

Université de Montréal

Caractérisation de la voie permettant la viabilité de *Schizosaccharomyces pombe* en  
l'absence de calnexine

Par

Cynthia Turcotte

Département de biochimie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en Biochimie

31 août 2006

@, Cynthia Turcotte, 2006



W

H

US8

2007

V.035

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Caractérisation de la voie permettant la viabilité de *Schizosaccharomyces pombe* en  
l'absence de calnexine

Présenté par :  
Cynthia Turcotte

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pascal Chartrand, PhD  
Président-rapporteur

Luis A. Rokeach, PhD  
Directeur de recherche

Normand Brisson, PhD  
Membre du jury

## Résumé français

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, la chaperone moléculaire calnexine (Cnx1p) a été démontrée comme étant essentielle pour la viabilité de cette levure. Par contre, nous avons récemment découvert que dans certaines circonstances, les cellules de *S. pombe* sont capables de survivre en l'absence de calnexine/Cnx1p, indiquant qu'une voie inductible complète la ou les fonction(s) essentielle(s) de la calnexine. Cet état calnexine-indépendant (Cin) est transmis par un élément protéique non-chromosomal exhibant plusieurs caractéristiques des prions de levure. Pour vérifier à quel point l'état Cin compense pour l'absence de calnexine/Cnx1p, l'état Cin a été mieux caractérisé. Les cellules Cin présentent des défauts de la paroi cellulaire, une sensibilité au choc thermique, tout comme un plus haut niveau de sécrétion d'une glycoprotéine modèle. Ces résultats indiquent que l'état Cin ne compense pas pour toutes les fonctions de la calnexine/Cnx1p. La réintroduction d'un plasmide *cnx1*<sup>+</sup> récupère partiellement la plupart des phénotypes des cellules Cin, mais pas tous. Ainsi, les cellules Cin en phase stationnaire ont un niveau élevé d'activation des caspases et ce phénotype n'est pas réduit par la réintroduction de *cnx1*<sup>+</sup>, suggérant que les cellules dans l'état Cin sont sujettes à un stress autre que l'absence de calnexine/Cnx1p. En second lieu, la voie par laquelle l'état Cin est induit a été partiellement caractérisée. Un criblage génétique de surexpression de banques d'ADNc a permis d'identifier quelques gènes induisant l'état Cin, dont les gènes codants pour les enzymes glycolytiques pyruvate kinase (*pyk1*) et phosphoglycérate kinase (*pgk1*).

### Mots clés français

Repliement des protéines; chaperone moléculaire; prion; sécrétion des protéines; *S. pombe*; caspases

## Résumé anglais

In the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the molecular chaperone calnexin (Cnx1p) was shown to be essential for viability. However, we recently reported that under certain circumstances, *S. pombe* cells are able to survive in absence of calnexin/Cnx1p, indicating that an inducible pathway can complement the calnexin/Cnx1p essential function(s). This calnexin independent state (Cin) is transmitted by a non-chromosomal proteinaceous element exhibiting several prion-like properties. To assess to which extent the Cin state compensates for the absence of calnexin/Cnx1p, the Cin strain was further characterised. Cin cells exhibited cell-wall defects, sensitivity to heat shock, as well as higher secretion levels of a model glycoprotein. Together these results indicate that the Cin state does not compensate for all calnexin/Cnx1p functions. Reintroduction of plasmid-borne *cnx1*<sup>+</sup> partially rescued most but not all of the phenotypes displayed by Cin cells. Interestingly, Cin cells in stationary phase exhibited increased levels of caspase activation, and this phenotype was not suppressed by reintroduction of *cnx1*<sup>+</sup>, suggesting that cells in the Cin state are subjected to a stress other than the absence of calnexin/Cnx1p. Secondly, the pathway inducing the Cin state was partially characterised. A genetic screen overexpressing cDNA banks lead to the identification of a few genes inducing the Cin state, including the genes coding for the glycolytic enzymes pyruvate kinase (*pyk1*) and phosphoglycerate kinase (*pgk1*).

### Mots clés anglais

Protein folding; molecular chaperone; prion; protein secretion; fission yeast; caspases

## Table des matières

Résumé français .....	ii
Résumé anglais.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des abréviations.....	viii
Remerciements.....	x
1. Introduction.....	1
1.1 Le réticulum endoplasmique.....	2
1.1.1 Entrée dans le RE.....	4
1.2 Modifications .....	5
1.2.1 La N-glycosylation.....	6
1.2.2 Formation de ponts disulfures.....	8
1.2.3 L'isomérisation des prolines .....	10
1.3 Le repliement des protéines .....	11
1.3.1 BiP.....	12
1.4 La famille calnexine/calréticuline.....	13
1.4.1 Structure de la calnexine .....	14
1.4.2 Rôle comme lectine.....	16
1.4.3 Fonction chaperone classique .....	18
1.4.4 La calnexine chez la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	22
1.4.5 La calnexine chez la levure <i>S. pombe</i> .....	23
1.4.6 Les partenaires de la calnexine .....	23
1.5 Contrôle de qualité .....	25
1.6 ERAD.....	26
1.7 La réponse au stress de protéines mal repliées (UPR).....	30
1.7.1 Le UPR chez <i>S. cerevisiae</i> .....	30
1.7.2 Le UPR chez les cellules mammifères.....	31
1.8 Maladies liées au repliement des protéines.....	33
1.8.1 La protéine prion (PrP) .....	34
1.8.2 Des prions chez la levure .....	36
1.8.3 [PSI <sup>+</sup> ] .....	36
1.8.4 [URE3] .....	38
1.8.5 [RNQ <sup>+</sup> ].....	39
1.8.6 [HET-s].....	39
1.8.7 Caractéristiques des prions de levure.....	40
1.9 Un prion chez <i>S. pombe</i> .....	41
1.10 Le projet de recherche.....	43
2. Caractérisation phénotypique des cellules Cin .....	45
2.1 The calnexin-independent state does not compensate for all calnexin functions in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> .....	46
2.2 Contribution des auteurs .....	46
2.3 Abstract .....	47

2.4	Introduction.....	48
2.5	Materials and Methods.....	51
2.6	Results.....	54
2.6.1	Cin cells are sensitive to cell-wall stresses .....	54
2.6.2	Cin cells are sensitive to calcium .....	58
2.6.3	Cin cells are sensitive to heat shock but not to protein folding stresses .....	58
2.6.4	The secretion efficiency of the glycoprotein cellulase is considerably increased in Cin cells .....	60
2.6.5	Increased levels of caspase activity in Cin cells .....	63
2.7	Discussion.....	66
2.8	Acknowledgements.....	70
2.9	Reference list.....	71
3.	Caractérisation de la voie d'induction de l'état Cin.....	76
3.1	Contribution des auteurs .....	77
3.2	Introduction.....	78
3.3	Matériel et méthodes .....	81
3.4	Résultats.....	88
3.4.1	Un criblage génétique lie <i>pyk1</i> et <i>pgk1</i> à l'état Cin .....	89
3.4.2	Implication d'un prion dans la voie .....	91
3.4.3	Implication métabolique.....	92
3.4.4	Les conditions de stress n'induisent pas l'état Cin .....	96
4.	Discussion.....	100
4.1	La calnexine/Cnx1 est impliquée dans la synthèse de la paroi cellulaire. ....	101
4.2	La calnexine/Cnx1p n'est pas essentielle à la résistance aux stress de repliement des protéines.....	102
4.3	La calnexine permet le repliement de certaines protéines sécrétées .....	103
4.5	La calnexine et le stress thermique .....	104
4.6	La calnexine liée à l'apoptose .....	104
4.7	Deux gènes glycolytiques causent l'apparition de l'état Cin.....	106
4.8	<i>pgk1</i> et <i>pyk1</i> agiraient en amont de <i>cif1</i> .....	106
4.9	Un rôle métabolique pour <i>pgk1</i> et <i>pyk1</i> .....	107
4.10	Un rôle alternatif pour P <sub>gk1p</sub> et P <sub>yk1p</sub> .....	109
4.11	Impact des métabolites.....	110
	Références.....	112



## Liste des tableaux

### Chapitre 2

Table I Yeast strains used for this study .....	51
---	----

### Chapitre 3

Tableau I Souches de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> utilisées dans cette étude .....	87
--	----

Tableau II Essais de perte plasmidique de la souche SP6089 dans des conditions de stress .....	99
---	----

## Liste des figures

### Chapitre 1

Figure 1 La voie vacuolaire centrale .....	3
Figure 2 La N-glycosylation. ....	7
Figure 3 Formation de ponts disulfures .....	9
Figure 4 Isomérisation des prolines .....	11
Figure 5 Structure de la calnexine.....	15
Figure 6 Le cycle de la calnexine.....	17
Figure 7 Le modèle de Williams.....	20
Figure 8 L'ubiquitination.....	28
Figure 9 Dégradation associée au RE (ERAD).....	29
Figure 10 La réponse au stress de repliement des protéines (UPR).....	32
Figure 11 PrP <sup>C</sup> et Prp <sup>Sc</sup> adoptent des conformations différentes .....	35
Figure 12 Les effets de [PSI <sup>+</sup> ] sur Sup35 et la terminaison de la traduction .....	37
Figure 13 Effets de [URE3] sur Ure2 et l'import d'uréidosuccinate .....	38
Figure 14 Modèles explicatifs de l'état Cin.....	42

### Chapitre 2

Figure 1 Cin cells display aberrant morphology.....	55
Figure 2 Cin cells display cell-wall sensitivity.....	57
Figure 3 Phenotypic characterisation of Cin cells.....	59
Figure 4 Cin cells secrete considerably more cellulase than WT.....	62
Figure 5 Increased caspase induction in Cin cells and in <i>cnx1</i> mutants.....	65

### Chapitre 3

Figure 15 Stratégie du criblage génétique de surexpression.....	84
Figure 16 Résultats du criblage génétique .....	90
Figure 17 Analyse de la protéine prion Cif1p.....	91
Figure 18 Implication de la glycolyse dans l'état Cin .....	93
Figure 19 Effets de métabolites sur l'induction de l'état Cin .....	95
Figure 20 Localisation de Pgk1p et de Pyk1p.....	97

### Chapitre 4

Figure 21: Dégradation du glucose par la voie de la glycolyse .....	108
---	-----

## Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
ARN	acide ribonucléique
Asn	asparagine (N)
ATP	adénosine triphosphate
BiP	<i>immunoglobulin binding protein</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
Cif	facteur d'indépendance à la calnexine
Cin	calnexine-indépendant
Cnx	calnexine
CsA	cyclosporine A
Crt	calréticuline
DTT	dithiothréitol
EDEM	<i>ER degradation-enhancing <math>\alpha</math>-mannosidase-like protein</i>
eIF2 $\alpha$	facteur d'initiation de la transcription 2 $\alpha$
ERAD	dégradation associée au RE
EtOH	éthanol
FBP	fructose-1,6-biphosphate
FKBP	<i>FK506 binding protein</i>
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
Glc	glucose
GlcNAc	N-acétyl-glucosamine
hcd	domaine hautement conservé
HSA	<i>human serum albumin</i>
Hsp	protéine du choc thermique
IgG	immunoglobuline G
Man	mannose
MHCI	complexe d'histocompatibilité majeur de classe I
mRFP	protéine fluorescente rouge monomérique

OST	oligosaccharide transférase
PDI	protéine disulfide isomérase
PEG	polyéthylène glycol
Pfk	phosphofructokinase
PGK	phosphoglycérate kinase
PPI	peptidyl-prolyl <i>cis/trans</i> isomérase
PS	peptide signal
Pyk	pyruvate kinase
Scx	suppresseur de la fonction essentielle de la calnexine
SRP	particule de reconnaissance du signal
RE	réticulum endoplasmique
RMN	résonance magnétique nucléaire
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodécyl sulphate
Ser	sérine
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Thr	thréonine
TM	domaine transmembranaire
UDP	uridine diphosphate
UGGT	UDP-Glucose :: glucosyltransférase
UPR	réponse au stress de protéines mal-repliées
UPRE	élément de réponse au stress de protéines mal-repliées
VSV-G	protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Luis A. Rokeach, d'avoir partagé sa curiosité scientifique et de m'avoir donné la chance de faire un stage puis une maîtrise dans son laboratoire.

Un merci tout particulier à mon amie Renée Guérin avec qui j'ai travaillé en étroite collaboration sur le projet du criblage génétique. C'est en travaillant à deux que le travail est le plus productif et le plus agréable.

Je remercie également tous mes amis du laboratoire Patrick, Pascale, Fadi, Antoine, Alex L., Frédérick, Alex M. et Pierre-Luc pour les discussions et les conseils tout au long de ces trois années. Bonne chance à tous.

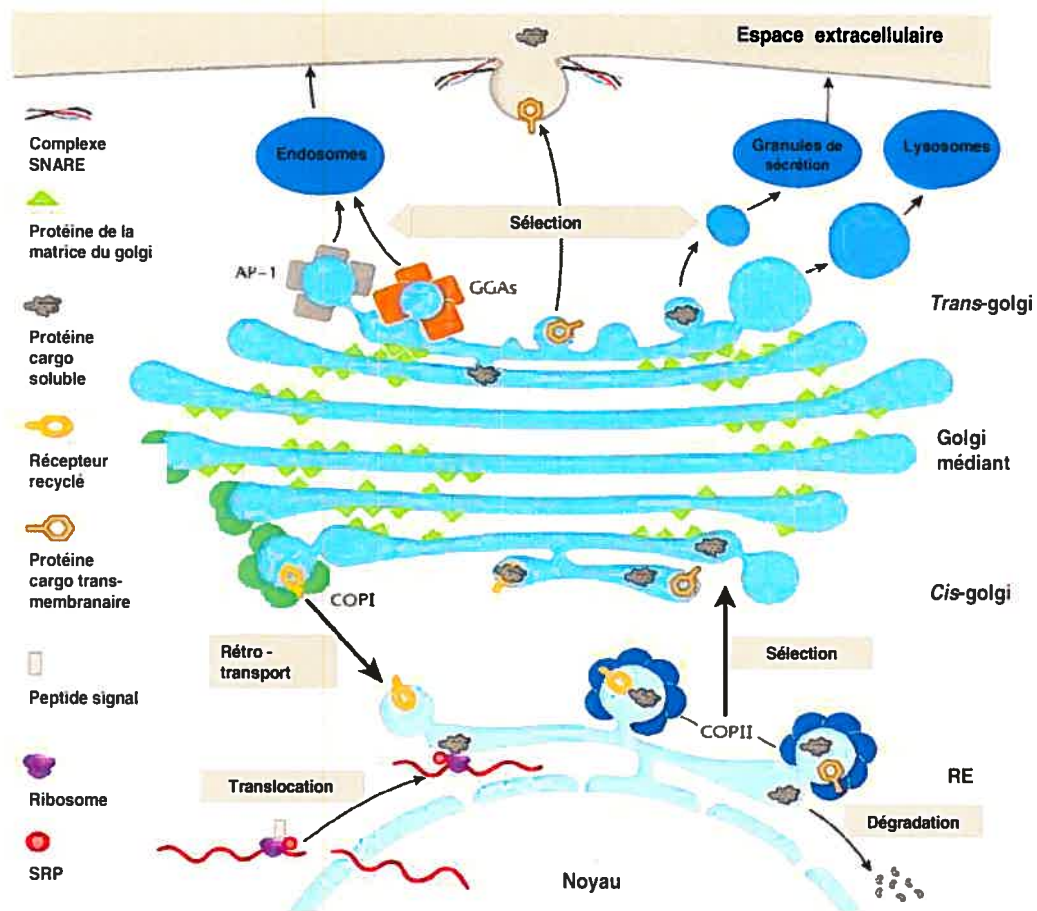
Merci à mes parents et à mon frère pour leur amour et leur support constant, ainsi qu'à mes amis, particulièrement Sophie, Annie et François, pour leur présence et leurs encouragements. Finalement, Daniel, mon amour, merci pour tout.

## **1. Introduction**

## 1.1 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est une organelle dynamique occupant jusqu'à 10% du volume cellulaire et comptant environ 50% des membranes cellulaires. Cette organelle ayant la forme d'un vaste réseau s'étend du noyau, avec lequel elle partage une double membrane, au reste de la cellule. Le réticulum endoplasmique lisse exerce plusieurs fonctions cruciales pour la cellule comme la synthèse des phospholipides et du cholestérol, ainsi que de réserve de membranes aux organelles et à l'endocytose. Le RE veille aussi à l'homéostasie du calcium intracellulaire tout en servant de réserve au calcium excédentaire (1).

Le RE est également le lieu de synthèse des protéines destinées aux autres organelles (RE, appareil de golgi, lysosomes, endosomes), à la membrane cellulaire ainsi qu'aux protéines sécrétées. Ces protéines traduites dans le cytosol sont transloquées de façon co- ou post-traductionnelle au RE rugueux à l'intérieur duquel elles sont repliées et modifiées; c'est le début de la voie vacuolaire centrale (2). Les protéines assemblées sont ensuite transportées dans l'appareil de golgi par des vésicules de transport. Ces vésicules de transport font la navette entre les organelles en bourgeonnant et fusionnant avec les différents compartiments. Les vésicules formées dans le RE lisse sont tapissées du complexe COPII essentiel au transport puisqu'il sélectionne et concentre le cargo à un endroit de la membrane à partir du contenu luminal directement (dans le cas de plusieurs protéines transmembranaires) ou indirectement à l'aide de récepteurs spécifiques (dans le cas des protéines solubles et de quelques protéines transmembranaires). Le complexe COPII déforme ensuite la membrane pour générer les vésicules qui sont transportées aux citernes Cis de l'appareil de golgi où elles fusionnent et déversent leur contenu. Les protéines transportées sont triées et parcourent la voie de sécrétion jusqu'à leur organelle de destination ou l'extérieur de la cellule dans le cas des protéines sécrétées. Il est également possible que des protéines résidentes du RE soient transportées; ces protéines contiennent une séquence signal en C-terminal -KDEL chez les mammifères ou -HDEL chez la levure qui leur permet d'être recrutées par le complexe COPI et d'être rétro transportées vers le RE (3, 4).



**Figure 1** La voie vacuolaire centrale

Schéma représentant la voie vacuolaire centrale. Les protéines néosynthétisées entrent dans la voie de sécrétion par le RE où elles sont modifiées, repliées et dirigées vers leur organelle de destination ou sécrétées. Adapté de (5).



L'appareil de golgi est composé d'une série de citernes qui composent les réseaux du *cis*-golgi, le golgi médian et le *trans*-golgi. Cette organelle dynamique synthétise une grande partie des oligosaccharides de la cellule; c'est également en passant à travers ce réseau que les oligosaccharides des glycoprotéines mûrissent (6). À partir du *trans*-golgi, les protéines sont encore une fois triées, puis acheminées à leur organelle de destination ou sécrétées à l'extérieur de la cellule.

### 1.1.1 Entrée dans le RE

Les protéines traversent la membrane par un pore appelé translocon pour entrer dans le RE. Ce complexe protéique est composé de trois types de protéines, soit Sec61  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , ou encore Sec61p, Sss1p et Sbh1p chez la levure *S. cerevisiae*. Les sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  sont essentielles à la viabilité des levures et des eubactéries, il en a été déduit que ces sous-unités forment le cœur du translocon (7). Par ailleurs, il a été démontré que Sec61 $\alpha$  est le site de recrutement majeur du ribosome (8), alors que Sec61 $\beta$  facilite l'entrée du polypeptide dans le translocon (9) et joue un rôle dans la sortie des domaines transmembranaires du site de translocation (10). Le translocon possède une ouverture d'un diamètre variant entre 20 et 60 Å, ce qui est trop petit pour laisser passer librement une protéine repliée. Les protéines doivent donc transiter vers le RE dans un état déplié (11), de façon co- ou post-traductionnelle.

Dans la translocation co-traductionnelle, les chaînes polypeptidiques sont munies d'une séquence signal en N-terminal qui est habituellement constituée d'une suite de 9-12 acides aminés hydrophobes qui est rapidement reconnue et prise en charge par le complexe ribonucléoprotéique cytosolique nommé particule de reconnaissance du signal (SRP). Cette interaction bloque la traduction subséquente du ribosome et le complexe est emmené vers le pore de translocation. Une fois à la membrane du RE, le complexe ribosome-SRP se dissocie et le ribosome accoste sur le pore de translocation qui s'ouvre et permet le passage de la chaîne polypeptidique qui est alors synthétisée (12). Le

translocon permet également l'intégration des domaines transmembranaires des protéines dans la bicouche lipidique par une ouverture latérale du pore (2).

