Antiribophorin antibodies inhibit the targeting to the ER membrane of ribosomes containing nascent secretory polypeptides. *J Cell Biol* 111: 1335-1342.
166. Brodsky JL, Goeckeler J, Schekman R (1995) BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9643-9646.
167. Hendershot L, Wei J, Gaut J, Melnick J, Aviel S, et al. (1996) Inhibition of immunoglobulin folding and secretion by dominant negative BiP ATPase mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5269-5274.
168. Jensen RE, Johnson AE (1999) Protein translocation: is Hsp70 pulling my chain? *Curr Biol* 9: R779-782.
169. Hamman BD, Hendershot LM, Johnson AE (1998) BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* 92: 747-758.
170. Skowronek MH, Rotter M, Haas IG (1999) Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol Chem* 380: 1133-1138.
171. Boisrame A, Kabani M, Beckerich JM, Hartmann E, Gaillardin C (1998) Interaction of Kar2p and Sls1p is required for efficient co-translational translocation of secreted proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 273: 30903-30908.
172. Tatu U, Helenius A (1997) Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 136: 555-565.
173. Rothblatt JA, Deshaies RJ, Sanders SL, Daum G, Schekman R (1989) Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol* 109: 2641-2652.
174. Deshaies RJ, Sanders SL, Feldheim DA, Schekman R (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349: 806-808.
175. Liberek K, Marszalek J, Ang D, Georgopoulos C, Zylicz M (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 2874-2878.
176. Misselwitz B, Staack O, Matlack KE, Rapoport TA (1999) Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J Biol Chem* 274: 20110-20115.
177. Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92: 381-390.
178. Musch A, Wiedmann M, Rapoport TA (1992) Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 69: 343-352.
179. Feldheim D, Schekman R (1994) Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J Cell Biol* 126: 935-943.
180. Lyman SK, Schekman R (1997) Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88: 85-96.
181. Plath K, Mothes W, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA (1998) Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* 94: 795-807.

182. Jermy AJ, Willer M, Davis E, Wilkinson BM, Stirling CJ (2006) The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J Biol Chem* 281: 7899-7906.
183. Hanein D, Matlack KE, Jungnickel B, Plath K, Kalies KU, et al. (1996) Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* 87: 721-732.
184. Zimmermann R, Sagstetter M, Lewis MJ, Pelham HR (1988) Seventy-kilodalton heat shock proteins and an additional component from reticulocyte lysate stimulate import of M13 procoat protein into microsomes. *EMBO J* 7: 2875-2880.
185. Roitsch T, Lehle L (1988) Post-translational translocation of polypeptides across the mammalian endoplasmic reticulum membrane is size and ribosome dependent. *Eur J Biochem* 174: 699-705.
186. Schmitz A, Herrgen H, Winkler A, Herzog V (2000) Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* 148: 1203-1212.
187. Schmitz A, Schneider A, Kummer MP, Herzog V (2004) Endoplasmic reticulum-localized amyloid beta-peptide is degraded in the cytosol by two distinct degradation pathways. *Traffic* 5: 89-101.
188. Plemper RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* 388: 891-895.
189. Kalies KU, Allan S, Sergeyenko T, Kroger H, Romisch K (2005) The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J* 24: 2284-2293.
190. Oyadomari S, Yun C, Fisher EA, Kreglinger N, Kreibich G, et al. (2006) Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. *Cell* 126: 727-739.
191. Huyer G, Piluek WF, Fansler Z, Kreft SG, Hochstrasser M, et al. (2004) Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispanning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem* 279: 38369-38378.
192. Denic V, Quan EM, Weissman JS (2006) A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* 126: 349-359.
193. Knop M, Finger A, Braun T, Hellmuth K, Wolf DH (1996) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J* 15: 753-763.
194. Kellis M, Birren BW, Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 428: 617-624.
195. Robb A, Brown JD (2001) Protein transport: two translocons are better than one. *Mol Cell* 8: 484-486.
196. Finke K, Plath K, Panzner S, Prehn S, Rapoport TA, et al. (1996) A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J* 15: 1482-1494.