La translocation post-traductionnelle a lieu lorsque les protéines entrent dans le RE suite à leur synthèse complète. Seulement certaines protéines mammifères utilisent ce type de translocation, alors que les eucaryotes inférieurs comme *S. cerevisiae* utilisent principalement ce mécanisme (13). Suite à leur détachement du ribosome, les chaînes polypeptidiques interagissent avec des chaperones cytosoliques comme Hsp70 et le complexe de chaperonine TriC/CCT afin de les maintenir dans un état non-structuré. La translocation débute lorsque le polypeptide est reconnu par le complexe multiprotéique Sec63 qui agit comme un récepteur membranaire pour les protéines transloquées post-traductionnellement. Sec63 livre la protéine au pore Sec61 qui reconnaît sa séquence signal (2). Contrairement à la translocation co-traductionnelle, ce type de translocation nécessite l'application d'une force pour faire passer la protéine vers le lumen du RE. Cette force serait exercée par un mouvement de cliquet (*ratchet*) Brownien, c'est-à-dire que le peptide sortant du lumen est lié par la chaperone luminale BiP, prévenant le mouvement de retour vers le cytosol. Il en résulte donc un mouvement net vers le lumen lors de la translocation (14).

## 1.2 Modifications

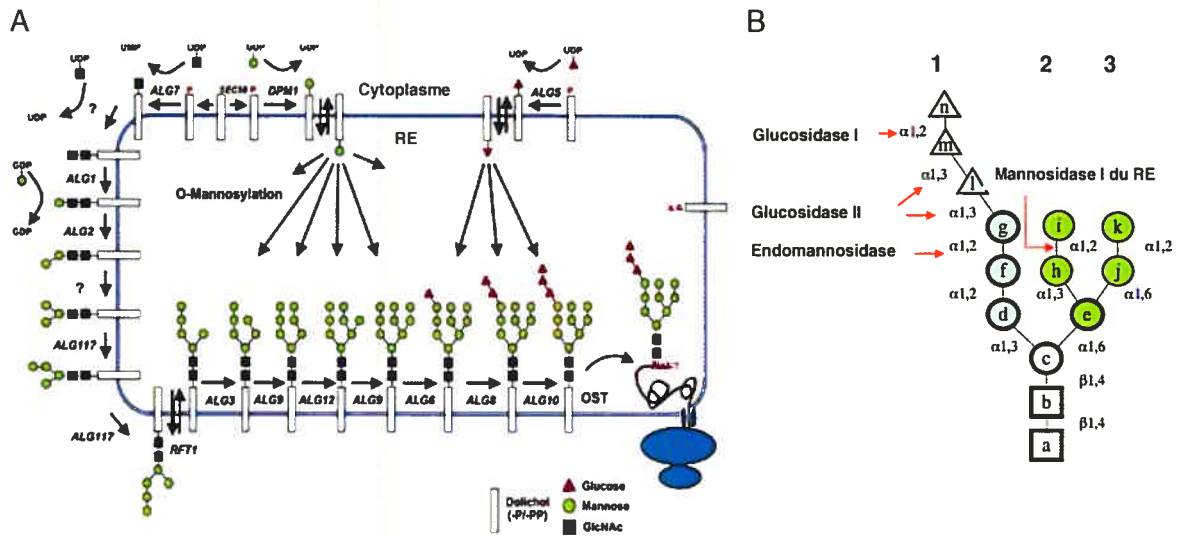
La lumière du réticulum endoplasmique est un milieu très riche, sa densité atteignant 100 mg de protéines par mL. Les protéines doivent acquérir une structure tridimensionnelle précise afin d'acquérir leur activité. Les polypeptides entrants doivent se replier dans un milieu dense. Ils subissent donc un certain nombre de modifications pour atteindre leur structure, puis leur repliement est facilité par une batterie de foldases et de chaperones moléculaires.

### 1.2.1 La N-glycosylation

La plupart des protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique sont des glycoprotéines. Les oligosaccharides sont ajoutés en bloc au polypeptide en formation sur des résidus asparagines de la séquence consensus Asn-X-Ser/Thr où X n'est pas une proline. Ce phénomène est nommé la N-glycosylation.

La structure de base des oligosaccharides a la forme d'un arbre fait de trois glucoses, neuf mannoses et deux N-acétyl-glucosamines ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ). Cette structure est synthétisée conjointement dans le cytosol et dans le RE. La synthèse débute dans le cytoplasme où un GlcNAc-1-phosphate est transféré à partir de l'UDP-GlcNAc à un transporteur lipidique, le dolichol-pyrophosphate (Figure 2A, p.7), puis un GlcNAc et cinq résidus mannose sont ajoutés par des monosaccharyl-transférases. L'oligosaccharide  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  est ensuite flippé à travers la membrane dans le lumen du RE à l'aide d'une flippase ATP-indépendante, nommée RTF1 chez la levure, puis des glycosyltransférases ajoutent quatre résidus mannose et trois résidus glucose pour former la structure complète. Ces glycosyltransférases démontrent une affinité pour un seul type d'oligosaccharide, ce qui permet la synthèse ordonnée de la structure particulière de l'oligosaccharide de base (Figure 2B, p.7) (15).

Après avoir acquis le troisième résidu glucose (Figure 2B, résidu n, p.7), l'oligosaccharide est recruté par l'enzyme oligosaccharide transférase (OST) puis transféré en bloc sur la chaîne polypeptidique cible (16, 17). L'OST est associée au complexe du translocon (18); cette enzyme entre donc en contact avec le polypeptide dès son entrée dans le RE et parcourt le polypeptide pour identifier une séquence consensus et y transférer un oligosaccharide sur le résidu asparagine (15). L'oligosaccharide est ensuite taillé dans le RE où il perd successivement les résidus glucoses (Figure 2B, résidus n, m et l, p.7) et le mannose (Figure 2B, résidu i, p.7). La protéine passera ensuite au golgi où des mannosidases cliveront plusieurs autres résidus mannose qui seront remplacés par des résidus GlcNAc, galactoses et acide sialiques pour donner des oligosaccharides complexes de formes variables (6).



**Figure 2** La N-glycosylation.

A) Synthèse de l'oligosaccharide de base. Les locus nécessaires à chacune des étapes chez la levure sont indiqués. B) La structure de base de l'oligosaccharide N-lié. L'oligosaccharide est composé de trois résidus glucose (triangles), de neuf mannoses (cercles) et de deux N-acétylglucosamide (carrés). Les résidus bleus sont impliqués dans l'interaction des glycanes monoglucosylés avec la calnexine/calréticuline. Les résidus en vert, à l'exception de i, interagissent possiblement avec EDEM. Les sites de clivage de quelques glycosidases impliquées dans la maturation des oligosaccharides sont indiqués. Adapté de (15).

L'importance de la glycosylation des protéines a été mise en évidence dans les années 70 lorsque la sécrétion des glycoprotéines a grandement été diminuée suite à l'utilisation d'un inhibiteur de la N-glycosylation nommé tunicamycine. De la même façon, plusieurs polypeptides ne réussissent pas à acquérir leur structure tridimensionnelle correcte en l'absence de glycosylation (15). La glycosylation est donc nécessaire au repliement de certaines glycoprotéines et peut influencer la structure des petites protéines (19). Ainsi, la présence d'un oligosaccharide rigidifie la conformation par encombrement stérique en limitant les conformations possibles de la chaîne polypeptidique dans l'espace. De plus, il est possible que certains sucres stabilisent la structure locale de la chaîne polypeptidique (20) et qu'une interaction entre le groupe N-acétyl du premier GlcNAc (Figure 2B, résidu a, p.7) et le peptide en formation favorise la formation d'un tour-β (21). Enfin, la glycosylation joue un rôle dans le contrôle de qualité des protéines lors du cycle de la calnexine qui sera décrit plus loin. De façon plus générale, l'ajout de ces sucres joue

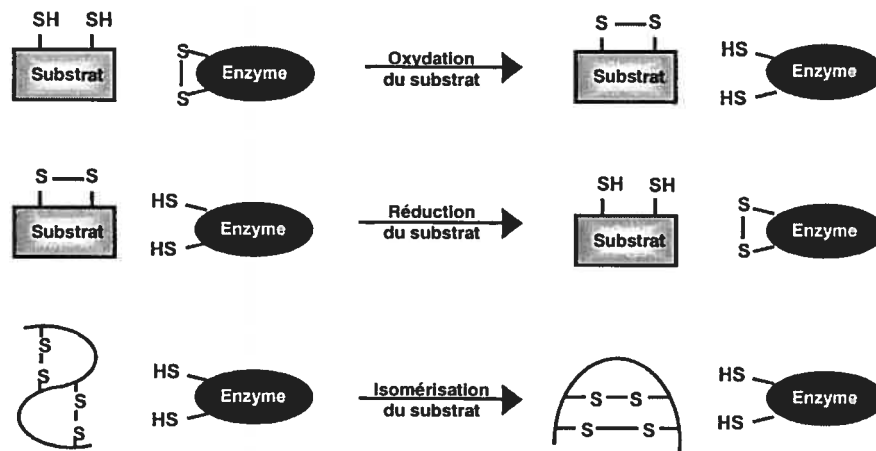
plusieurs fonctions : ce sont des ligands dans plusieurs processus, ils stabilisent les protéines contre la dénaturation et la protéolyse, augmentent la stabilité et la solubilité des protéines, modulent des réponses immunitaires, facilitent l'orientation des protéines par rapport aux membranes et ajustent la charge et le point isoélectriques des protéines (15, 19).

Le repliement des protéines dans le RE commence de façon co-translocationnelle, quand le polypeptide passe à travers le complexe du translocon pour aller vers la lumière du RE ou à travers la membrane pour les protéines trans-membranaires. Ce processus continue après que le polypeptide se soit dissocié du ribosome et du translocon. Contrairement aux protéines cytoplasmiques, la plupart des protéines du RE acquièrent des ponts disulfures par l'oxydation des groupements thiol des résidus cystéines. Ce processus est catalysé par des protéines disulfides isomérases.

### **1.2.2 Formation de ponts disulfures**

La lumière du réticulum endoplasmique est un milieu très différent du cytosol; c'est un milieu riche en calcium (1 mM vs 100 nM) et oxydant (-230 mV vs -150 mV). Le potentiel oxydant du RE s'apparente donc plus au milieu extracellulaire qu'au cytoplasme qui est un milieu réducteur. Puisqu'il est oxydant, l'environnement du RE favorise la formation de ponts disulfures entre les groupements thiol (-SH) des résidus cystéines des chaînes polypeptidiques (22). Ces liaisons permettent de stabiliser la structure tertiaire et quaternaire des protéines et sont souvent nécessaires au bon fonctionnement de ces dernières. Cependant, il y a abondance de résidus cystéines pouvant former des ponts disulfures au sein d'une protéine. L'étape limitante n'est donc pas l'oxydation des résidus cystéines en cystine, mais bien la formation de ponts disulfures entre les deux résidus qui donneront à la protéine sa structure correcte. Pour ce faire, les liaisons disulfures incorrectes doivent être brisées (réduction) ou encore réarrangées (isomérisation); ces réactions sont catalysées par des enzymes oxydoréductases tant dans le milieu extracellulaire que dans le RE (23).

Dans le RE, les oxydoréductases de la famille de la protéine disulfide isomérase (PDI) sont bien caractérisées pour la formation, la réduction et l'isomérisation des ponts disulfures. Plusieurs homologues de PDI ont été caractérisés chez les mammifères, il s'agit de P5, ERp72, ERp57, PDIp et PDIr. Plusieurs homologues sont également retrouvés chez *S. cerevisiae*; il s'agit de Pdi1p, Eug1p, Mpd1p, Mpd2p et Eps1p (22). Ces enzymes sont généralement formées de quatre domaines structuraux a-b-b'-a' semblables aux thiorédoxines. Elles sont caractérisées par la présence, dans les domaines catalytiques a et a', d'un site actif comprenant le motif -CXXC- homologue à celui retrouvé chez l'oxydase périplasmique bactérienne DsbA et à la thiorédoxine cytoplasmique (24). D'autre part, PDI est une enzyme multifonctionnelle puisqu'elle est également une sous-unité essentielle pour les enzymes prolyl 4-hydroxylase et la protéine de transfert des triacylglycérols du micrososome (25).



**Figure 3 Formation de ponts disulfures**

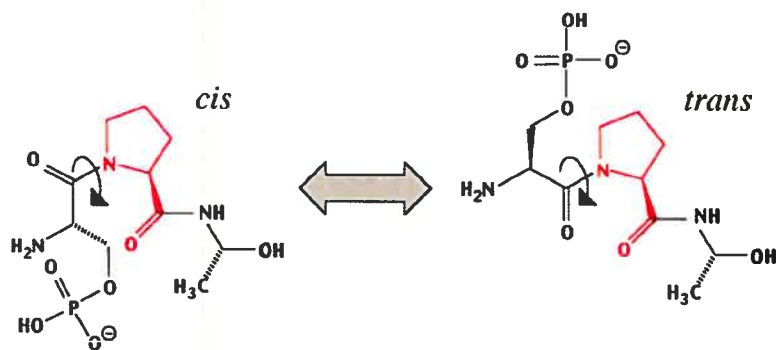
Les trois rôles des protéines disulfides isomérases sont l'oxydation des groupements thiol (-SH) des résidus cystéines des protéines pour former un pont disulfure (S-S), la réduction de ces liaisons S-S et l'isomérisation de ces liaisons. L'isomérisation consiste en la rupture de la liaison disulfure suivi de la formation d'un nouveau lien S-S au sein même de la chaîne polypeptidique ou encore entre deux chaînes. Adapté de (23)

Par ailleurs, pour qu'une oxydoréductase puisse oxyder un substrat ou former un pont disulfure, elle doit elle-même se trouver dans un état oxydé (S-S, voir Figure 3). Inversement, pour réduire son substrat ou briser un pont disulfure, elle doit se trouver dans un état réduit (S-H). L'isomérisation de ponts disulfures requiert tout d'abord le bris d'un pont S puis la formation spontanée d'un nouveau. L'enzyme doit donc être réduite pour attaquer le premier pont S. L'enzyme est oxydée par le bris du lien disulfide, ce qui laisse la dans un état actif pour la formation d'un nouveau pont S (23). Ainsi, chez *S. cerevisiae*, le potentiel rédox du RE est maintenu par la protéine Ero1p puisque cette protéine maintient PDI dans sa forme oxydée active (22). Chez *S. pombe*, deux homologues de Ero1p sont connus, soit SpEro1ap et SpEro1bp (26) et un homologue de PDI a récemment été caractérisé (27).

### 1.2.3 L'isomérisation des prolines

L'étape limitante du repliement des petites protéines est l'isomérisation *cis / trans* du lien peptidique en N-terminal des résidus prolines (Figure 4). Cette réaction cinétiquement non-favorable est catalysée par la famille des peptidyl-prolyl *cis/trans* isomérases (PPI). On retrouve des PPI dans tous les compartiments cellulaires où des protéines se replient, tant chez les organismes procaryotes que les eucaryotes (22).

Les PPIs peuvent être divisées en trois classes selon leur homologie de structure et leur affinité pour certaines drogues : les cyclophilines qui lient la Cyclosporine A (CsA), les protéines qui lient le FK506 (*FK506 binding proteins*; FKBP) et les PPIs semblables à la parvuline (*Parvulin-like PPI*) qui ne lient pas de drogue immunosuppressive. Les cyclophilines sont caractérisées par une structure en baril- $\beta$  à huit branches formant une poche hydrophobe liant la CsA. Les FKBP présentent une structure amphipatique de feuillet  $\beta$  à cinq branches qui s'enroule sur une petite hélice  $\alpha$ . Enfin, les membres de la famille de la parvuline possèdent un domaine PPI consistant en un demi baril- $\beta$  avec ses quatre feuillets  $\beta$  anti-parallèles entourés de quatre hélices  $\alpha$  (28).



**Figure 4 Isomérisation des prolines**

L'isomérisation *cis* / *trans* du lien peptidique (flèche) en amont de la proline (en rouge) dans le tri-peptide pSerine-Proline-Alanine. Les formes *cis* et *trans* du peptide existent en équilibre. Tiré de (28).

Le premier rôle des PPIs est la catalyse de l'isomérisation *cis* / *trans* du lien peptidique en N-terminal des résidus prolines. Un rôle de chaperone pour le repliement des protéines néosynthétisées a donc été associé à ces protéines. Par ailleurs, il a été démontré que certains membres de la famille de la parvuline jouent un rôle dans la progression du cycle cellulaire alors que d'autres PPI influencent la régulation de l'expression génique (28). Ainsi, chez *Xenopus laevis*, la PPI Pin1 permet le passage G<sub>2</sub>/M du cycle cellulaire en interagissant uniquement avec la forme phosphorylée des protéines Cdc25 et Plk1 (29). D'autre part, la CsA Cyp-40 peut inhiber la liaison à l'ADN de la protéine cMyb, modulant ainsi son activité de contrôle de la transcription (30).

### 1.3 Le repliement des protéines

L'action des chaperones moléculaires favorise le repliement des protéines en liant les zones hydrophobes exposées aux solvants, empêchant ainsi leur agrégation. La famille des Hsp70 (*Heat shock proteins*) comprend plusieurs chaperones moléculaires d'environ 70 kDa dont l'expression est induite par la chaleur et dont la liaison des substrats se fait de façon ATP-dépendante. Ces protéines se retrouvent, tant chez les procaryotes que les eucaryotes, dans tous les compartiments où les protéines se replient (22).



### 1.3.1 BiP

BiP a d'abord été identifiée à la fois comme étant une protéine se liant à la chaîne lourde des immunoglobulines, d'où son nom de *binding protein* (BiP) et comme une protéine régulée par le glucose (Grp78). C'est une chaperone luminale du RE de 77 kDa s'apparentant à la famille des Hsp70s. BiP est composée de deux domaines principaux, soit un domaine ATPase en N-terminal et un domaine liant les substrats en C-terminal. L'affinité du domaine liant les substrats dépend du nucléotide lié par le domaine ATPase; ainsi, la liaison de l'ATP entraîne une faible affinité mais une liaison rapide, alors que la liaison de l'ADP entraîne une haute affinité mais une liaison lente. En retour, la liaison d'un substrat en C-terminal augmente le taux d'hydrolyse de l'ATP par le domaine N-terminal. Ces interactions créent un cycle de liaison et de relâche des peptides qui continuera jusqu'à ce que le peptide soit replié et ne présente plus de motif d'interaction avec BiP (31).

BiP reconnaît une grande variété de peptides mal repliés; par conséquent, le mécanisme de reconnaissance de ses substrats se doit d'être général. Cette chaperone lie de façon transitoire les segments hydrophobes des protéines sécrétées et membranaires lors de leur translocation et ce faisant, les maintient dans un état compétent au repliement et à l'oligomérisation tout en empêchant leur agrégation intra et intermoléculaire (31, 32). Par ailleurs, BiP participe au contrôle de qualité des protéines en liant de façon stable les protéines mutantes, définitivement mal repliées ou encore partiellement assemblées, ce qui permet de les séquestrer dans le RE, donc hors du golgi et de la voie de sécrétion (31, 33).

Des études chez la levure ont montré que la chaperone BiP/Kar2p participe à l'entrée directionnelle des protéines dans le RE. Son mode d'action est expliqué par deux modèles distincts (31). Selon le modèle du cliquet brownien, le mouvement brownien permettrait la progression de la chaîne polypeptidique vers le lumen, puis BiP empêcherait le recul de la chaîne peptidique vers le cytosol par la liaison de cette chaîne tel un cliquet (14, 34). Selon le second modèle nommé propulsion (*power stroke*), BiP subirait un changement

conformationnel qui permettrait de tirer la chaîne peptidique vers le lumen. Ainsi BiP fournirait directement la force nécessaire au transport à travers le translocon via son activité ATPasique (35). BiP/Kar2p participe à la dislocation des protéines mal repliées vers le cytosol (36). Il a également été démontré que BiP maintient l'étanchéité de la membrane du RE en scellant le pore du translocon lorsqu'il est inutilisé (37, 38).

Finalement, la caractérisation de BiP chez la levure *S. pombe* a permis de constater que cette protéine possède un signal de rétention dans le RE -ADEL en C-terminal différent du -KDEL habituellement retrouvé chez les cellules mammifères et qu'elle est bien localisée dans le RE (39). L'expression du gène *bip1*<sup>+</sup> est essentielle à la viabilité de cette levure et son expression est augmentée suite à un traitement à la chaleur ou à un stress de repliement comme la tunicamycine (40).

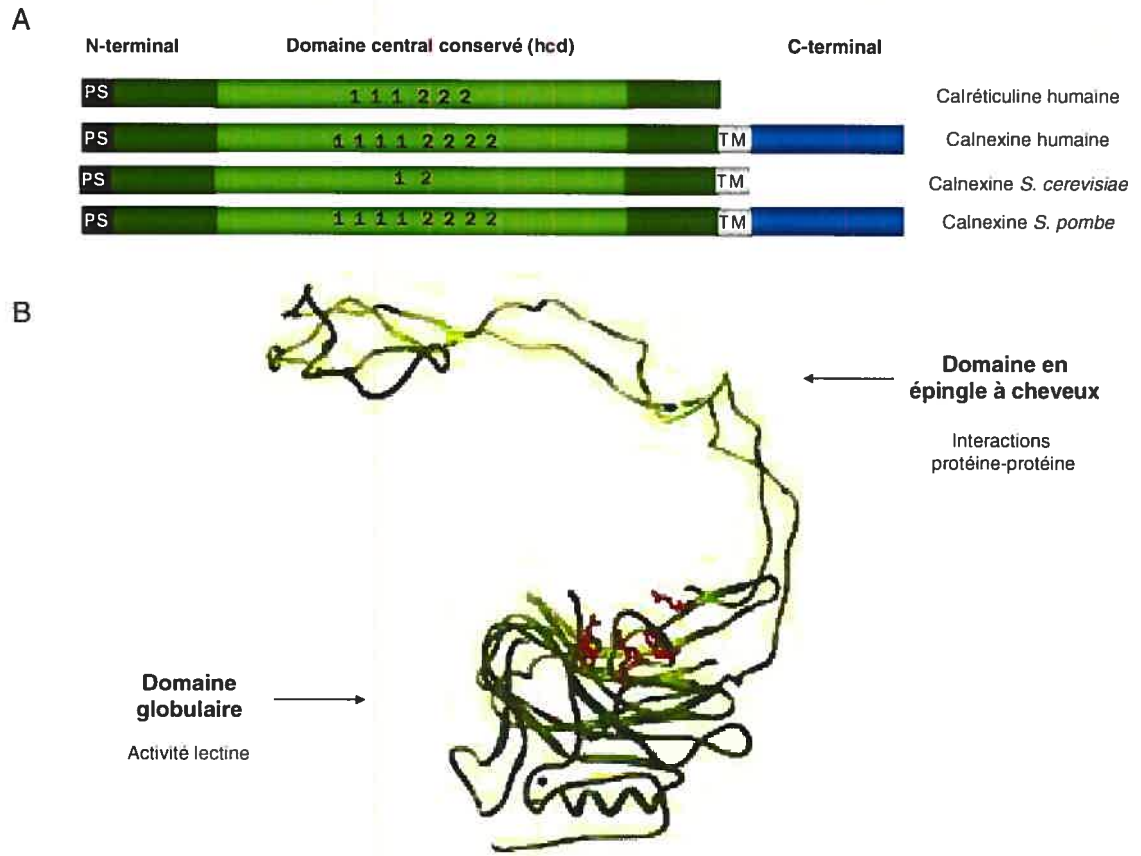
#### 1.4 La famille calnexine/calréticuline

La calnexine a d'abord été caractérisée comme une protéine transmembranaire de type I du RE, liant le calcium et ayant une forte homologie de séquence avec la calréticuline (41). La calréticuline est une protéine luminale soluble du réticulum endoplasmique qui lie le calcium et qui est impliquée dans le repliement des protéines et dans le contrôle de qualité des protéines sécrétées (42). La structure de ces protéines est maintenant connue, les apparentant à la famille des lectines de légumes. Ainsi, la calnexine a été clonée et caractérisée chez plusieurs espèces différentes : les mammifères tels que le chien, l'humain, la souris et le rat (43), le poisson-chat *Ictalurus punctatus* (44), la mouche *Drosophila melanogaster* (45), la plante *Arabidopsis thaliana* (46), les champignons tels que *Saccharomyces cerevisiae* (47), *Schizosaccharomyces pombe* (48, 49), *Yarrowia lipolytica* (50) et *Aspergillus niger* (51). La calréticuline est, quant à elle, présente chez les mammifères, mais n'a pas d'homologue chez les champignons. Le fait que la calnexine soit conservée à travers ces différentes espèces démontre l'importance de son rôle au sein de la cellule.

### 1.4.1 Structure de la calnexine

La partie luminale de la calnexine contient un domaine riche en proline (domaine P) dont la séquence est hautement conservée au travers des espèces, des champignons aux mammifères; ce domaine est nommé hcd (*highly conserved domain*) chez *S. pombe* (52). Ainsi, deux motifs répétés quatre fois en tandem sont particulièrement conservés : il s'agit des domaines 1 [I-DP(D/E)A-KPEDWD(D/E)] et 2 [G-W--P-IN-P-Y] (Figure 5A). Des études cristallographiques ont permis de résoudre la structure de la partie luminale soluble de la calnexine de chien (Figure 5B). Ainsi, la calnexine est formée d'un domaine globulaire formé par un assemblage des parties C- et N-terminales ainsi que d'un domaine en épingle à cheveux formé par le domaine hcd. Le domaine globulaire adopte la structure de sandwich  $\beta$  caractéristique des lectines de légumes et peut lier des résidus de sucres. Le domaine globulaire contient une structure en feuillet  $\beta$  concave et convexe. Le domaine lectine est situé sur la partie concave qui est partiellement masquée par le domaine en épingle à cheveux. La structure est stabilisée par un atome de calcium qui est lié, entre autres, par les résidus asparagines 118 et 437 situés dans le domaine globulaire (53). Des études antérieures avaient situé le domaine de liaison du calcium de la calnexine dans le domaine hcd. Le même domaine de la calréticuline exprimé seul peut lier le calcium (54).

Le domaine en épingle à cheveux est flexible. Il doit sa structure à l'appariement des quatre paires de motifs conservés qui forment des petits feuillets  $\beta$  antiparallèles. Le domaine en épingle à cheveux serait quant à lui impliqué dans les interactions protéine-protéine avec d'autres chaperones (53). De la même façon, des études par résonance magnétique nucléaire (RMN) démontrent que le domaine hcd de la calréticuline de rat forme une structure en épingle à cheveux stabilisée par trois feuillets  $\beta$  antiparallèles formés par les trois répétitions des motifs conservés (55). Finalement, contrairement à la calréticuline, la calnexine possède un domaine transmembranaire et un cytosolique de 91 résidus chez les mammifères qui peut être phosphorylé par la caséine kinase et peut interagir avec le ribosome (56).



**Figure 5 Structure de la calnexine**

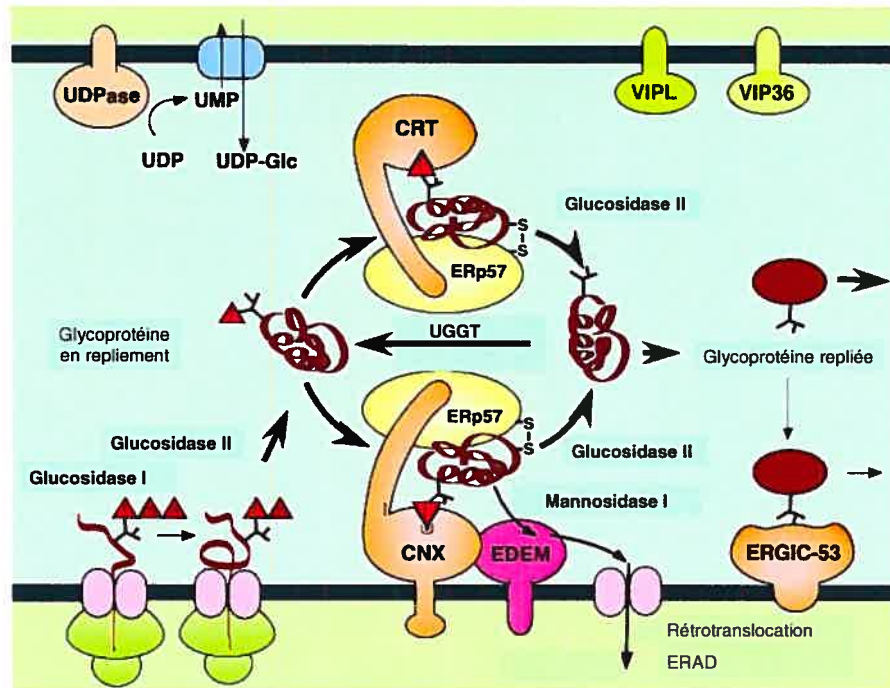
A) Représentation schématique des protéines calnexine et calréticuline. Le domaine luminal est représenté en vert. Le domaine hautement conservé (hcd, en vert pâle) contient trois ou quatre répétitions en tandem de deux motifs, soit le motif 1 [I-DP(D/E)A-KPEDWD(D/E)] et le motif 2 [G-W--P-IN-P-Y]. PS peptide signal, TM domaine transmembranaire. B) Structure de la partie luminale de la calnexine de chien. Le domaine globulaire possède l'activité lectine et les résidus qui sont en contact avec le glucose terminal sont colorés en rouge. Le point noir représente un atome de calcium lié. Le domaine en épingle à cheveux est formé de deux brins où l'appariement des motifs 1 et 2 stabilise la structure. Tiré de (53).

### 1.4.2 Rôle comme lectine

La calnexine a été caractérisée comme une lectine, c'est-à-dire une protéine qui a la propriété de lier les sucres. Des études *in vitro* ont mesuré l'activité lectine de la calnexine de chien (tronquée soluble) et de la calréticuline de lapin. Les deux protéines lient la structure Glc-Man-Man-Man (Figure 2B, résidu l-g-f-d, p.7) de l'oligosaccharide de base de façon calcium-dépendante, mais de façon ATP-indépendante (57). L'importance de l'activité lectine dans le repliement des protéines a été illustrée par le groupe de Héliénus dans le modèle du cycle de la calnexine (15).

Selon ce modèle, les oligosaccharides ajoutés aux glycoprotéines joueraient un rôle important dans le repliement de ces protéines ainsi que dans le contrôle de qualité de leur repliement. Rapidement après l'addition de l'oligosaccharide de base par l'OST sur un résidu arginine de la chaîne polypeptidique, le glucose terminal (Figure 2B, résidu n, p.7) de l'oligosaccharide est clivé par l'enzyme membranaire glucosidase I. Le second glucose (Figure 2B, résidu m, p.7) est ensuite enlevé par la glucosidase II, une enzyme hétérodimérique soluble du RE. Il en résulte donc un oligosaccharide monoglucosylé qui peut s'associer de façon glycan-dépendante avec les lectines calnexine et calréticuline. Ceci séquestre les protéines néosynthétisées ou en repliement et servent de chaperones moléculaires, prévenant ainsi l'agrégation et l'exportation des protéines mal repliées.

Dans plusieurs cas, elles préviennent aussi la dégradation précoce des intermédiaires de repliement et exposent les protéines à la foldase ERp57. Pour relâcher les chaînes liées à la calnexine, la glucosidase II clive le glucose restant. La glycoprotéine n'est désormais plus attachée à la lectine et est libre de quitter le RE. La sortie du RE peut être facilitée par la liaison avec les mannose-lectines ERGIC-53, VIP36 et VIPL (15).



**Figure 6** Le cycle de la calnexine

Suite à son entrée dans le RE, la glycoprotéine en repliement perd ses glucoses terminaux (triangles rouges) par le clivage successif des enzymes glucosidase I et II, puis est reconnue par les lectines calnexine (CNX) et calréticuline (CRT) qui facilitent son repliement. Suite à cette interaction, le dernier glucose terminal est clivé par la glucosidase II. Si la protéine n'est pas correctement repliée, elle est reglucosylée par l'UGGT et peut à nouveau être prise en charge par les chaperones CNX et CRT pour favoriser son repliement. Lorsque la protéine est bien repliée, elle peut sortir du RE. Adapté de (15)

Si toutefois la protéine est encore mal repliée, elle peut être reconnue par l'UDP-Glucose::glucosyltransférase (UGGT), une enzyme soluble du RE qui transfère un résidu de UDP-glucose sur l'oligosaccharide riche en mannose lié à une protéine. L'UGGT agit comme senseur des protéines mal repliées pour leur retour dans le cycle de la calnexine. Ainsi, si un polypeptide est reglucosylé, il peut alors interagir de nouveau avec la calnexine et avoir une seconde chance de se replier correctement. Les protéines demeurent dans le RE tant qu'elles ne sont pas bien repliées ou oligomérisées. Dans le cas où une protéine ne parvient pas à se replier correctement, elle est reconnue par la mannose-lectine EDEM (*ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein*), rétro-transloquée dans le cytosol et dégradée; c'est la dégradation associée au RE (ERAD) (15).

L'importance de la glycosylation a été montrée par l'utilisation de certaines drogues qui bloquent le cycle de la calnexine; par exemple les inhibiteurs des glucosidases I et II tels que la castanospermine et d'autres alcaloïdes indolizidine polyhydroxyl sont fréquemment utilisés (58). Il a été démontré qu'en inhibant une partie du cycle, on remarque souvent une augmentation de la vitesse de repliement associée à une diminution du contrôle de qualité des protéines. Dans certains cas, le contrôle de qualité est déficient et par conséquent, des protéines mal repliées sortent du RE. Dans d'autres cas, les glycoprotéines s'associent avec BiP, une autre chaperone du RE et sont repliées par celle-ci. Ainsi, certains groupes argumentent que le rôle central de la calnexine passe par sa fonction lectine, puisque la structure de la calnexine ne contient pas de région ou de peptide hydrophobe évident et par le fait que certains polypeptides comme la RNaseB et les IgGs ne parviennent à se replier correctement lorsque le clivage du glucose est inhibé (15).

### 1.4.3 Fonction chaperone classique

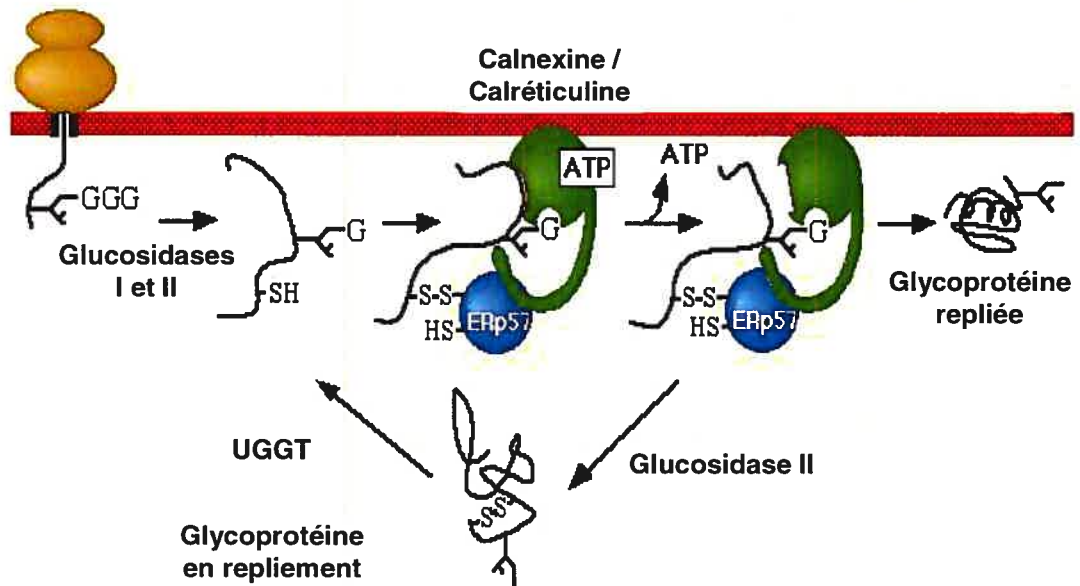
Une série d'observations a démontré que, contrairement au modèle précédent, la calnexine pouvait interagir avec des protéines de façon glycan indépendante. Par exemple, les protéines non-glycosylées comme le récepteur  $\epsilon$  des cellules-T, la protéine

transmembranaire PLP (*proteolipid protein*) et les agrégats de la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV-G) peuvent être liées par la calnexine (59-61). L'utilisation d'un inhibiteur de la N-glycosylation comme la tunicamicine n'empêche pas l'immunoprécipitation de la calnexine avec la thyroglobuline, tout comme avec les glycoprotéines-P et le complexe majeur d'histocompatibilité I et II dans lesquels les sites de glycosylation ont été mutés (62-65). De plus, la calnexine peut interagir avec la phosphatase acide indépendamment du clivage du glucose et de la reglucosylation chez la levure *S. pombe* (48). Il a donc été proposé que la calnexine serait une chaperone *bona fide*, qui peut interagir directement avec les polypeptides indépendamment de leur état de glycosylation. Ce second mode d'action a été décrit par le groupe de Williams (67).

Le modèle de Williams suggère qu'une glycoprotéine en repliement peut lier la calnexine de deux façons (Figure 7) (67). Ainsi, en plus de reconnaître le résidu glucose terminal avec son site lectine, la calnexine peut agir comme une chaperone en liant directement les segments hydrophobes exposés. Comme dans le modèle présenté par Héliénus, les glycoprotéines mal repliées sont reglucosylées par l'UGGT et peuvent ainsi entrer dans le cycle de repliement à nouveau. Cependant, dans ce modèle, l'UGGT et la calnexine agissent toutes deux comme des senseurs du repliement des protéines. Ce cycle de liaison / relâchement a trois fonctions : 1) la fonction chaperone prévient l'agrégation des polypeptides; 2) les sites lectine et chaperone retiennent les protéines en repliement dans le RE jusqu'à ce que ces dernières soient correctement repliées; 3) la calnexine et la calréticuline lient la PDI ERp57, permettant un rapprochement entre ERp57 et les protéines en repliement (66, 67).

La fonction chaperone de la calréticuline et de la calnexine a été examinée par le biais de protéines chimériques exprimées dans des cellules mammifères HepG2. Ainsi, lorsque la calréticuline est attachée à la membrane du ER, elle interagit de façon transitoire avec un ensemble de protéines sécrétées néosynthétisées d'une manière dépendante de la castanospermine (un inhibiteur de la glucosidase 1). Dans ces conditions, le spectre de substrat de la calréticuline est similaire à celui de la calnexine. La calréticuline luminale se lie préférentiellement à la transferrine et lie avec une plus faible affinité d'autres





**Figure 7 Le modèle de Williams**

Suite à l'entrée de la chaîne polypeptidique dans le RE, certains résidus Asn sont glycosylés par l'addition de l'oligosaccharide de base. Les deux glucoses terminaux sont clivés par l'action des glucosidases I et II pour révéler le troisième glucose qui est reconnu par les lectines. Dans leur état lié à l'ATP, la calnexine et la calréticuline peuvent lier les protéines en repliement via leur site lectine ou encore lier des segments hydrophobes exposés via leur site chaperone. La dissociation du polypeptide nécessite le clivage du glucose terminal par la glucosidase II ainsi qu'un changement de l'affinité de la chaperone pour le polypeptide possiblement régulé par le changement d'un état lié à l'ATP à un état lié à l'ADP ou dissocié. Si la protéine n'est toujours pas bien repliée, elle peut alors être reconnue et reglucosylée par l'UGGT, puis interagir de nouveau avec la calnexine / calréticuline. Adapté de (66).

substrats de la calnexine. La calréticuline est donc une chaperone qui a des caractéristiques communes avec la calnexine, mais possède un spectre de substrats différents étant donné sa localisation. Le ER possède donc deux types de chaperones différentes pour établir son contrôle de qualité (42). De la même façon, des protéines comme la VSV-G (68) et la chaîne  $\epsilon$  du récepteur à acétylcholine (69) interagissent spécifiquement avec la calnexine, alors que d'autres glycoprotéines comme le facteur de coagulation V lient préférentiellement la calréticuline (70).

Pour mieux comprendre le rôle de la calnexine, des souris déficientes dans son expression ont été générées, mais la plupart des souriceaux meurent très tôt après la naissance. Ceux qui survivent sont plus petits que leurs congénères et éprouvent des désordres moteurs importants (71). Par ailleurs, la délétion de la calréticuline entraîne des malformations cardiaques létales pour les embryons de souris (72). La caractérisation du rôle cellulaire de ces chaperones doit donc passer par l'utilisation de cellules en culture. Ainsi, la lignée cellulaire CEM-NK<sup>R</sup> déficiente dans l'expression de la calnexine sécrète le complexe d'histocompatibilité majeur de classe I (MHCI), un substrat de la calnexine, sans réduction du niveau d'expression à la membrane et sans réduction du niveau de transport à la membrane (73, 74). Ces cellules sans calnexine présentent un niveau élevé de BiP, mais la morphologie et l'homéostasie du calcium ne sont pas affectées par l'absence de calnexine (75). Une autre étude avec une lignée de MEF provenant de souris exprimant une forme lectine-déficiente de la calnexine appelée S-CN<sub>X</sub> montre que cette calnexine n'interagit pas avec ses substrats et que ce manque d'interaction n'augmente pas le niveau de BiP. De plus, les substrats cellulaires de la calnexine n'interagissent pas avec la calréticuline en l'absence de calnexine, à l'exception de quelques protéines virales comme les protéines E1 et p62 du virus de la forêt Semliki (SFV), VSV-G et la protéine hémagglutinine (HA) du virus de l'influenza suite à l'infection alors que la surexpression de ces protéines ne cause pas l'interaction (76). Pour sa part, l'absence de calréticuline dans une lignée cellulaire engendre une accélération du repliement des protéines accompagnée d'une baisse du contrôle de qualité. De plus, une diminution importante de l'association de la calnexine à ses substrats a été mesurée en l'absence de calréticuline, ce qui engendre une réponse au stress de protéines mal-repliées (UPR) (77).