197. Feng D, Zhao X, Soromani C, Toikkanen J, Romisch K, et al. (2007) The transmembrane domain is sufficient for Sbh1p function, its association with the Sec61 complex, and interaction with Rtn1p. *J Biol Chem* 282: 30618-30628.

198. Prinz A, Hartmann E, Kalies KU (2000) Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 381: 1025-1029.
199. Jiang Y, Cheng Z, Mandon EC, Gilmore R (2008) An interaction between the SRP receptor and the translocon is critical during cotranslational protein translocation. *J Cell Biol* 180: 1149-1161.
200. Wittke S, Dunnwald M, Albertsen M, Johnsson N (2002) Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13: 2223-2232.
201. Yan A, Lennarz WJ (2005) Two oligosaccharyl transferase complexes exist in yeast and associate with two different translocons. *Glycobiology* 15: 1407-1415.
202. Wilkinson BM, Tyson JR, Stirling CJ (2001) Ssh1p determines the translocation and dislocation capacities of the yeast endoplasmic reticulum. *Dev Cell* 1: 401-409.
203. Morgan DG, Menetret JF, Neuhof A, Rapoport TA, Akey CW (2002) Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17A resolution. *J Mol Biol* 324: 871-886.
204. Bessonneau P, Besson V, Collinson I, Duong F (2002) The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J* 21: 995-1003.
205. Mori H, Tsukazaki T, Masui R, Kuramitsu S, Yokoyama S, et al. (2003) Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes. *J Biol Chem* 278: 14257-14264.
206. Schaletzky J, Rapoport TA (2006) Ribosome binding to and dissociation from translocation sites of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 17: 3860-3869.
207. Hamman BD, Chen JC, Johnson EE, Johnson AE (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89: 535-544.
208. Flower AM, Hines LL, Pfennig PL (2000) SecG is an auxiliary component of the protein export apparatus of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 263: 131-136.
209. Nishiyama K, Hanada M, Tokuda H (1994) Disruption of the gene encoding p12 (SecG) reveals the direct involvement and important function of SecG in the protein translocation of *Escherichia coli* at low temperature. *EMBO J* 13: 3272-3277.
210. Nishiyama K, Mizushima S, Tokuda H (1993) A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J* 12: 3409-3415.
211. Bost S, Belin D (1995) A new genetic selection identifies essential residues in SecG, a component of the *Escherichia coli* protein export machinery. *EMBO J* 14: 4412-4421.
212. Flower AM (2001) SecG function and phospholipid metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183: 2006-2012.
213. Kontinen VP, Tokuda H (1995) Overexpression of phosphatidylglycerophosphate synthase restores protein translocation in a secG deletion mutant of *Escherichia coli* at low temperature. *FEBS Lett* 364: 157-160.

214. Sugai R, Shimizu H, Nishiyama K, Tokuda H (2004) Overexpression of *gnsA*, a multicopy suppressor of the *secG* null mutation, increases acidic phospholipid contents by inhibiting phosphatidylethanolamine synthesis at low temperatures. *J Bacteriol* 186: 5968-5971.
215. Sugai R, Takemae K, Tokuda H, Nishiyama K (2007) Topology inversion of SecG is essential for cytosolic SecA-dependent stimulation of protein translocation. *J Biol Chem* 282: 29540-29548.
216. Nishiyama K, Suzuki T, Tokuda H (1996) Inversion of the membrane topology of SecG coupled with SecA-dependent preprotein translocation. *Cell* 85: 71-81.
217. Nagamori S, Nishiyama K, Tokuda H (2000) Two SecG molecules present in a single protein translocation machinery are functional even after crosslinking. *J Biochem* 128: 129-137.