#### 1.4.4 La calnexine chez la levure *S. cerevisiae*

Chez la levure *S. cerevisiae*, l'homologue de la calnexine *CNE1* encode une protéine membranaire du RE ayant une homologie de séquence aux calnexines et calréticulines de mammifères (24% identique, 31% semblable à la calnexine de mammifère). *Cne1p* est glycosylée. Il n'y a pas d'homologue de calréticuline chez la levure. Contrairement aux autres calnexines, *Cne1p* ne possède pas de domaine C-terminal cytosolique, ne contient qu'une seule copie du motif KPEDWD et ne lie pas le calcium (47). Des études *in vitro* avec une calnexine recombinante démontrent que *Cne1p* est une chaperone *bona fide* par son action anti-agrégation thermique de la citrate synthase et d'aide au repliement suite à la dénaturation thermique ou chimique de la citrate synthase (78). L'action chaperone de la calnexine a été caractérisée *in vitro* en démontrant qu'elle résulte de l'action conjointe du domaine P et de la fonction lectine. Ainsi, des mutants de délétion du domaine P, ou des mutants ponctuels E181A et E398A dans lesquels l'activité lectine est grandement diminuée, démontrent une diminution de l'activité prévention de l'agrégation de la citrate synthase ou des immunoglobulines du jaune d'œuf, ainsi qu'une diminution du repliement suite à une dénaturation thermique (79).

Contrairement aux cellules mammifères, les cellules de *S. cerevisiae*  $\Delta cne1$  sont viables et ne présentent aucun phénotype apparent sur la croissance ou le métabolisme (47). La délétion de *Cne1* n'a pas d'effets sur la composition de la paroi cellulaire en 1-6- $\beta$ -glucans, son principal constituant, alors que des mutations de BiP ou des glucosidases 1 et 2 diminue la proportion de ces sucres (80). Par ailleurs, d'autres études ont démontré que les cellules  $\Delta cne1$  présentent une déficience au niveau du contrôle de qualité des protéines par la sécrétion de mutants thermosensibles du récepteur de phéromones  $\alpha$  et par une augmentation de la sécrétion d'un mutant instable du lysozyme amyloïdogénique (47, 81). Une étude subséquente utilisant plusieurs mutants du lysozyme amyloïdogénique démontre qu'un mutant plus stable ne voit pas son niveau de sécrétion changer alors que le niveau de sécrétion du mutant instable augmente 3 fois. Finalement, la délétion de la calnexine n'a pas d'effets sur la sécrétion de protéines hétérologues non-glycosylées (82).

### 1.4.5 La calnexine chez la levure *S. pombe*

Chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, le gène codant pour l'homologue de la calnexine *cnx1*<sup>+</sup> est plus semblable aux autres calnexines que l'homologue de *S. cerevisiae* *CNE1* (39,4% d'identité avec le gène *cnx* humain, 39,9% avec le gène *cnx* canin, 35,2% avec le gène *CNE1* de *S. cerevisiae* et 38,4% avec le gène *crt* humain). Comme chez *S. cerevisiae*, il n'y a pas de calréticuline chez *S. pombe*. La protéine Cnx1p contient les motifs conservés 1 et 2 répétés quatre fois alors que Cne1p ne les contient qu'une fois. La calnexine/Cnx1p de *pombe* est une protéine transmembranaire de type I qui possède un large domaine N-terminal luminal et une courte queue cytosolique. Elle peut être glycosylée et elle lie également le calcium. Le gène *cnx1*<sup>+</sup> est essentiel à la viabilité de la levure *S. pombe*. L'expression de la protéine complète ou de son domaine soluble compense pour sa délétion. Par contre, la délétion ne peut être complétée par l'expression d'une calnexine de mammifère (48, 49).

Afin de délimiter le domaine essentiel de la calnexine de *S. pombe* pour la viabilité de cette levure, notre laboratoire a construit plusieurs mutants de délétion. De ces expériences, nous avons observé que la délétion du domaine hcd ne nuisait pas à la viabilité de la levure avec le mutant  $\Delta hcd\_cnx1$ . Il a été démontré que le plus petit mutant viable, nommé *mini\_cnx1*, ne contient que les 123 acides aminés du domaine C-terminal. Ces mutants de délétion peuvent former un complexe avec la chaperone BiP (52). Bien que ces deux mutants ne démontrent aucune activité chaperone *in vitro*, ils soutiennent la viabilité de *S. pombe* et permettent une sécrétion accrue de protéines hétérologues glycosylées actives sans modifier le niveau de sécrétion de protéines non-glycosylées (83).

### 1.4.6 Les partenaires de la calnexine

La calnexine n'agit pas toute seule. Il a été démontré que l'oxydoréductase ERp57, une protéine de la famille des disulfides isomérasés, agit spécifiquement sur les

glycoprotéines liées à la calnexine ou à la calréticuline et qu'il y a interaction avec les lectines tant en présence qu'en l'absence de substrat (84-86). Il a également été démontré que la présence de calcium module l'interaction entre la calréticuline et ERp57 (87). Des études plus poussées de génétique, de biochimie et de RMN ont permis de démontrer que, via le bout du domaine hcd, la calréticuline et la calnexine interagissent directement avec la partie C-terminale basique de ERp57 (88, 89), mais que la présence de plusieurs domaines de ERp57 (a-b-b') sont nécessaires à l'interaction (90). Le même phénomène a été décrit chez la levure *S. cerevisiae*, où l'homologue de yPDI Mpd1p interagit avec Cne1p, ce qui augmente l'activité réductrice de Mpd1p et réduit l'activité chaperone de Cne1p (91). Ceci implique que les chaperones formeraient des complexes *in vivo* et que ce phénomène influencerait leurs activités respectives.

Une étude portant sur des oocytes de *Xenopus* a montré que la calnexine / calréticuline inhibe les oscillations du taux de calcium (92, 93). La partie N-terminal de la calréticuline interagit également avec la séquence C-terminale de la pompe à calcium SERCA (sarco ER calcium ATPase) et le domaine P de la calréticuline entraînerait ERp57 à interagir avec la boucle L4 de SERCA. L'entrée de calcium dans le RE serait ainsi régulée par ERp57 qui module directement l'état redox de SERCA : lorsque la boucle luminale L4 est oxydée, l'activité de la pompe est inhibée, alors qu'elle est active lorsque la boucle est réduite (94).

Il a également été démontré chez la levure *Yarrowia lipolytica* que le domaine C-terminal luminal de la calnexine interagit avec la partie C-terminale de Sbh1p, l'homologue de la sous-unité du translocon Sec61 $\beta$  (50). L'équipe de Boisramé propose que le rôle de Sec61 $\beta$  serait de maintenir la calnexine à proximité du pore de translocation et que son absence entraînerait un découplage entre la translocation et le contrôle de qualité, ce qui diminuerait la rétention des polypeptides mal repliés dans le RE (50). Chez la levure *S. pombe*, Cnx1p forme un complexe avec la chaperone BiP (52).

## 1.5 Contrôle de qualité

Les chaperones moléculaires doivent, en plus d'aider au repliement des protéines, s'assurer que ces dernières adoptent une structure adéquate pour assurer leurs fonctions. Ainsi, un système de contrôle de qualité permet de sélectionner les protéines bien repliées pour leur exportation, les protéines mal repliées pour favoriser une nouvelle tentative de repliement et finalement, les protéines définitivement mal repliées pour leur dégradation dans le cytosol (95).

Le contrôle de qualité pour les glycoprotéines du RE est assuré entre autres via les sucres et le cycle de la calnexine décrit précédemment. Ainsi, l'enzyme UGGT est responsable de la reconnaissance des protéines mal repliées et permet, par son action, leur réentrée dans le cycle pour une seconde chance de repliement. Par contre, son mode d'action n'est pas très bien connu. Les critères de sélectivité doivent être partagés par la majorité des protéines mal repliées; il s'agit possiblement de la reconnaissance des régions ou de peptides hydrophobes à la surface des protéines, ou encore d'une trop grande dynamique de surface (15). De récentes études ont montré que l'exposition de résidus hydrophobes semble être le facteur déterminant de reconnaissance par l'UGGT. Les acides aminés situés près d'un N-glycan sont préférentiellement reconnus par l'UGGT par rapport à ceux qui sont plus éloignés, mais l'UGGT peut quand même modifier des glycans situés à 40Å de la zone mal repliée (96, 97). De plus, certaines structures sont mieux reconnues que d'autres par l'UGGT, par exemple une structure '*random coil*' n'est pas un substrat alors que dans une protéine partiellement repliée ayant une structure '*molten globule*', les régions hydrophobes exposées au solvant sont reconnues par cette enzyme (98). Enfin, l'UGGT chez *S. pombe* est essentielle à la survie de la levure en conditions de stress (99).

Une seconde enzyme joue un rôle important dans le contrôle de qualité du RE. Il s'agit de l' $\alpha$ -mannosidase, une enzyme qui clive les résidus mannose dans les branches B et C des oligosaccharides (Figure 2B, p.7) quand ils passent trop de temps dans le RE. Ceci diminue l'affinité de l'UGGT pour ces oligosaccharides en fonction directe du nombre de mannoses présents sur les autres chaînes (15). Chez la levure, l'enzyme luminale  $\alpha$ -1,2-

mannosidase clive le premier mannose de la branche B (Figure 2B, résidu i, p.7) pour donner l'oligosaccharide  $\text{Man}_8\text{GlcNac}_2$  isomère B (M8B). La dégradation des glycoprotéines mal repliées nécessite le passage par cet intermédiaire, mais le clivage du mannose i n'est pas suffisant pour induire la dégradation (100). L'oligosaccharide M8B est à son tour recruté par la mannose-lectine membranaire du RE Htm1p/Mnl1p (*homologous to mannosidase*) qui serait responsable du ciblage des protéines mal repliées pour la rétrotranslocation vers le cytosol (101). Chez les cellules de mammifères, la protéine EDEM joue le même rôle. Récemment, une très faible activité  $\alpha$ -mannosidase a été identifiée chez *S. pombe*, il s'agit de l'enzyme encodée par le gène *spmnl1*<sup>+</sup>. Vu la faible activité mannosidase, Mnl1p agirait plus comme une lectine liant les résidus mannoses et les ciblant vers le cytosol (102). Cependant, ce ne sont pas toutes les protéines du RE qui sont glycosylées, il doit donc y avoir d'autres systèmes de contrôle de qualité.

## 1.6 L'ERAD

La dernière étape du contrôle de qualité dans le RE est l'élimination des protéines définitivement mal repliées. Ce phénomène est appelé la dégradation associée au RE (ERAD). L'ERAD comporte trois étapes importantes. Il s'agit de la reconnaissance des glycoprotéines mal repliées, de la translocation au cytoplasme et enfin de la dégradation ubiquitine-dépendante des protéines par le protéasome (22).

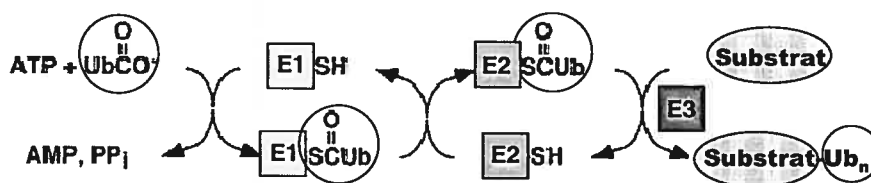
La reconnaissance des protéines mal repliées est faite par la machinerie de contrôle de la qualité telle que décrite dans la section précédente, ainsi que par les chaperones du RE calnexine, BiP et ERp57 plus particulièrement dans le cas des protéines non-glycosylées. La machinerie nécessaire à l'ERAD varie selon les substrats. Ainsi, chez la levure, la dégradation des protéines solubles  $\alpha$ F et CYP\* nécessitent toutes deux la participation de BiP, mais seulement la première cible nécessite l'intervention de Cne1p (22). Il a également été démontré en co-exprimant BiP et l'allèle ERAD-déficiente de BiP *kar2-1* que les protéines doivent être solubles pour passer à travers le translocon, mais que la

solubilité seule n'est pas suffisante pour l'exportation des protéines vers le cytosol. Par extension, BiP a un autre rôle à jouer dans l'ERAD. Par exemple, après une interaction prolongée avec un substrat, il pourrait transférer ce substrat mal replié à d'autres composantes de la machinerie (103).

Pour être dégradées, les protéines mal repliées doivent être solubles, dissociées de leur complexe oligomérique et libres de ponts disulfures. Les protéines mal repliées sont exportées au cytosol par un canal probablement formé par Sec61p et plusieurs protéines accessoires. Un essai avec des microsomes mammifères montre que lorsque le translocon est bloqué, la toxine du choléra n'est plus exportée du RE (104). Plus spécifiquement, la sous-unité  $\beta$  de Sec61 participerait à la dislocation des protéines mal repliées vers le cytosol (105, 106). Lors de leur import au RE, les protéines doivent être dépliées; cependant, quelques études proposent un modèle selon lequel des protéines seraient disloquées sous leur forme natives (107, 108). Finalement, il a été proposé qu'une protéine à quatre domaines transmembranaires nommée Derlin-1 (Der1p chez la levure) soit le canal d'export du RE (109, 110).

À leur entrée dans le cytosol, les protéines à dégrader doivent être identifiées. L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés qui forme de longues chaînes servant d'étiquette pour marquer une protéine condamnée à la dégradation. L'ubiquitination résulte en la formation d'un lien entre le C-terminal de l'ubiquitine et le groupement  $\epsilon$ -aminé d'un résidu lysine du substrat à dégrader. Ce processus requiert la participation de plusieurs partenaires, soit une enzyme activatrice de l'ubiquitine E1, une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine E2 et une ubiquitine-protéine ligase E3 (voir Figure 8). Il existe également des ubiquitine ligases E4 qui transfèrent une molécule d'ubiquitine sur le résidu Lys48 d'une autre ubiquitine pour former de longues chaînes de polyubiquitine (111).



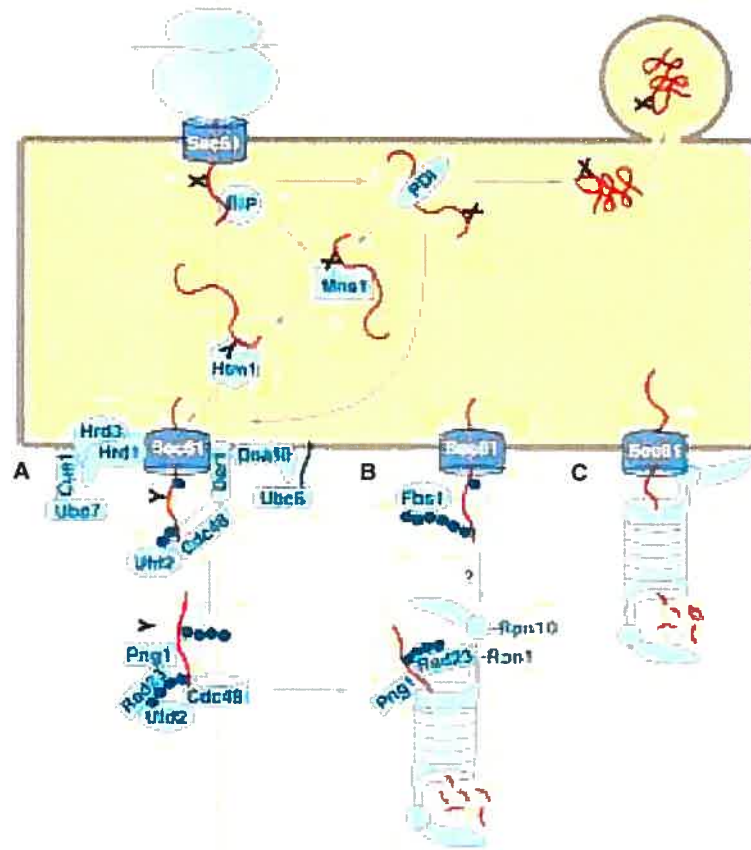


**Figure 8 L'ubiquitination**

Une enzyme activatrice (E1) forme un thiol-ester avec le groupement carboxyle de l'ubiquitine (Ub), ce qui active le C-terminal de l'ubiquitine pour une attaque nucléophile. Une enzyme de conjugaison (E2) transporte la molécule d'ubiquitine activée, puis une ubiquitine ligase (E3) transfère l'ubiquitine activée de E2 sur un résidu lysine du substrat (ou d'ubiquitine). Adapté de (111)

Le protéasome est un large complexe catalytique qui est le principal responsable de la dégradation et du renouvellement des protéines dans la cellule. Sa sous-unité principale catalytique 20S adopte une structure semblable à un baril composé de deux séries d'anneaux extérieurs ( $\alpha$ ) et intérieurs ( $\beta$ ) consistant chacun en un type différent de sous-unités. Les protéines dépliées pénètrent dans le baril et sont dégradées en petits peptides par des activités hydrolytiques trypsine-similaire, chymotrypsine-similaire ainsi que peptidylglutamyl-peptide hydrolase. La sous-unité régulatrice 19S contient des ATPases de la famille des AAA (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) qui lui confèrent une activité chaperone permettant de déplier les protéines avant leur entrée dans la chambre protéolytique. Elle peut également reconnaître les chaînes poly-ubiquitines pour les emmener à la dégradation. La sous-unité 19S forme un couvercle et ferme la 20S pour former le complexe 26S, qui est la structure permettant la dégradation ubiquitine-dépendante (112).

De façon plus spécifique chez la levure, suite à l'exportation vers le cytosol, trois scénarios menant à la dégradation des protéines sont possibles. Tout d'abord, les protéines à dégrader sont oligo-ubiquitinées durant l'exportation par les couples d'enzymes E2-E3 Ubc7-Hrd1p ou encore Ubc6-Doa10p (Figure 9A). Les substrats ubiquitinés sont alors reconnus par Cdc48p, puis ce complexe assiste leur polyubiquitination par l'ubiquitine ligase E4 Ufd2p.



**Figure 9 Dégradation associée au RE (ERAD)**

Suite à leur entrée dans le RE par le pore de translocation Sec61, les protéines contenant la séquence nécessaire sont N-glycosylées (X) et repliées à l'aide des chaperones luminales BiP et PDI. Un mauvais repliement entraîne un contact prolongé avec les chaperones, suivi du clivage d'un résidu mannose par Msn1p, puis la reconnaissance de l'oligosaccharide clivé (Y) par la lectine Htm1p qui cible la glycoprotéine pour la dégradation. La protéine mal repliée est exportée au cytosol par le canal Sec61p, puis est ubiquitinée (●) et dirigée vers le protéasome. Plus de détails sont donnés dans le texte. Tiré de (113).

Suite à la déglycosylation du substrat par Png1p, Rad23p lie la chaîne polyubiquitine alors qu'elle est associée à Ufd2p, puis permet la dégradation en liant Rpn1p, une protéine de la sous-unité régulatrice 19S du protéasome. Alternativement, la polyubiquitination peut être médiée par le complexe spécifique aux glycoprotéines SCF<sub>FBS1</sub>, résultant en une chaîne polyubiquitine plus longue qui peut être reconnue directement par Rpn10p de la sous-unité 19S du protéasome (Figure 9B). Enfin, le dernier scénario implique que la sous-unité 19S du protéasome lie directement le canal Sec61 et extrait les protéines mal repliées du RE (Figure 9C). Si la sous-unité 20S du protéasome s'associe avec le complexe 19S, l'exportation et la dégradation peuvent alors être couplées. Par contre, les sous-unités 19S pourraient fonctionner seules pour l'exportation comme Cdc48p (voir ci-dessus). Dans ce cas, quelques ou toutes les étapes décrites précédemment pourraient avoir lieu avant la protéolyse (113).

## 1.7 La réponse au stress de protéines mal repliées (UPR)

Des perturbations environnementales, tel un changement dans le potentiel redox, dans l'entreposage du calcium ou encore dans la glycosylation des protéines, compromettent la capacité de repliement des protéines dans le RE, avec comme résultat une augmentation de la quantité de protéines non repliées ou mal repliées dans le RE. Par conséquent, lorsque l'accumulation des protéines mal repliées dépasse la capacité de repliement, il y a un stress dans le RE. Pour remédier à cette situation, il existe une voie de réponse au stress nommée UPR qui peut envoyer un signal de survie ou encore d'apoptose (114).

### 1.7.1 Le UPR chez *S. cerevisiae*

Un élément de réponse aux protéines mal repliées (UPRE) a été identifié dans le promoteur du gène *KAR2* chez la levure et a été subséquemment utilisé dans des études génétiques pour caractériser cette voie (115). L'accumulation de protéines mal repliées dans le RE active la protéine sérine/thréonine kinase transmembranaire Ire1p qui dimérise et autophosphoryle en *trans* son domaine cytosolique (116). Ire1p activé possède une

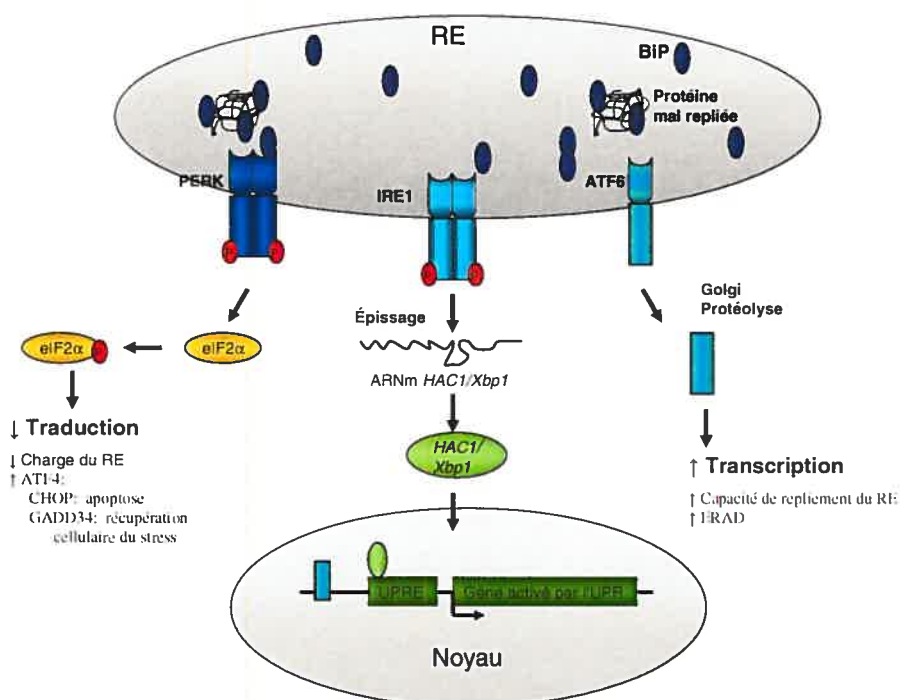
activité endoribonucléase et épisse un intron non conventionnel de l'ARN *HAC1* (117). Hac1p est un facteur de transcription  $\beta$ -zip qui lie les éléments UPRE en amont des gènes induits lors du UPR. Hac1p agit en recrutant le complexe histone déacétylase Gcn5p/Ada5p/Ada2p pour activer la transcription d'environ 381 gènes dont *KAR2*/BiP et PDI (114).

### 1.7.2 Le UPR chez les cellules mammifères

Chez les cellules mammifères, le système de réponse au UPR comporte trois acteurs principaux, soit IRE1, PERK et ATF6, qui régulent trois phases de la régulation à un niveau transcriptionnel et traductionnel. La protéine BiP agit comme un régulateur négatif de l'UPR. En conditions natives, BiP lie les protéines IRE1, PERK et ATF6. L'accumulation de protéines mal repliées titre BiP, libérant ainsi les effecteurs du UPR et signalant le stress (Figure 10).

La première réponse est d'atténuer la charge du RE en diminuant la synthèse protéique au niveau traductionnel. PERK est une protéine transmembranaire de type I. Suite à sa libération par BiP, cette protéine dimérise et s'active par autophosphorylation. Une fois activée, elle peut phosphoryler sélectivement via son domaine cytosolique le facteur d'initiation de la traduction  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ). Cette phosphorylation diminue l'affinité de eIF2 $\alpha$  pour le ribosome et diminue le taux de traduction (114). Étonnamment la phosphorylation de eIF2 $\alpha$  a pour effet d'augmenter la traduction de l'ARN *ATF4*, qui encode un facteur de transcription  $\beta$ -zip permettant la transcription de *CHOP*. Ce second facteur de transcription permet l'expression de gènes induits au stress et qui peuvent induire l'apoptose. Par ailleurs, ce mécanisme est régulé négativement par *GADD34* qui favorise la déphosphorylation de eIF2 $\alpha$  par la protéine phosphatase 1 (PP1c) (114, 118). La seconde étape est l'induction des gènes répondant au UPRE par les voies de IRE1 et ATF6. La voie de IRE1 est semblable à celle retrouvée chez la levure; ainsi, suite à la dissociation de BiP, IRE1 dimérise et s'autosphoryle, ce qui permet l'épissage spécifique de l'ARN *Xbp1*, un activateur de la transcription similaire à *HAC1* qui se lie

aux UPRE. De plus, la présence d'un UPRE dans le promoteur de *Xbp1* mène à la formation d'une boucle de rétroactivation pour soutenir l'activation du UPR. Finalement, ATF6 est une protéine transmembranaire de type II du RE ayant un domaine C-terminal luminal senseur du stress ainsi qu'un domaine N-terminal cytosolique contenant un domaine  $\beta$ -zip activateur de la transcription. Suite à l'activation du UPR, ATF6 n'est plus retenu dans le RE par BiP, elle transite alors par le golgi où elle est clivée pour libérer le fragment N-terminal qui migre au noyau et lie les éléments de stress du RE (114).



**Figure 10 La réponse au stress de repliement des protéines (UPR)**

Lorsqu'il y a accumulation de protéines mal repliées dans le RE, la chaperonne BiP est titrée par les protéines mal repliées et ainsi libère les effecteurs PERK, IRE1 et ATF6 qui signalent le stress dans la cellule. Premièrement, PERK provoque une diminution de la traduction pour diminuer la charge de protéines à replier dans le RE. Ensuite, il y a une augmentation spécifique de la transcription des gènes contenant un élément de réponse au UPR (UPRE) via les voies de IRE1 et de ATF6. Plus de détails sont donnés dans le texte. Adapté de (114)

## 1.8 Maladies liées au repliement des protéines

Le repliement des protéines est un processus clé pour la cellule, puisque les protéines doivent adopter leur conformation correcte afin d'acquérir et d'exercer leurs fonctions. L'accumulation de protéines qui ne parviennent pas à l'état actif ou encore de protéines mal repliées entraîne l'apparition de maladies de repliement. Des altérations dans le repliement des protéines du RE causent de nombreuses maladies héréditaires telles que la fibrose kystique, l'emphysème juvénile, l'hypercholestérolémie familiale et certains types de problèmes de coagulation (119-121). Par exemple, la fibrose kystique est une maladie héréditaire qui est causée par différentes mutations qui résultent en une synthèse anormale de la protéine CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Cette protéine agit normalement comme un canal à chlore dans la membrane plasmique. CFTR est une protéine glycosylée composée de plusieurs domaines transmembranaires et de deux domaines intra et extracellulaires. Lors de son passage dans le RE, CFTR interagit avec la chaperone moléculaire calnexine pour atteindre sa conformation correcte. Les cas de fibrose kystique sont caractérisés par une quasi absence de canal à chlore à la membrane plasmique. La mutation la plus fréquente est la délétion d'une phénylalanine dans la protéine CFTR à la position 508 ( $\Delta F508$ ), ce qui empêche le repliement correct de la molécule, qui est séquestrée par la calnexine puis dégradée, diminuant ainsi la quantité de canaux fonctionnels à la membrane cellulaire (119).

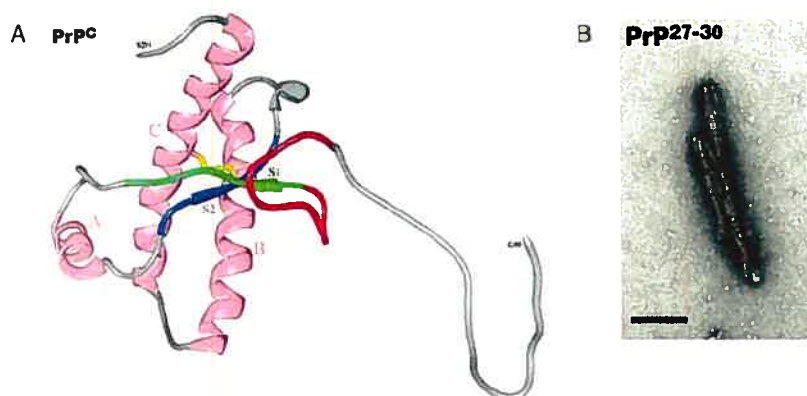
Par ailleurs, le repliement pathologique des protéines ne provient pas seulement de l'incapacité à obtenir une conformation stable et active. Dans certains cas, une structure extrêmement stable est obtenue et cette forme est toxique pour la cellule. Ainsi, la maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative affectant la mémoire et la cognition. Elle est caractérisée par l'accumulation, dans le cerveau, d'enchevêtrements neurofibrillaires contenant la protéine Tau et de plaques formées de fibres de la protéine amyloïde  $\beta$  ( $A\beta$ ) polymérisée. Ces agrégats de protéines causent de l'inflammation dans les tissus et compromettent les fonctions synaptiques des neurones (122). La maladie de Parkinson est causée par l'accumulation dans les neurones dopaminergiques et noradrénergiques de fibres similaires, dites amyloïdes, formées par la protéine  $\alpha$ -

synucléine, alors qu'on retrouve des agrégats de huntingtine dans le cas de la maladie de Huntington (120, 122).

### 1.8.1 La protéine prion (PrP)

Des conformations protéiques altérées peuvent également être infectieuses. C'est le cas des maladies à prions telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob humaine (CJD), la tremblante du mouton et l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB) (123, 124). Des pathologies similaires ont été identifiées chez plusieurs autres mammifères comme le chat, le chevreuil et le caribou (125). Ces maladies neurodégénératives résultent en des désordres moteurs et cognitifs progressifs menant inévitablement à la mort. Elles sont caractérisées par l'accumulation de lésions protéiques ou plaques dans le cerveau. Bien que ces maladies puissent être héritée ou se déclarer spontanément, elles sont également infectieuses. Un bon exemple de cette infectiosité est le kuru, une maladie neurodégénérative transmise par le cannibalisme rituel pratiqué dans une tribu de Nouvelle-Guinée (125). En 1996, une nouvelle variante de la maladie CJD (vCJD) chez de jeunes sujets a été identifiée au Royaume-Uni. Il s'agirait d'une transmission infectieuse de l'ESB, plus communément appelé vache folle, des bovins aux humains par la consommation de viande contaminée (124).

Ces pathologies sont caractérisées par le changement de conformation transmissible de la protéine PrP de sa structure native 'cellulaire' (PrP<sup>C</sup>) principalement formée d'hélices  $\alpha$ , en sa structure prionique '*scrapie*' (PrP<sup>Sc</sup>) riche en feuillets  $\beta$  (126). Ce conformère prionique facilite ce changement de conformation et par le fait même propage la conformation prionique aux autres molécules PrP dans l'état natif (126). Les deux conformations de PrP confèrent à la protéine des caractéristiques bien différentes. Alors que le conformère PrP<sup>C</sup> est monomérique et soluble, le conformère PrP<sup>Sc</sup> tend à former des agrégats insolubles qui sont résistants à l'action des protéases (125).



**Figure 11 PrP<sup>C</sup> et Prp<sup>Sc</sup> adoptent des conformations différentes**

A) La structure résolue par RMN des résidus 90-231 de la protéine PrP<sup>C</sup> en solution du hamster syrien est principalement composée d'hélices  $\alpha$  avec un domaine N-terminal non-structuré. B) Microscopie électronique en coloration négative de protéines PrP<sup>27-30</sup> (souche 237) de hamster syrien. Ces agrégats de haut poids moléculaire résistants aux protéases sont formés principalement de feuillets  $\beta$ . La barre représente 100 nm. Tiré de (125).

Le gène codant pour la protéine PrP (*PRNP*) est présent en une seule copie dans le génome humain et présente des polymorphismes. Par exemple, l'homozygotie pour une méthionine au codon 129, qui peut coder pour une méthionine ou une valine, est un facteur de risque pour le développement d'une maladie à prion (124). La protéine humaine est constituée de 253 acides aminés, est glycosylée et possède une ancre glycosylphosphatidyinositol (GPI) qui lui permet de s'ancrer à la membrane plasmique. La protéine mature est localisée à la surface cellulaire ou dans les endosomes précoces et tardifs. La protéine prion est principalement exprimée dans les neurones et dans le système nerveux central. On retrouve également cette protéine dans le système lymphoréticulaire, ainsi que dans les muscles squelettiques et cardiaques (124).

Le rôle de la PrP n'est pas encore bien défini. Les souris transgéniques déficientes dans l'expression de PrP sont résistantes à l'infection par PrP, mais n'ont pas de phénotypes majeurs permettant d'identifier de rôle clair pour la protéine prion. Les ligands principaux de PrP<sup>C</sup> sont des protéines du choc thermique et des récepteurs membranaires, elle



pourrait donc agir dans le repliement des protéines ou dans la transduction du signal extra-cellulaire. La PrP peut lier le cuivre; elle pourrait donc agir comme superoxyde dismutase. Des similarités entre PrP et des protéases du peptide signal permettent d'extrapoler un rôle de protéase pour PrP, alors que d'autres études proposent un rôle dans la transmission synaptique ou un rôle anti-apoptotique (124, 127).

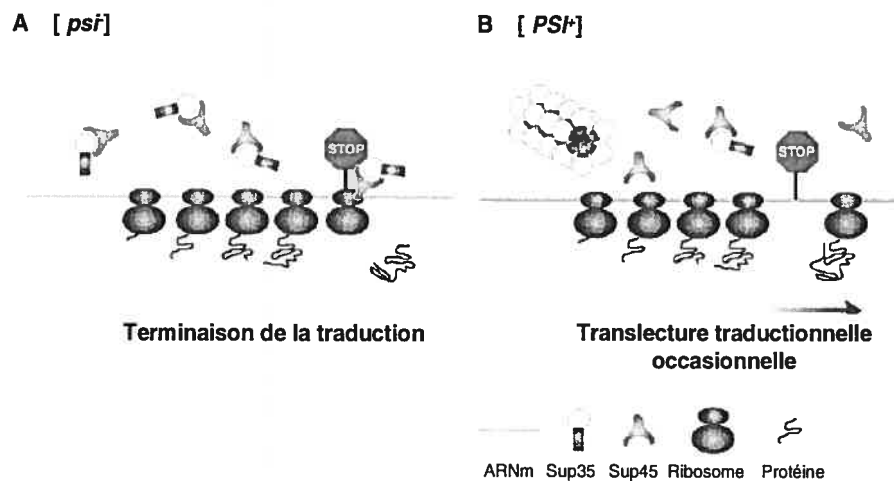
### 1.8.2 Des prions chez la levure

De façon générale, un prion est donc une protéine qui peut changer de sa conformation endogène à une conformation alternative. Cette deuxième conformation donne à la protéine une fonction altérée et est transmissible aux autres protéines identiques. Des éléments ressemblant aux prions ont été décrits chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le champignon *Podospora anserina*, où ils agissent comme éléments génétiques non chromosomaux conférant des traits épigénétiques. Ainsi, à cause de ces caractéristiques, les éléments ressemblants aux prions peuvent propager de nouveaux traits et constituent un mode de transmission des traits basé sur les protéines. Les phénotypes engendrés sont transmis sans entraîner de modification à la séquence d'acides nucléiques. Ces protéines prions impliquent dans certains cas des protéines qui participent à des processus cellulaires connus et ne possèdent pas d'homologie avec la protéine prion humaine PrP. Parmi ces éléments ressemblants aux prions, les mieux caractérisés sont [*PSI*<sup>+</sup>], [*URE3*], [*RNQ*<sup>+</sup>] et [*HET-s*] (125, 128-130).

### 1.8.3 [*PSI*<sup>+</sup>]

La protéine Sup35 fait partie du facteur de terminaison de la traduction chez la levure *S. cerevisiae*. Le rôle de cette protéine est de reconnaître les codons d'arrêt présents sur l'ARN messager, de s'assurer que la traduction s'arrête à cet endroit, puis que la protéine terminée soit libérée du ribosome.

La protéine Sup35 est composée de deux domaines principaux, soit un domaine de terminaison de la traduction (Sup35C; Figure 12, représenté par un cercle) et un domaine déterminant le prion (PrD; Figure 12, représenté par un rectangle). La protéine Sup35 peut adopter une conformation alternative qui tend à s'agréger. Comme les protéines agrégées ne peuvent accomplir leur rôle dans la terminaison de la traduction et que l'agrégation titre une partie des molécules de Sup35, certains codons d'arrêts ne sont pas reconnus et ainsi la traduction continue passé ce codon d'arrêt. Ce phénomène appelé translecture traductionnelle engendre la production de protéines élongées en C-terminal. La présence du prion [*PSI*<sup>+</sup>] peut être bénéfique pour la cellule, en ce sens qu'il permet de produire des protéines actives malgré la présence d'une mutation non-sens dans son gène codant (128).



**Figure 12** Les effets de [*PSI*<sup>+</sup>] sur Sup35 et la terminaison de la traduction

A) Le complexe de Sup35 et Sup45 lie le ribosome au codon d'arrêt (Stop) et entraîne la terminaison de la traduction. B) Dans la souche [*PSI*<sup>+</sup>], la plupart des molécules de Sup35 adoptent la structure prion et s'assemblent en agrégats. Ce changement de conformation diminue l'habileté de Sup35 à participer dans la terminaison de la traduction, ce qui produit parfois des translectures traductionnelles qui résultent en une élongation de la protéine en C-terminal passé le codon d'arrêt. Adapté de (128).

### 1.8.4 [URE3]

Le prion [URE3] affecte la répression catabolique de l'azote chez la levure *S. cerevisiae* (131). Une levure croissant sur un milieu riche en source d'azote comme de l'ammonium ou la glutamine réprime la production des protéines de la machinerie nécessaire à métaboliser des sources pauvres d'azote comme l'uréidosuccinate. Cette machinerie, comme par exemple le transporteur d'allantoate / uréiosuccinate Dal5, est produite en l'absence de sources riches d'azote, mais elle est également présente chez certains mutants récessifs nommés *ure* qui utilisent des sources pauvres d'azote en présence de sources riches. La protéine Ure2 régule le catabolisme de l'azote en liant et en interférant avec l'activateur transcriptionnel Gln3 qui à son tour induit l'expression de Dal5 (128). Dans les années 70, l'équipe de Lacroûte a observé la 'mutation' [URE3] qui engendre un phénotype semblable à une mutation du gène *ure2*. Ce phénomène est dominant, transmis à la progéniture de façon non-mendélienne et peut se transmettre par cytoduction (132).

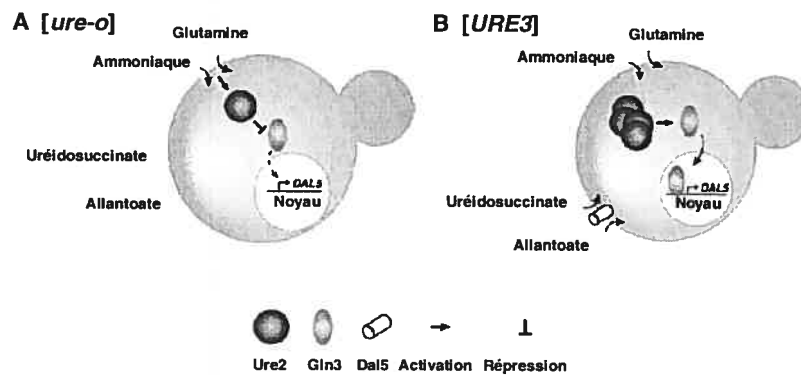


Figure 13 Effets de [URE3] sur Ure2 et l'import d'uréidosuccinate

A) Dans une souche non prion [*ure-o*], il y a répression de l'import de sources pauvres d'azote comme l'uréidosuccinate en présence de sources riches d'azote comme l'ammoniaque et la glutamine. La présence de sources riches d'azote est médiée par la protéine Ure2 qui bloque l'action de l'activateur transcriptionnel Gln3 qui régule la production du transporteur d'allantoate Dal5. Celui-ci n'est donc pas produit; c'est la répression catabolique de l'azote. B) Dans la souche [URE3], le changement de conformation de la protéine Ure2 en sa forme prion interfère avec sa capacité à réprimer l'action de Gln3, permet l'expression de Dal5 et par extension l'entrée d'uréidosuccinate en présence de bonnes sources d'azote. Adapté de (128).

Le phénomène a été élucidé quelques vingt ans plus tard par Wickner, qui proposa que le changement de conformation de la protéine Ure2 en sa forme prionique favorise son agrégation. La protéine agrégée ne séquestre plus Gln3 qui peut alors éliminer la répression catabolique de l'azote. Ceci explique pourquoi les cellules [*URE3*] utilisent l'urédidosuccinate dans un milieu riche en azote (131). La protéine Ure2 est composée de deux domaines; en C-terminal se trouve la fonction de facteur de répression alors que le domaine déterminant le prion se trouve en N-terminal.

### 1.8.5 [*RNQ*<sup>+</sup>]

L'analyse des domaines prions de Sup35 et de Ure2 a démontré que ces régions sont particulièrement riches en résidus asparagine (N) et glutamine (Q). Le séquençage complet du génome de *S. cerevisiae* a permis de faire la découverte d'un autre prion en faisant une recherche informatique des séquences semblables aux domaines prions déjà caractérisés. Le criblage a identifié une protéine potentiellement prion contenant un domaine riche en N et Q, elle a donc été nommée [*RNQ*<sup>+</sup>]. L'analyse exhaustive de la protéine n'a pas encore permis de lui attribuer un rôle biologique, mais des analyses à l'aide de chimère du domaine prion de RNQ avec le domaine actif de Sup35 a permis de confirmer que Rnq1 est bien un prion en rétablissant complètement le phénotype de [*PSI*<sup>+</sup>] (133).