218. Bost S, Belin D (1997) *prl* mutations in the *Escherichia coli* *secG* gene. *J Biol Chem* 272: 4087-4093.
219. Bost S, Silva F, Rudaz C, Belin D (2000) Both transmembrane domains of SecG contribute to signal sequence recognition by the *Escherichia coli* protein export machinery. *Mol Microbiol* 38: 575-587.
220. DeLong EF, Pace NR (2001) Environmental diversity of bacteria and archaea. *Syst Biol* 50: 470-478.
221. Kinch LN, Saier MH, Jr., Grishin NV (2002) Sec61beta--a component of the archaeal protein secretory system. *Trends Biochem Sci* 27: 170-171.
222. Toikkanen J, Gatti E, Takei K, Saloheimo M, Olkkonen VM, et al. (1996) Yeast protein translocation complex: isolation of two genes SEB1 and SEB2 encoding proteins homologous to the Sec61 beta subunit. *Yeast* 12: 425-438.
223. Toikkanen JH, Sundqvist L, Keranen S (2004) *Kluyveromyces lactis* SSO1 and SEB1 genes are functional in *Saccharomyces cerevisiae* and enhance production of secreted proteins when overexpressed. *Yeast* 21: 1045-1055.
224. De Craene JO, Coleman J, Estrada de Martin P, Pypaert M, Anderson S, et al. (2006) Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 17: 3009-3020.
225. Matlack KE, Plath K, Misselwitz B, Rapoport TA (1997) Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* 277: 938-941.
226. Ng W, Sergeyenko T, Zeng N, Brown JD, Romisch K (2007) Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 120: 682-691.
227. van Ooyen AJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn MM, Jacobs DI, et al. (2006) Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 6: 381-392.
228. Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM (2004) Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol* 109: 63-81.
229. Marchal R, Vandecasteele JP, Metche M (1977) Regulation of the central metabolism in relation to citric acid production in *Saccharomyces lipolytica*. *Arch Microbiol* 113: 99-104.
230. Wittner M, Weiss LM (1999) *The Microsporidia and Microsporidiosis*; ASM Press W, DC, editor.

231. Didier ES, Weiss LM (2006) Microsporidiosis: current status. *Curr Opin Infect Dis* 19: 485-492.
232. Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, Metenier G, Thomarat F, et al. (2001) Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414: 450-453.
233. Slamovits CH, Burri L, Keeling PJ (2006) Characterization of a divergent Sec61beta gene in microsporidia. *J Mol Biol* 359: 1196-1202.
234. Wu Z, Li Y, Pan G, Li C, Hu J, et al. (2007) A complete Sec61 complex in *Nosema bombycis* and its comparative genomics analyses. *J Eukaryot Microbiol* 54: 379-380.
235. Surpin M, Raikhel N (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 100-109.
236. Yang ZJ, Zhou JP, Li GR, Zhang Y, Ren ZL (2007) [Cloning and expression of *Gymnadenia conopsea* GcSec61beta gene encoding endoplasmic reticulum membrane translocation channel protein]. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao* 33: 354-360.
237. Valcarcel R, Weber U, Jackson DB, Benes V, Ansorge W, et al. (1999) Sec61beta, a subunit of the protein translocation channel, is required during *Drosophila* development. *J Cell Sci* 112 (Pt 23): 4389-4396.
238. Kalies KU, Rapoport TA, Hartmann E (1998) The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol* 141: 887-894.
239. Levy R, Wiedmann M, Kreibich G (2001) In vitro binding of ribosomes to the beta subunit of the Sec61p protein translocation complex. *J Biol Chem* 276: 2340-2346.
240. Helmers J, Schmidt D, Glavy JS, Blobel G, Schwartz T (2003) The {beta}-Subunit of the Protein-conducting Channel of the Endoplasmic Reticulum Functions as the Guanine Nucleotide Exchange Factor for the {beta}-Subunit of the Signal Recognition Particle Receptor. *J Biol Chem* 278: 23686-23690.