### 1.8.6 [*HET-s*]

Chez le champignon *Podospora anserina*, le prion [*HET-s*] médie l'incompatibilité de l'hétérocaryon. Les micelles de ce champignon peuvent fusionner, mélangeant ainsi leur cytoplasme et permettant parfois l'échange de noyaux. Cependant, pour prévenir le mélange incompatible de certaines souches, il faut que les neuf loci *het* soient homoalléliques sans quoi une réaction lytique cause la mort cellulaire. Il y a deux allèles au locus *het-s*, soit Het-s et Het-S, qui produisent respectivement les protéines HET-s et HET-S qui sont incompatibles entre elles. Par contre, la protéine HET-s peut adopter

deux conformations, soit la forme prion HET-s ou la forme native HET-s\*, qui est compatible avec l'une ou l'autre des formes HET-S et HET-s (134).

### 1.8.7 Caractéristiques des prions de levure

Les prions de levure partagent des caractéristiques communes. Ils sont dominants et transmis à la progéniture de façon non-mendélienne par un élément cytoplasmique de nature protéique. Le taux d'apparition spontanée est bas; pour  $[PSI^+]$  et  $[URE3]$  il varie entre  $1 \times 10^{-5}$  et  $1 \times 10^{-7}$ , alors que celui de  $[HET-s]$  est inférieur à  $1 \times 10^{-7}$ . De façon générale, la surexpression du gène codant pour la protéine prion augmente son taux d'apparition sur plusieurs ordres de grandeur (128).

Les domaines prions de  $[PSI^+]$ ,  $[URE3]$  et  $[RNQ^+]$  sont riches en résidus asparagine et glutamine et sont interchangeables entre ces prions (128). Dans le cas des prions  $[URE3]$  et  $[PSI^+]$ , la composition en acides aminés et la longueur de ces domaines sont plus importantes que la séquence pour la fonction du domaine prion. En effet, la séquence mélangée de ces domaines prions permet quand même la formation de fibres amyloïdes (129, 135). La propagation des prions est caractérisée *in vitro* par l'apparition spontanée de fibres amyloïdes après un temps de latence. L'inoculation de fibres préformées permet de réduire considérablement ce temps de latence. Les fibres formées par les prions sont très résistantes; elles résistent à de hautes concentrations de protéinase K, aux rayons UV et à la chaleur. Des études de microscopie ont permis de voir l'agrégation des prions  $[PSI^+]$ ,  $[URE3]$  et  $[RNQ^+]$  *in vivo*. La fusion des domaines prions avec la protéine fluorescente verte (GFP) permet d'observer en microscopie des foci dans les souches prioniques alors que la fluorescence est distribuée uniformément dans les souches non-prioniques (128). Contrairement aux autres prions de levure,  $[HET-s]$  ne contient pas de région riche en asparagine et glutamine, mais l'utilisation de protéines de fusion entre HET-s et HET-S a permis de déterminer que le domaine prion est situé entre les résidus 218-289 à l'extrémité C-terminale de la protéine (136). Le domaine C-terminal

normalement non-structuré peut former en présence du prion de longues fibres *in vivo* tel que démontré par l'utilisation de fusions HET-s (157-289)/GFP (137).

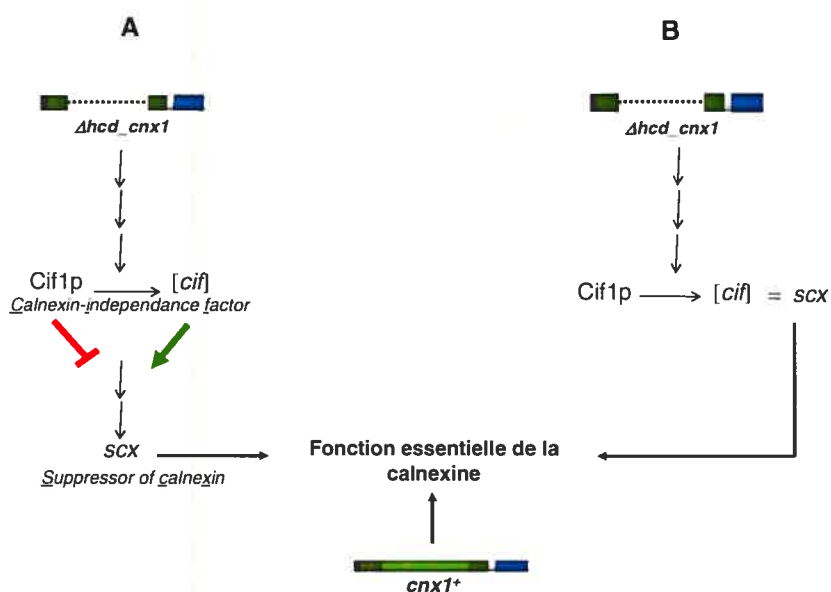
La preuve ultime de l'hypothèse du prion est la transmission de traits épigénétiques uniquement par des protéines. Cette démonstration a été faite pour les prions [*PSI*<sup>+</sup>] et [*HET-s*]. Pour ce faire, des protéines recombinantes Sup35 et Het-s ont été agrégées *in vitro* puis transformées dans des cellules naïves. Dans les deux cas, l'apparition *de novo* des phénotypes prion [*PSI*<sup>+</sup>] et [*HET-s*] a été observée, démontrant la transmission de traits par des protéines (138, 139).

### 1.9 Un prion chez *S. pombe*

La calnexine est essentielle à la viabilité de la levure *S. pombe* (48, 49). Cependant, une étude récente de notre laboratoire avec le mutant *Δhcd\_cnx1* a permis d'identifier un phénomène nouveau qui permet la viabilité de cette levure en l'absence de calnexine. Ce phénomène qui a été nommé calnexine indépendant (Cin) peut être induit spécifiquement par *Δhcd\_cnx1*, mais non pas par la forme sauvage *cnx1*<sup>+</sup> ni par la plus petite protéine mutante encodée par *mini\_cnx1*. L'état Cin est dominant tant chez les cellules haploïdes que diploïdes, est transmis à la descendance méiotique d'une façon non mendélienne et est transmis par la transformation d'extraits cellulaires dépourvus d'acides nucléiques. Ces caractéristiques ressemblent à celles des prions de levure connus, suggérant que l'état Cin serait médié par un élément génétique protéique extrachromosomal comme un tel (140).

Deux modèles peuvent expliquer l'état Cin. Le premier implique la protéine prion Cif1p (facteur d'indépendance à la calnexine) et le suppresseur de la fonction essentielle de la calnexine *scx*. Ainsi, dans sa conformation cellulaire normale, Cif1p bloquerait la fonction *scx*, expliquant que la calnexine soit essentielle. Par contre, suite au changement de conformation de Cif1p en sa forme prion [*cif*], il n'y aurait plus de répression sur la fonction de *scx* et donc, il remplirait la fonction essentielle de la calnexine. Le second modèle implique que le changement conformationnel à la forme prion est un gain de

fonction et que *[cif]* remplace directement la fonction essentielle de la calnexine (140). Un tel gain de fonction a déjà été rapporté dans le cas de l'agrégation de la protéine CPEB chez le mollusque *Aplysia californica* (141).



**Figure 14 Modèles explicatifs de l'état Cin**

A) Le mutant  $\Delta hcd\_cnx1$  cause une cascade d'événements entraînant le changement de conformation de la protéine Cif1p en sa forme prionique [cif]. Ceci permet l'expression de la fonction de *scx*, un gène hypothétique qui remplace la fonction essentielle de la calnexine. B) Suite au changement conformationnel, la protéine prion [cif] est *scx* et exerce directement la fonction essentielle de la calnexine. Adapté de (140)

### 1.10 Le projet de recherche

Notre laboratoire a démontré que la calnexine est essentielle chez *S. pombe*, mais que dans certaines conditions, une voie alternative induite, entre autres, par le mutant *Δhcd\_cnx1* permettrait la viabilité en l'absence de calnexine. Comme ce phénomène est totalement inconnu, il est tout d'abord intéressant de caractériser la souche Cin. Pour ce faire, des études phénotypiques sont entreprises dans le but de comparer les cellules Cin avec les mutants caractérisés *Δhcd\_cnx1* et *mini\_cnx1* ainsi qu'avec une souche sauvage. Puisque l'état Cin est dominant à la réintroduction d'une copie sauvage de la calnexine, une souche Cin contenant une copie plasmidique de la calnexine, nommée Cin + *pcnx1*<sup>+</sup>, a également été caractérisée (140).

La souche Cin a une forme aberrante, petite et ronde comparativement à la souche sauvage qui est allongée (140). Cette morphologie aberrante a suggéré un problème au niveau de la paroi cellulaire. Pour avoir plus d'indications sur cette faiblesse de la paroi, différents tests de résistance au détergent SDS et à des agents chimiques inhibant la synthèse de la paroi comme le calcofluor et l'hygromycine B ont été effectués (142, 143). La résistance à des stress osmotiques, thermiques et de repliement a également été mesurée afin de mieux caractériser la souche Cin (142, 144). Étant donné que les mutants *Δhcd\_cnx1* et *mini\_cnx1* produisent des protéines actives malgré le fait que ces mutants ne possèdent pas de fonction chaperone, il était intéressant de mesurer la capacité de la souche Cin à sécréter des protéines actives. Pour ce faire, les protéines modèles *human serum albumin* (HSA) et cellulase de *Aspergillus aculaetus* ont été choisies puisque la sécrétion de ces deux protéines non-glycosylée et glycosylée avait déjà été étudiée dans les souches mutantes de la calnexine (83). Finalement, la viabilité, ou plutôt la mort cellulaire de type apoptotique, de la souche Cin a été comparée à celle des autres souches par des essais de marquage *in situ* des caspases activées. Les levures peuvent entrer dans un processus de mort cellulaire ressemblant à l'apoptose caractérisée chez les cellules mammifères suite à une situation de stress extrême, ou encore suite au vieillissement de la



culture en phase stationnaire. De la même façon, les protéines impliquées dans ce processus sont similaires à celles caractérisées chez les cellules mammifères (145-147).

En second lieu, il était intéressant de commencer à caractériser la voie par laquelle l'état Cin est induit. En se basant sur la prémisse que la surexpression de n'importe quelle composante d'une voie permet de créer une déviation dans cette voie et l'activer (148), un criblage de surexpression de banques d'ADN complémentaire a été effectué afin d'identifier des gènes induisant l'état Cin. Ainsi, en utilisant une souche ayant une délétion génomique de la calnexine compensée par un plasmide portant la calnexine, le criblage recherche les transformants pouvant perdre le plasmide calnexine. Étonnamment, le criblage a identifié deux gènes codant pour les enzymes glycolytiques phosphoglycérate kinase et pyruvate kinase. Le phénotype est bien lié à ces gènes puisqu'une nouvelle transformation de ces plasmides entraîne aussi l'apparition de l'état Cin. Les résultats préliminaires de la caractérisation de cette voie sont présentés ici.

Finalement, *S. pombe* est un bon organisme modèle pour des études génétiques en raison de son court temps de génération et les manipulations génétiques aisées. Le génome de cette levure a complètement été séquencé (149). Les phénomènes étudiés chez cette levure peuvent expliquer les phénomènes semblables retrouvés chez les eucaryotes supérieurs.

## **2. Caractérisation phénotypique des cellules Cin**

## **2.1 The calnexin-independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe***

**Cynthia Turcotte, Antoine Roux, Pascale B. Beauregard, Renée Guérin,  
Patrick Sénéchal, Fadi Hajjar, and Luis A. Rokeach\***

**Running title: Partial rescue of calnexin knock-out by the Cin state**

**Keywords:** Protein folding, Molecular Chaperone, Prion, Protein Secretion, Fission Yeast, Caspases

## **2.2 Contribution des auteurs**

J'ai effectué les expériences de croissance à température élevée de la Figure 1b, de résistance au SDS de la Figure 2b et la quantification de BiP de la Figure 3c. Les expériences de résistance à la chaleur de la Figure 3a ont été faites avec Patrick Sénéchal, les expériences de sensibilité la paroi cellulaire de la Figure 2a et de résistance aux stress de la Figure 3b avec Renée Guérin. Pascale B. Beauregard a effectué les essais de sécrétion avec la protéine hétérologue HSA et j'ai effectué les essais de sécrétion avec la protéine cellulase de la Figure 4a. J'ai également fait les essais d'efficacité du contrôle de qualité et la quantification de la calnexine de la Figure 4b-c. Antoine Roux a fait la microscopie de la Figure 1a et la quantification des caspases activées à la Figure 5a-b. J'ai aussi rédigé la première version du manuscrit qui a ensuite été révisé par tous les membres du laboratoire et par notre directeur de recherche Luis A. Rokeach.

### 2.3 Abstract

In the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the molecular chaperone calnexin (Cnx1p) was shown to be essential for viability. However, we recently reported that under certain circumstances, *S. pombe* cells are able to survive in absence of calnexin/Cnx1p, indicating that an inducible pathway can complement the calnexin/Cnx1p essential function(s). This calnexin independent state (Cin) is transmitted by a non-chromosomal proteinaceous element exhibiting several prion-like properties. To assess to which extent the Cin state compensates for the absence of calnexin/Cnx1p, the Cin strain was further characterized. Cin cells exhibited cell-wall defects, sensitivity to heat shock, as well as higher secretion levels of a model glycoprotein. Together these results indicate that the Cin state does not compensate for all calnexin/Cnx1p functions. Reintroduction of plasmid-borne *cnx1*<sup>+</sup> partially rescued most but not all of the phenotypes displayed by Cin cells. Interestingly, Cin cells in stationary phase exhibited increased levels of caspase activation, and this phenotype was not suppressed by reintroduction of *cnx1*<sup>+</sup>, suggesting that cells in the Cin state are subjected to a stress other than the absence of calnexin/Cnx1p.

## 2.4 Introduction

Protein folding is a key process in the cell, as proteins must adopt their correct conformation in order to acquire and exert their functions. Inherited alterations in protein folding in the endoplasmic reticulum (ER) are the cause of several genetic diseases such as cystic fibrosis, juvenile emphysema, familial hypercholesterolemia and certain coagulation disorders (reviewed in (Kuznetsov & Nigam 1998; Dobson, 2003; Selkoe, 2003; Barral *et al.*, 2004). Altered protein conformations can also be infectious as in the case of prion-mediated ailments such as human Creutzfeldt-Jakob's disease, sheep scrapie and bovine spongiform encephalopathy (Kretzschmar, 1999; Glatzel *et al.*, 2005). In these cases, infectivity is caused by the transmissible change of conformation from the native cellular form of the PrP protein that is mainly  $\alpha$ -helical, into its prionic form that is mainly rich in  $\beta$ -sheet (Prusiner, 1998). The prionic conformer facilitates this structural conversion, and thereby it propagates to the other PrP sister molecules in the native state (Prusiner, 1998). Prion-like elements have also been described in fungi, in which they can act as non-chromosomal genetic elements conferring epigenetic traits. Indeed, because of their two basic features, i.e. the change of conformation which entails a loss and/or change of function of the protein and the ability of the prion conformer to structurally replicate, prion-like elements are able to propagate new traits and thus constitute a protein-based mode of inheritance. Among these fungal prion-like elements the best characterized are  $[PSI^+]$ ,  $[URE3]$ ,  $[RNQ^+]$  and  $[Het-S]$  (reviewed in (Liebman & Derkatch, 1999; Uptain & Lindquist, 2002; Wickner *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2004).

The folding of secreted and membrane-bound proteins takes place in the ER, where a battery of molecular chaperones and foldases accelerates and increases the yield of this process (reviewed in (Fewell *et al.*, 2001; Ellgaard & Helenius, 2003; Trombetta & Parodi, 2003; Kleizen & Braakman, 2004; van Anken & Braakman, 2005). In addition, molecular chaperones do monitor that newly synthesised polypeptides acquire their correct three-dimensional structure in a process designated quality control (Fewell *et al.*, 2001). When nascent proteins fail to fold correctly, they are retained by the quality control machinery and are subsequently targeted for degradation in the cytoplasm by the

ER-associated degradation machinery (ERAD; (Ma & Hendershot, 2004; Ahner & Brodsky, 2004; Meusser *et al.*, 2005; Lederkremer & Glickman, 2005).

Calnexin is a molecular chaperone that plays key roles in protein folding and quality control in the ER, and that is well conserved throughout species (Ellgaard & Frickel, 2003; Schrag *et al.*, 2003; Trombetta & Parodi, 2003; Helenius & Aebi, 2004; Hebert *et al.*, 2005; Lederkremer & Glickman, 2005; van Anken & Braakman, 2005). While calnexin displays selectivity for glycoproteins, it was also shown to assist the folding of non-glycosylated proteins both *in vitro* and *in vivo* (Jannatipour *et al.*, 1998; Beaulieu *et al.*, 1999; Saito *et al.*, 1999; Ihara *et al.*, 1999; Stronge *et al.*, 2001; Maréchal *et al.*, 2004). Structurally, calnexin is a type I membrane-bound protein containing a large luminal domain and a short cytosolic tail. Crystallography studies demonstrated that the luminal portion of calnexin is composed of two main structural domains: a long hairpin domain and a globular structure (Ross & Wickner, 2004). The long hairpin domain is formed by a highly conserved central domain (hcd), while the globular structure is composed of residues flanking the hcd. Functionally, the hairpin structure was implicated in interactions with other chaperones such as ERp57, while the globular domain was shown to harbour the calnexin's lectin activity and it is probably also involved in peptide-peptide interactions (Schrag *et al.*, 2003; Ellgaard & Frickel, 2003).

The calnexin homologue in *Schizosaccharomyces pombe* (*cnx1*<sup>+</sup>) was shown to be essential for its viability (Jannatipour & Rokeach, 1995; Parlati *et al.*, 1995). In order to determine the region encoding the essential function(s) of calnexin/Cnx1p, studies with a series of *cnx1* deletion mutants were carried out in our laboratory. Experiments with a mutant devoid of the hcd region ( $\Delta$ *hcd\_cnx1*) established that deletion of this domain does not impair the viability of the fission yeast. Moreover, it was shown that a small version of calnexin/Cnx1p, encoded by the *mini\_cnx1* mutant, supports cell viability with only 123 residues of the C-terminus of the protein, 52 amino acids (aa) of which are localized in the ER lumen (Elagöz *et al.*, 1999). Interestingly, while both the  $\Delta$ *hcd\_cnx1* and the *mini\_cnx1* mutants support cell viability and secrete active proteins, they do not exhibit

chaperone activity *in vitro* (Maréchal *et al.*, 2004). Therefore, these observations suggest that the calnexin/Cnx1p essentiality resides in another function than the chaperone one.

Further studies led to the discovery that the  $\Delta hcd\_cnx1$  mutant induces a mechanism that allows *S. pombe* viability in the absence of the essential chaperone calnexin/Cnx1p (Collin *et al.* 2004). This state of viability was designated Cin for calnexin independence. The Cin state was shown to be dominant in both haploid and diploid cells, inherited in a non-Mendelian fashion by the meiotic progeny, and transmitted to calnexin-dependent cells (Cdn) by transformation of Cin-cell extracts depleted of nucleic acids. These yeast prion-like characteristics suggested that the Cin state is transmitted by a proteinaceous genetic element designated [*cif*], for calnexin-independence factor (Collin *et al.*, 2004). The [*cif*] element would modulate the function of a gene or a pathway compensating for the essential function of calnexin/Cnx1p, thereby allowing the switch from the Cdn to the Cin state.

In order to determine whether the Cin state compensates for all functions exerted by calnexin/Cnx1p, we undertook the extended characterization of cells in the Cin state. A variety of phenotypes displayed by Cin cells were compared with those of a WT strain ( $cnx1^+$ ) and of two  $cnx1$  mutants devoid of chaperone function,  $mini\_cnx1$  and  $\Delta hcd\_cnx1$ . A Cin strain containing an episomal copy of  $cnx1^+$  was used to discriminate between phenotypes arising from the absence of calnexin/Cnx1p and those due to the Cin state itself. Cin cells were particularly sensitive to elevated temperature but were nevertheless resistant to protein folding stresses. Moreover, Cin cells exhibited cell-wall defects and reduced heat-shock resistance. In addition, the Cin strain secreted higher levels of cellulase; this was however at the expense of a reduced efficiency in the quality control for this glycoprotein. Together these observations indicate that the Cin state does not compensate for all calnexin/Cnx1p functions. Intriguingly, reintroduction of episomal  $cnx1^+$  reverted most but not all of the phenotypes displayed by Cin cells. Most notably, Cin cells showed elevated caspase activity. Remarkably however, caspase activation in the Cin strain was not suppressed by reintroduction of  $cnx1^+$ , suggesting that cells in the Cin state are subjected to a stress other than the lack of calnexin/Cnx1p.

## 2.5 Materials and Methods

Table I Yeast strains used for this study

Strains	Genotype	Reference or source
SP248	<i>h<sup>-</sup>, his3-D1, ade6-M216, leu1-32, ura4-D18</i>	(Burke & Gould, 1994)
SP3232	SP248 $\Delta cnx1::his3^+$ + pREP41 $cnx1^+$	(Elagöz <i>et al.</i> , 1999)
SP7109	SP248 $\Delta cnx1::his3^+$ + pREP41 $mini\_cnx1$	(Elagöz <i>et al.</i> , 1999)
SP7181	SP7109 + pREP41 $cnx1^+$	(Elagöz <i>et al.</i> , 1999)
SP3234	SP248 $\Delta cnx1::his3^+$ + pREP41 $\Delta hcd\_cnx1$	(Elagöz <i>et al.</i> , 1999)
SP7061	SP3234 + pREP41 $cnx1^+$	(Elagöz <i>et al.</i> , 1999)
SP7188	SP248 $\Delta cnx1::his3^+$ [ <i>cif</i> ]	(Collin <i>et al.</i> , 2004)
SP7202	SP7188 + pREP41 $cnx1^+$	(Collin <i>et al.</i> , 2004)
SP8655	SP248 $\Delta cnx1::his3^+$ + pREP41 $cnx1^+$ + pSLF172HSA	This study
SP8670	SP248 $\Delta cnx1::his3^+$ [ <i>cif</i> ] + pSLF172HSA	This study
SP8675	SP7188 + pREP41 $cnx1^+$ pSLF172HSA	This study
SP9672	SP248 $leu1-32::adh1_pcel1adh1,kan^R \Delta cnx1::his3^+$ + pREP41 $cnx1^+$	(Maréchal <i>et al.</i> , 2004)
SP11338	SP248 $leu1-32::adh1_pcel1adh1,kan^R \Delta cnx1::his3^+$ [ <i>cif</i> ]	This study
SP11345	SP11338 + pREP41 $cnx1^+$	This study

### Strains and media

*S. pombe* strains used in this study are described in Table I.  $cnx1^+$  and the  $cnx1$  mutants were expressed under the control of the thiamine repressible *nmt41* promoter (induction ratio 25X) and *nmt* terminator on the pREP41 plasmid. pREP41 is an *S. pombe* expression multicopy vector containing the *LEU2* marker and the *ars1* origin of replication (Elagöz *et al.*, 1999). For secretion assays, cells expressing human serum albumin (HSA) were obtained by transformation of the pSLF172-HSA plasmid (Maréchal *et al.*, 2004) into the described strains. *S. pombe* cells expressing cellulase I (Cel1p) from *Aspergillus aculeatus* were constructed as described in (Maréchal *et al.*, 2004). Cultures were grown in MM (Edinburgh minimal medium) supplemented with required nutrients as previously described (Moreno *et al.*, 1991), at 30°C unless otherwise specified. *S. pombe* transformations were performed using the PEG-lithium acetate procedure (Elbe, 1992).



### **Stress resistance**

For stress-resistance assays, chemicals were filter-sterilized and added to media at the indicated concentrations. Exponentially growing cells were adjusted to an OD<sub>595</sub> of 0.8, serially diluted ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ), spotted on solid media and grown for 7 days at the indicated temperature. Heat shock was performed on exponentially growing cells adjusted at an OD<sub>595</sub> of 0.8. Cells were either or not pre-treated at 37°C for 30 min, then incubated at 50°C for different times and cooled on ice. Cells were subsequently serially diluted, spotted on solid MM and incubated for 7 days at 30°C.

### **SDS-sensitivity assays**

Exponentially growing cells were spread on solid MM in top agar (0.7%). Disc diffusion assays were performed by placing a sterile 3M paper disc in the center of the plate where 10 µl of 10% SDS was spotted. After incubation for 5 days at either 30°C or 37°C, the diameter of the zone of growth inhibition (halo) was measured. Sensitivity was calculated by dividing the diameter of the halo of mutant strains by that of the wild type strain.

### **Secretion assays**

A 15 ml sample of exponentially growing cells was pelleted, and a volume of 12 ml of supernatant was concentrated 50X with Amicon Ultra 10 000 MWCO columns (Millipore, Bedford, USA). The equivalent of 1 OD<sub>595</sub> ( $2 \times 10^7$  cells) of pelleted cells and the corresponding volume of concentrated spent medium were boiled for 15 min and for 5 min, respectively. Subsequently, the samples were loaded on a SDS-12% polyacrylamide gel, transferred to nitrocellulose membrane and immunoblotted with the 12CA5 anti-HA mouse monoclonal antibody at a dilution of 1:500 for the detection of HA-tagged HSA and Cellp. Quantification of bands was performed by densitometry using the Quantity One program (BioRad).

Enzymatic assays of cellulase were essentially performed as described (Maréchal *et al.*, 2004). Briefly, the spent medium of an equivalent of 1 OD<sub>595</sub> of concentrated cultured cells was completed to 100 µl with water and mixed with 100 µl citrate buffer (0.1 M, pH 3.0) and 100 µl 0.8% AZCL-HE-cellulose (Azurine crossed-linked hydroxyethylcellulose)

as substrate (MegaZyme, North Rocks, N.S.W., Australia). The reactions were incubated for 18 h at 40°C. A volume of 1 ml of water was added to stop the reaction, and the OD<sub>620</sub> of the blue color produced after cleavage by cellulase was measured. The relative secretion efficiency of the mutants was reported as a ratio to the secretion of WT values.

#### ***In vivo* staining and microscopic analysis for caspase activity**

Cultures were harvested in exponential phase or after 4 days in stationary phase. A sample of  $1 \times 10^7$  cells was washed once in 1 ml phosphate buffered saline (PBS) 0.1 M pH 7.4 (136 mM NaCl, 25 mM KCl, 12 mM NaHPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in water) and resuspended in 150 µl of PBS containing 10 µM FITC-VAD-fmk (CaspACE™, Promega). After incubation for 20 min at 30°C with agitation, cells were washed in 1 ml PBS, resuspended in 100 µl PBS and analysed under the fluorescence microscope. Microscopic analyses were performed by using a fluorescence inverted-microscope Nikon TE2000U. Images were acquired using a motion-picture camera CCD coolSnapFx M® 12bit and treated with UIC Metamorph® software.

#### **Flow cytometry analysis**

Cells were stained with FITC-VAD-fmk as described above. Flow cytometry analysis was performed using FACS Calibur (Becton Dickinson Biosciences) on 10,000 cells. Emission from the argon LASER was at 488 nm; emission settings were 515-545 nm (filter FL1) for FITC-VAD-fmk. The percentage of positive stained cells was determined as the population of fluorescent cells with a higher fluorescent intensity than an unstained negative control. Three independent cultures were analysed.

#### **Statistical Analysis**

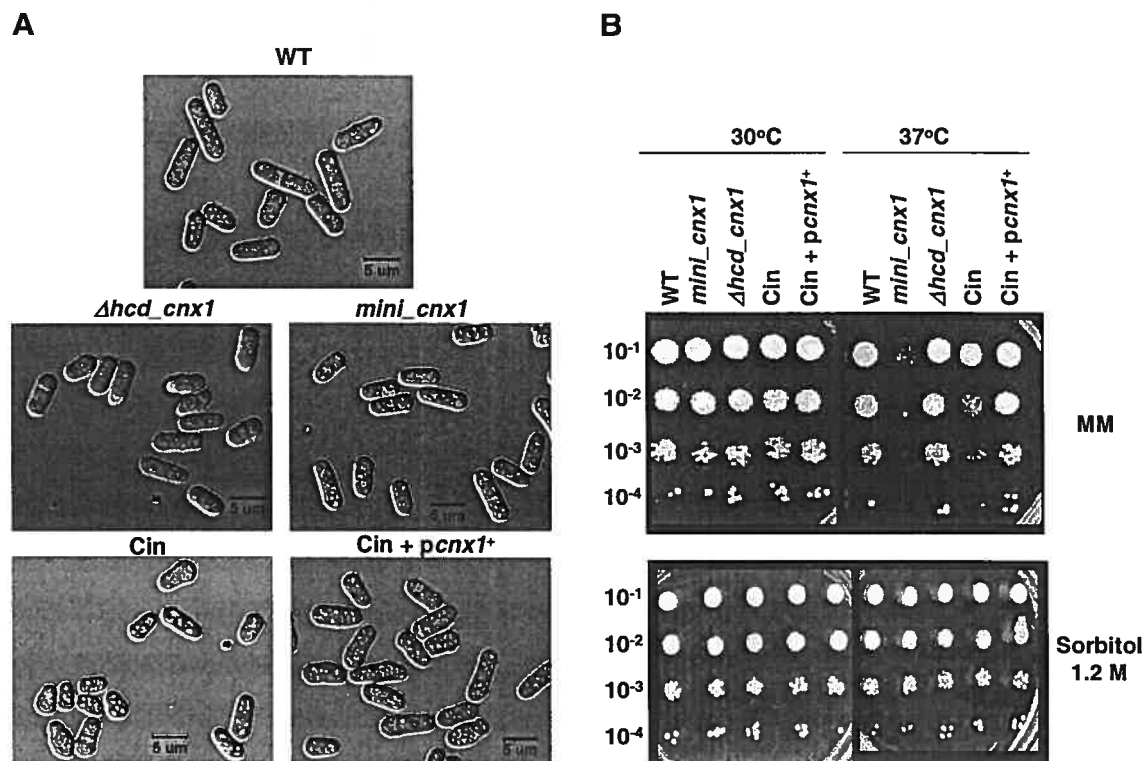
Significance of the variations of results among strains was determined by a global analysis of variance (ANOVA) as described in <http://www.physics.csbsju.edu/stats/anova.html>. In Figure 5, the significance of variation with respect to WT was also pair-wise evaluated by the test of Student.

## 2.6 Results

### 2.6.1 Cin cells are sensitive to cell-wall stresses

In order to compare the Cin strain with other *cnx1* mutants such as *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* displaying similar morphology (Elagöz *et al.*, 1999; Collin *et al.*, 2004), cells grown in exponential phase were analyzed by Nomarski microscopy. As shown in Figure 1A, Cin cells were shorter and rounder than *mini\_cnx1* or *Δhcd\_cnx1*, and sometimes presented an irregular pear-like shape. To investigate if the defects causing the altered morphology also affect the viability of the cells, the growth of these strains was examined at 30°C and 37°C. At 30°C, the various strains grew at rates comparable to WT, whereas at 37°C the growth of Cin was slightly affected. In contrast, the growth of *mini\_cnx1* cells was dramatically impaired at 37°C (Fig. 1B). Thus, the pathway completing the essential function of calnexin/Cnx1p allows the Cin strain to withstand the 37°C stress. Both *Δhcd\_Cnx1p* and *mini\_Cnx1p* are devoid of chaperone activity *in vitro* (Maréchal *et al.*, 2004). Since the Cin state is strongly induced by the *Δhcd\_cnx1* mutant but not by *mini\_cnx1* (Elagöz *et al.*, 1999), the differences in thermosensitivities between these two strains could be due to the activity of the pathway replacing the essential function of calnexin/Cnx1p in the *Δhcd\_cnx1* cells.

We have previously observed that culturing cells in medium supplemented with the osmostabilizer sorbitol rescues the growth defect of *cnx1* mutants at 37°C (Elagöz *et al.*, 1999), and hence we wished to test if this could also be the case for Cin cells. As shown in Figure 1B, the addition of 1.2 M sorbitol to the media rescued the sensitivity of Cin cells 37°C. The rescue by sorbitol of aberrant morphology and reduced growth phenotypes is indicative of cell-wall defects (Rose & Fink, 1987; Elagöz *et al.*, 1999). Accordingly, the Cin strain was further examined by exposure to cell-wall stresses. Calcofluor white is a fluorescent dye that binds to cell-wall and septum polysaccharides of dividing cells, and it inhibits the growth of mutants that are defective in cell-wall

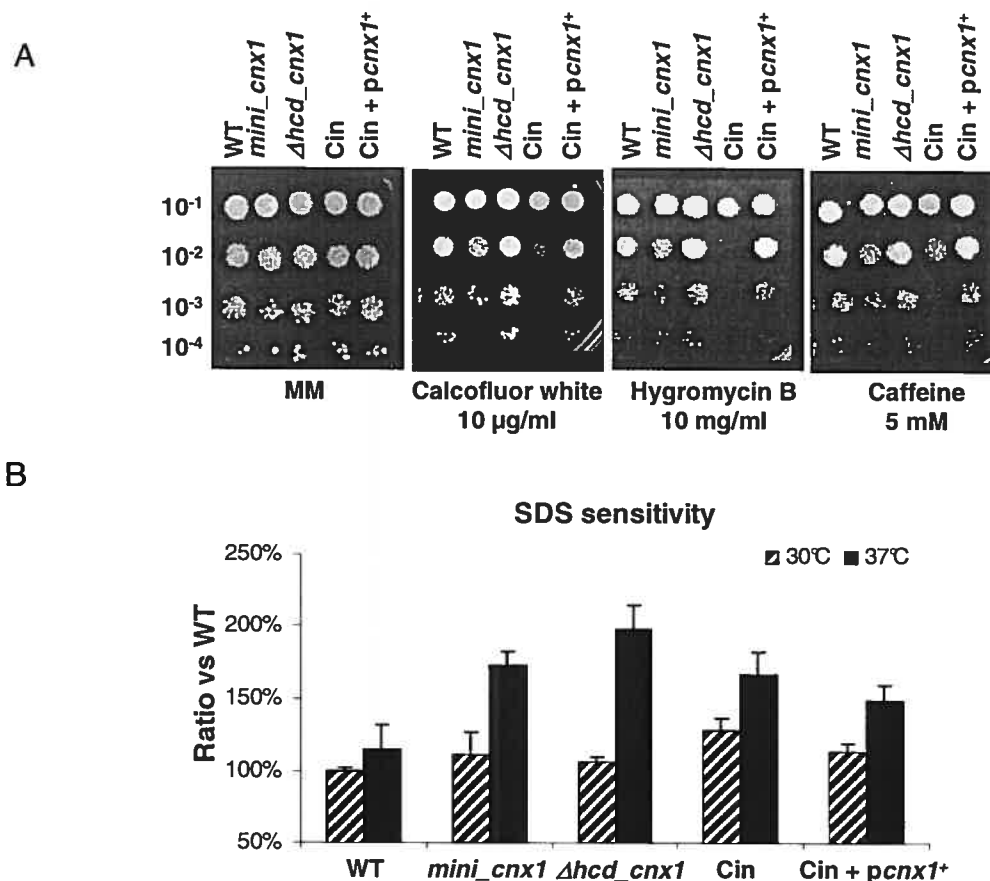


**Figure 1** Cin cells display aberrant morphology.

A) Cells were grown to mid-exponential phase at 30°C and observed by differential interference contrast (Nomarski) microscopy. Bar corresponds to 5  $\mu$ m. B) Exponentially growing cells were spotted ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ) on MM plates with or without 1.2 M sorbitol. Strains were incubated at 30°C or 37°C for 7 days. Strains tested were WT (SP3232), *mini\_cnx1* (SP7109),  $\Delta hcd\_cnx1$  (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102). Results are representative of three independent assays.

morphogenesis (Rose & Fink, 1987; Hampsey, 1997). In previous reports (Elagöz *et al.*, 1999; Collin *et al.*, 2004), microscopy analyses with Calcofluor-white showed that *mini\_cnx1*, *Δhcd\_cnx1* and Cin cells exhibit aberrant septum staining. As shown in Figure 2A, the growth of Cin cells is inhibited by Calcofluor white, while it does not affect the growth of the *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* mutants. The antibiotic hygromycin B lowers viability of cells affected in early stages of glycoprotein biosyntheses (Dean, 1995). Figure 2A shows that Cin cells were also affected by hygromycin B, but not the two *cnx1* mutants. It was reported that caffeine, which inhibits mammalian phosphodiesterase (Parsons *et al.*, 1988), can also inhibit the growth of cell-wall yeast mutants (Martin *et al.*, 2000). As depicted in Figure 2A, Cin cells were very sensitive to 5 mM caffeine. The sensitivity of Cin cells to Calcofluor white, hygromycin B and caffeine was rescued by reintroduction of *cnx1*<sup>+</sup> on a plasmid. These observations indicate that the absence of a functional calnexin/Cnx1p in the Cin strain results in important cell-wall defects.

To further investigate the integrity of the cell-wall in Cin cells, a disc diffusion assay was performed to quantify the mutants' sensitivity to SDS, a detergent which disturbs the membrane and exacerbates cell-wall defects (Sirisattha *et al.*, 2004). As it is possible to see in Figure 2B, Cin cells were more sensitive to SDS than WT and the two *cnx1* mutants at 30°C. Reintroduction of *cnx1*<sup>+</sup> on an episome into Cin cells (Cin + *pcnx1*<sup>+</sup>) palliated the SDS sensitivity to a level comparable to the *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* mutants. Furthermore, increasing the temperature to 37°C dramatically impaired the growth of Cin cells and the two *cnx1* mutants, suggesting that full-length calnexin/Cnx1p is necessary to cope with the combination of both high temperature and detergent stresses. Because the Cin state is induced at ~70% in the *Δhcd\_cnx1* strain (Collin *et al.* 2004), the elevated SDS sensitivity displayed by the *Δhcd\_cnx1* mutant at 37°C could be due the added rather than complementing effects in the same cells of defective calnexin function and the Cin state.



**Figure 2 Cin cells display cell-wall sensitivity.**

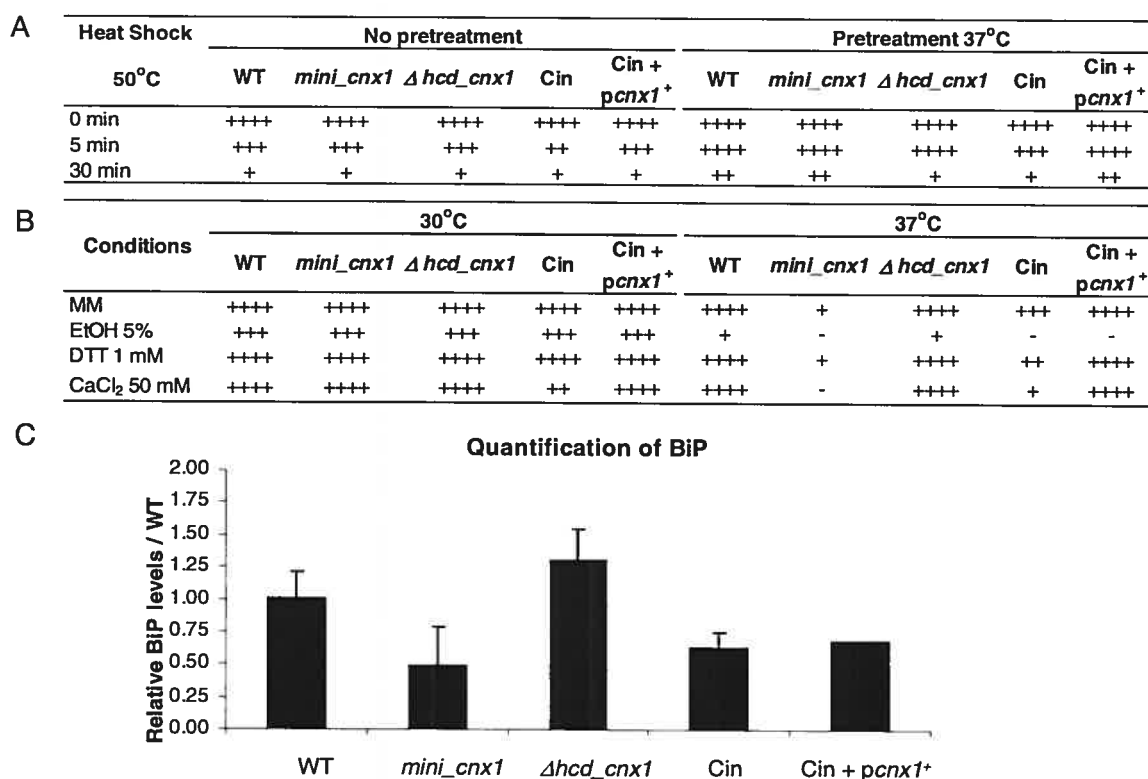
**A)** Exponentially growing cells were serially diluted ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ) and spotted on MM plates with or without the indicated chemicals. Strains were incubated at 30°C for 7 days. Strains tested were WT (SP3232), *mini\_cnx1* (SP7109),  $\Delta hcd\_cnx1$  (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102). Results are representative of three independent assays. **B)** To measure sensitivity of mutants to SDS, exponentially growing cells were spread in top agar (0.7%) to a lawn. Disc diffusion assays were performed by placing a 3M paper disc in the center of the plate and 10  $\mu$ l 10% SDS was spotted on the disc. After 5 days of incubation at 30°C or 37°C, the diameter of the zone of growth inhibition (halo) was measured and reported as a ratio of mutant on WT. The WT halo had a diameter of 28mm, which was arbitrarily set as 100%. A global analysis of variance (ANOVA) showed that the strain values are significantly different (30°C,  $P = 0.03$ ; 37°C,  $P = 0.0005$ ). Results are the mean of three independent assays. Strains tested were WT (SP3232), *mini\_cnx1* (SP7109),  $\Delta hcd\_cnx1$  (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102).