241. Ingley E, Williams JH, Walker CE, Tsai S, Colley S, et al. (1999) A novel ADP-ribosylation like factor (ARL-6), interacts with the protein-conducting channel SEC61beta subunit. *FEBS Lett* 459: 69-74.
242. Kondratyev M, Avezov E, Shenkman M, Groisman B, Lederkremer GZ (2007) PERK-dependent compartmentalization of ERAD and unfolded protein response machineries during ER stress. *Exp Cell Res* 313: 3395-3407.
243. Bebok Z, Mazzochi C, King SA, Hong JS, Sorscher EJ (1998) The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J Biol Chem* 273: 29873-29878.
244. Chen Y, Le Caherec F, Chuck SL (1998) Calnexin and other factors that alter translocation affect the rapid binding of ubiquitin to apoB in the Sec61 complex. *J Biol Chem* 273: 11887-11894.
245. Liao HJ, Carpenter G (2007) Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol Biol Cell* 18: 1064-1072.

246. Hood-Degrenier JK (2008) A Western blot-based investigation of the yeast secretory pathway designed for an intermediate-level undergraduate cell biology laboratory. *CBE Life Sci Educ* 7: 107-117.
247. Ng DT, Brown JD, Walter P (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* 134: 269-278.
248. Muller S, Sandal T, Kamp-Hansen P, Dalboge H (1998) Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14: 1267-1283.
249. Moore DT, Berger BW, DeGrado WF (2008) Protein-protein interactions in the membrane: sequence, structural, and biological motifs. *Structure* 16: 991-1001.
250. Pogliano KJ, Beckwith J (1993) The *Cs sec* mutants of *Escherichia coli* reflect the cold sensitivity of protein export itself. *Genetics* 133: 763-773.
251. Baldwin RL (1986) Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 8069-8072.
252. Danese PN, Murphy CK, Silhavy TJ (1995) Multicopy suppression of cold-sensitive *sec* mutations in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 4969-4973.
253. Vega R, Dominguez A (1986) Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Yarrowia lipolytica*. *Arch Microbiol* 144: 124-130.
254. Guerin R, Arseneault G, Dumont S, Rokeach LA (2008) Calnexin Is Involved in Apoptosis Induced by ER Stress in the Fission Yeast. *Mol Biol Cell*.
255. Mahoney WC, Duksin D (1979) Biological activities of the two major components of tunicamycin. *J Biol Chem* 254: 6572-6576.
256. Marechal A, Tanguay PL, Callejo M, Guerin R, Boileau G, et al. (2004) Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *Biochem J* 380: 441-448.
257. Parlati F, Dignard D, Bergeron JJ, Thomas DY (1995) The calnexin homologue *cnx1+* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J* 14: 3064-3072.
258. Jannatipour M, Rokeach LA (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J Biol Chem* 270: 4845-4853.
259. Collin P, Beauregard PB, Elagoz A, Rokeach LA (2004) A non-chromosomal factor allows viability of *Schizosaccharomyces pombe* lacking the essential chaperone calnexin. *J Cell Sci* 117: 907-918.
260. Turcotte C, Roux A, Beauregard PB, Guerin R, Senechal P, et al. (2007) The calnexin-independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 7: 196-208.
261. Antal Z, Rasle C, Fevre M, Bruel C (2004) Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Curr Genet* 46: 240-246.
262. Sato S, Suzuki H, Widyastuti U, Hotta Y, Tabata S (1994) Identification and characterization of genes induced during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 26: 31-37.
263. Roberts BT, Wickner RB (2004) A new kind of prion: a modified protein necessary for its own modification. *Cell Cycle* 3: 100-103.

264. Nakashima A, Hasegawa T, Mori S, Ueno M, Tanaka S, et al. (2006) A starvation-specific serine protease gene, *isp6+*, is involved in both autophagy and sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 49: 403-413.
265. Nakashima A, Ueno M, Ushimaru T, Uritani M (2002) Involvement of a CCAAT-binding complex in the expression of a nitrogen-starvation-specific gene, *isp6+*, in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 2224-2227.