### 2.6.2 Cin cells are sensitive to calcium

Like its mammalian counterpart, *S. pombe* calnexin (Cnx1p) is a  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein (Parlati *et al.*, 1995). It was therefore interesting to evaluate the degree of sensitivity of Cin cells to  $\text{Ca}^{2+}$  as compared with the *mini\_cnx1* and  $\Delta hcd\_cnx1$  mutants. The addition of 50 mM  $\text{CaCl}_2$  significantly reduced the growth of Cin cells at 30°C as compared with the other strains tested (Fig. 3B). Moreover, the sensitivity to  $\text{Ca}^{2+}$  was enhanced at 37°C, and reintroduction of *cnx1*<sup>+</sup> into the Cin strain reduced this sensitivity. That Cin cells displayed higher sensitivity to  $\text{CaCl}_2$  than *cnx1* mutants suggests that the absence of calnexin/Cnx1p affected the balance of calcium in the cells. Thus, it seems that the portion of calnexin/Cnx1p encoded by the two *cnx1* deletion mutants tested is sufficient to cope with the 50 mM  $\text{Ca}^{2+}$  concentration at 30°C. However, at 37°C *mini\_cnx1* low tolerance to  $\text{Ca}^{2+}$ , suggesting that the functionality of the mutant calnexin/Cnx1p is compromised as previously observed (Elagöz *et al.*, 1999).

### 2.6.3 Cin cells are sensitive to heat shock but not to protein folding stresses

Next we wished to examine if Cin cells display other defects associated with the ER. Because the growth of Cin cells was affected at 37°C, and since calnexin/Cnx1p is a heat-shock protein whose mRNA levels increase 3-fold following heat treatment (Jannatipour & Rokeach 1995; Chen *et al.*, 2003), the effect of heat shock on Cin cells was studied. Cells were treated at 50°C with or without a pre-treatment at 37°C, and spotted on MM. Cin cells were more sensitive to heat shock than the other strains (Fig. 3A), and the reintroduction of plasmid-borne *cnx1*<sup>+</sup> salvaged this sensitivity for a treatment of 5 minutes. Moreover, a pre-incubation at the intermediate temperature of 37°C attenuated the sensitivity of all strains to heat shock, in agreement with previous reports showing that such a treatment induces thermotolerance in yeasts (Parsell & Lindquist, 1993; Saris & Makarow, 1998). Since calnexin is a molecular chaperone involved in protein folding and quality control in the ER, we were interested to test resistance of Cin cells to protein-folding stresses. To this end, the growth of strains was examined in media supplement



**Figure 3 Phenotypic characterisation of Cin cells.**

**A)** Exponentially growing cells were treated at 50°C with or without a 30 minutes preheating at 37°C. Cells were serially diluted ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ), spotted on MM, and grown for 7 days at 30°C. The growth extent is indicated by the number of the dilutions where growth was observed, from ++++ ( $10^{-4}$ ) to - (no growth). Strains tested were WT (SP3232), *mini\_cnx1* (SP7109),  $\Delta hcd\_cnx1$  (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102). Results are the mean of three independent assays. **B)** Exponentially growing cells were serially diluted ( $10^{-1}$ - $10^{-4}$ ) and spotted on MM plates with or without chemicals, as indicated. All strains were incubated at 30°C or 37°C for 7 days. Results are the mean of three independent assays. Strains tested were WT (SP3232), *mini\_cnx1* (SP7109),  $\Delta hcd\_cnx1$  (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102). **C)** Relative levels of BiP protein. Samples of 50  $\mu$ g protein extracts from exponentially growing cells were fractionated on a SDS-10% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose and immunoblotted with rabbit polyclonal antibodies directed against BiP. The same membrane was subsequently immunoblotted with antibodies directed against PCNA as an internal control. The level of the ratio BiP/PCNA of the WT strain was arbitrary set to 1.0. A global analysis of variance (ANOVA) showed that the values obtained among the strains were not significantly different ( $P = 0.06$ ). Results are the mean of three independent assays. Strains tested were WT (SP3232), *mini\_cnx1* (SP7109),  $\Delta hcd\_cnx1$  (SP3234), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102).



with either 5% EtOH or 1 mM DTT, conditions which affect protein folding (Jimenez & Oballe, 1994; Elagöz *et al.*, 1999). At 30°C, Cin cells were as resistant to these stresses as the WT strain, but the combination of heat and folding stresses exacerbated the sensitivity of all the strains tested in the case of EtOH and that of *mini\_cnx1* and Cin in the case of DTT (Fig. 3B).

Upon accumulation of unfolded or misfolded proteins within the ER, a stress signalling cascade (the unfolded protein response, UPR) is activated to induce synthesis of chaperones and folding enzymes in order to cope with the stress and prevent cell death (Ma and Hendershot 2004; Schroder & Kaufman, 2005). A diagnostic marker of UPR is an increase in the levels of the BiP chaperone (Pidoux & Armstrong, 1992). Accordingly, to evaluate the ER stress in the Cin strain, the levels of the BiP protein were quantified by immunoblotting. As shown in Figure 3C, there were no significant differences in the BiP levels in the various strains compared with the WT as evaluated by the ANOVA test, suggesting that neither the lack of calnexin/Cnx1p nor the Cin state provoke the accumulation of misfolded protein or UPR induction.

#### **2.6.4 The secretion efficiency of the glycoprotein cellulase is considerably increased in Cin cells**

Previously, we have reported that the chaperone function of calnexin/Cnx1p is not essential for protein secretion in *S. pombe* as the *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* mutants are able to secrete active proteins (Maréchal *et al.*, 2004). In order to gain further insight into the role of calnexin/Cnx1p in this process, the secretion efficiency of Cin cells was investigated. To this end, human serum albumin (HSA) and cellulase (Cell1p) from *Aspergillus aculeatus* were used in this work as the model proteins, since they were previously shown to interact with calnexin/Cnx1p (Maréchal *et al.*, 2004).

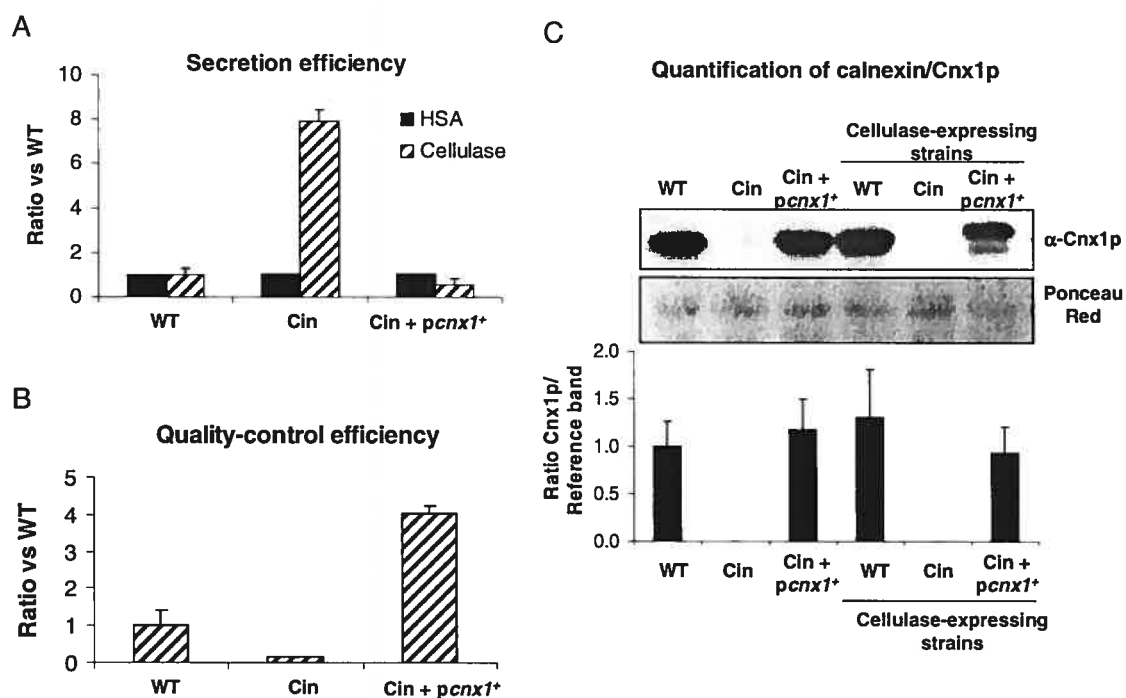
As demonstrated for other mutants, the absence of calnexin/Cnx1p chaperone function in Cin cells did not affect the secretion of the non-glycosylated model protein HSA (Fig. 4A). It has been proposed that interaction with a functional calnexin/Cnx1p may be

required for optimal secretion efficiency but the rate-limiting step for HSA secretion is protein folding (Maréchal *et al.*, 2004). The results presented here suggest that while calnexin/Cnx1p binds HSA, this interaction does not appear to be absolutely required for efficient secretion of this non-glycosylated model protein.

The interaction of cellulase (Cel1p) with calnexin/Cnx1p and its ER partners has been proposed to be the rate-limiting step for its secretion (Maréchal *et al.*, 2004). In the Cin strain the secretion efficiency of cellulase was 8-fold higher as compared with WT (Fig. 4A), and 2-fold higher relative to the levels reported for *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* (Maréchal *et al.*, 2004).

It should be noted that the increased secretion by Cin cells was not due to cell lysis, as verified by immunoblotting of the concentrated supernatant against the ER protein BiP (data not shown). Reintroduction of plasmid-borne *cnx1*<sup>+</sup> into the Cin strain diminished the secretion efficiency of cellulase to approximately half of the WT level. These results support the hypothesis that the interaction of cellulase with calnexin/Cnx1p is rate limiting for the secretion of this glycoprotein, as the absence of calnexin/Cnx1p resulted in the highest level of secretion of this model protein among the *cnx1* mutants.

Because of the remarkable increase in the secretion efficiency of cellulase by Cin cells, we considered that it was interesting to assess if the secreted cellulase is correctly folded. Accordingly, the quality-control efficiency for this protein was estimated as the ratio activity/quantity of secreted cellulase. This ratio for Cin cells was 5-fold lower than that of WT (Fig. 4B), indicating that increased cellulase secretion by Cin cells corresponds to a reduced efficiency of folding quality control of this glycoprotein. In other words, it appears as though a considerable number of partially folded or misfolded cellulase molecules escape the ER of Cin cells in the absence of calnexin/Cnx1p. Remarkably, reintroduction of plasmid-borne *cnx1*<sup>+</sup> into the Cin strain resulted in a 4-fold increase in the apparent quality-control as compared with the WT strain (Fig. 4B). This increase in quality control is not caused by a calnexin/Cnx1p overexpression as its levels were not significantly different among the strains (Fig. 4C).



**Figure 4** Cin cells secrete considerably more cellulase than wild type.

Samples of 12 ml of media from exponentially growing cells expressing the model protein HSA or Cellp were concentrated 50X using Amicon Ultra 10 000 MWCO concentrators (Millipore, Bedford, USA). The equivalent of 1 OD<sub>595</sub> concentrated supernatant or 0.25 OD<sub>595</sub> of cells for HSA and 1 OD<sub>595</sub> cells for Cellp were subsequently loaded on SDS-12% polyacrylamide gel, and quantified by western blotting against an HA-tag for both HSA and Cellp. **A)** Secretion efficiency was determined by calculating the ratio of secreted proteins on total (secreted + intracellular) model protein. Results are the mean of three independent assays. An ANOVA test showed that the differences between strains for HSA secretion were not significant ( $P = 0.4$ ), but were significant for cellulase secretion ( $P < 0.001$ ). Strains tested were for HSA secretion WT (SP8655), Cin (SP8670) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP8675) and for cellulase secretion WT (SP9672), Cin (SP11338) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP11345). **B)** Quality-control efficiency was calculated by dividing cellulase activity (see experimental procedures) by the amount of secreted protein. The quality-control efficiency of the WT strain was arbitrarily set to 1.0. An ANOVA test showed that the difference observed among the strains was significant ( $P = 0.0005$ ). Results are the mean of three independent assays. Strains tested were WT (SP9672), Cin (SP11338) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP11345). **C)** Relative levels of Cnx1p. Samples of 50  $\mu$ g protein extracts from exponentially growing cells were fractionated on a SDS-12% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose and stained with Ponceau Red. A band at about 50 kDa was chosen as internal control for loading. The same membrane was subsequently immunoblotted with rabbit polyclonal antibodies directed against Cnx1p. The level of the ratio Cnx1p/reference band of the WT strain was arbitrarily set to 1.0. A global analysis of variance (ANOVA) showed that the variations observed among the strains (excluding the Cin strains) were not significant ( $P = 0.43$ ). Results are the mean of two independent assays. Strains tested were WT (SP3232), Cin (SP7188), Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102), WT cellulase (SP9672), Cin cellulase (SP11338) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> cellulase (SP11345).

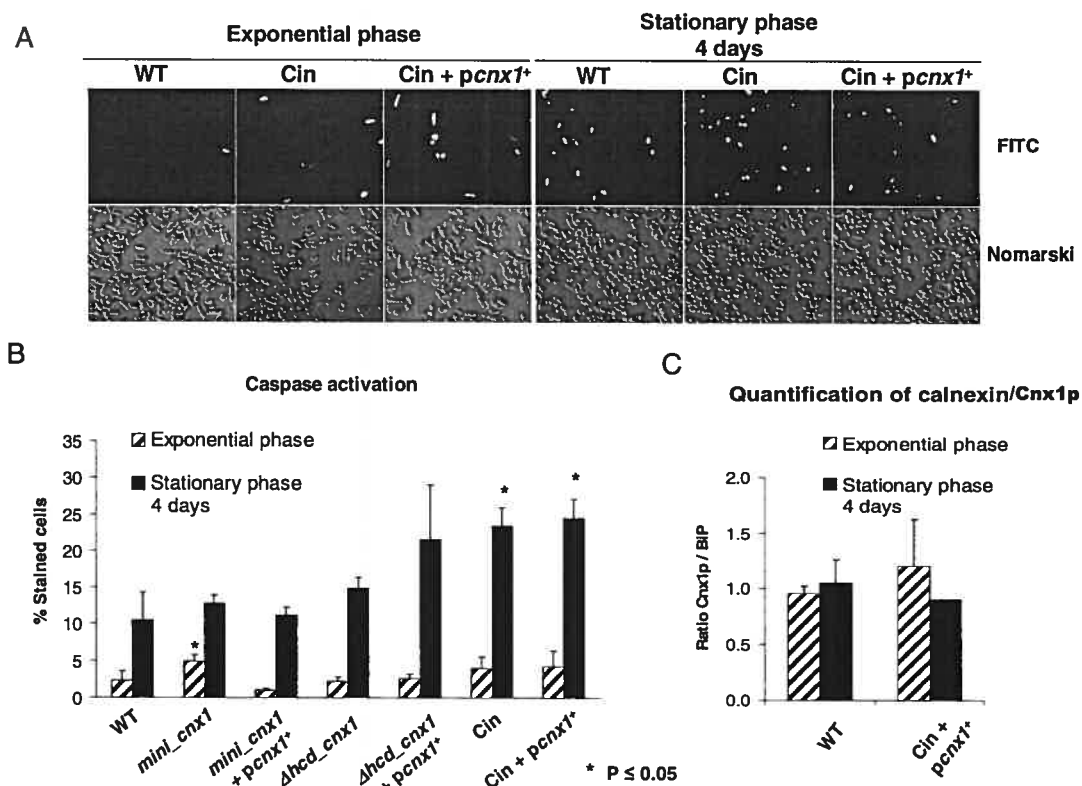
Note that calnexin/Cnx1p from the strain Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> expressing cellulase migrates slightly more slowly as compared to the other strains. One possibility is that the strain Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> overexpressing cellulase is under a stress which may lead to additional post-translational modification of calnexin/Cnx1p (Jannatipour & Rokeach, 1995). This possibility is currently under investigation in our laboratory.

### 2.6.5 Increased levels of caspase activity in Cin cells

Unicellular organisms such as *S. cerevisiae* were shown to undergo programmed cell death (PCD) in response to stresses like low concentrations of acetic acid, hydrogen peroxide, high concentration of mating pheromone, and DNA-damage conditions (Madeo *et al.*, 2002; Burhans *et al.*, 2003). Likewise, *S. pombe* was also shown to carry out an apoptosis-like process (Low *et al.* 2005). Similar to apoptosis in mammalian cells, this apoptotic-like cell-death program in yeast involves caspase-like proteases (metacaspases), DNA fragmentation, and accumulation of reactive oxygen species (ROS; ref. Low *et al.*, 2005).

To explore the possibility of PCD activation in the Cin strain, the fluorogenic caspase substrate FITC-labelled VAD-fmk was used. This compound was reported to be recognized by *S. cerevisiae* active caspases or proteases (Madeo *et al.*, 2002), and this present study demonstrates that this caspase probe is also operative in *S. pombe* (see Fig. 4A). Flow cytometry with this probe was used to evaluate the levels of caspase activity in the different strains in log phase and stationary phase. In stationary phase all strains exhibited higher caspase activity than in exponential phase (Fig. 4B). This observation is consistent with previous studies with *S. cerevisiae* showing that the apoptosis-like program is induced in stationary phase (Herker *et al.*, 2004; Knorre *et al.*, 2005). After 4 days in stationary phase, the *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* mutants showed a similar caspase activity to the WT levels, and this remained unchanged after introduction of *cnx1*<sup>+</sup> on a plasmid (Fig. 4B). In contrast, Cin cells exhibited a significant increase in caspase activity. The Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> strain exhibited an equally high level of caspase activation as the Cin cells. Thus, reintroduction of *cnx1*<sup>+</sup> did not rescue the caspase activation in the

Cin strain, suggesting that both the absence of a functional calnexin/Cnx1p and the Cin state itself could induce caspase activity in *S. pombe*. The variations in the caspase levels were not due to differences in calnexin/Cnx1p expression between strains and growth phases as shown by western blotting (Fig. 5C).



**Figure 5** Increased caspase induction in Cin cells and *cnx1* mutants.

Caspase activity was evaluated by the CaspACE<sup>TM</sup> FITC-VAD-fmk fluorescence assay on exponential phase and 4 days stationary phase cultures. **A)** Cells displaying caspase activation are shown by fluorescence microscopy. Nomarski microscopy is shown as control. **B)** Stained cells were counted by flow cytometry analysis. Samples of 10,000 cells were analysed from 3 independent cultures for each strain. Results are the mean of these three assays. The significance of differences in the results was evaluated by a Student test, calculated with respect to the WT strain. An ANOVA test showed that the difference observed among the strains was not significant for the exponential phase values ( $P = 0.09$ ), but are significant for the stationary phase values ( $P = 0.0004$ ). An additional statistical analysis was performed pair-wise with respect to the WT strain by the test of Student. For this panel, strains tested were WT (SP3232), *mini\_cnx1* (SP7109), *mini\_cnx1* + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7181),  $\Delta$ *hcd\_cnx1* (SP3234),  $\Delta$ *hcd\_cnx1* + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7061), Cin (SP7188) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102). **C)** The relative levels of calnexin/Cnx1p were determined as the ratio of Cnx1p/BiP. Samples of 50  $\mu$ g protein extracts from exponentially growing cells were fractionated on a SDS-12% polyacrylamide gel, transferred onto nitrocellulose and immunoblotted with rabbit polyclonal antibodies directed against Cnx1p. The same membrane was subsequently stripped and immunoblotted with rabbit polyclonal anti-BiP antibodies as an internal control. A global analysis of variance (ANOVA) showed that the variations observed among the strains were not significant ( $P = 0.73$ ). Results are the mean of two independent assays. Strains tested were WT (SP3232) and Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> (SP7102).

## 2.7 Discussion

To gain more insight into the calnexin-independent state, we characterized the Cin strain in comparison to WT and the *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* deletion mutants, which are both devoid of chaperone function.

Cin cells were smaller and displayed aberrant pear or round shape morphology at 30°C; phenotypes that are diagnostic of cell-wall defects. Indeed, Cin cells were more sensitive than the *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* mutants to the cell-wall stresses Calcofluor white, hygromycin B, caffeine, and SDS. As *mini\_Cnx1p* and *Δhcd\_Cnx1p* lack chaperone activity *in vitro*, it appears then that the chaperone function of calnexin/Cnx1p may not be absolutely required for cell-wall biosynthesis at 30°C. On the other hand, the altered morphology and cell-wall sensitivity of Cin cells was rescued by reintroduction of plasmid-borne *cnx1*<sup>+</sup>. These observations suggest a role of the calnexin/Cnx1p molecule in the integrity of the *S. pombe* cell-wall that appears to be other than its chaperone function, and that could reside in its interactions with other components of the ER quality-control mechanism. The involvement of the ER quality-control machinery in yeast cell-wall biogenesis has been documented. In *S. cerevisiae* for instance, the ER chaperone Kar2p/BiP and the quality-control proteins glucosidase I (*CWH41*) and glucosidase II (*GLS2*) are necessary for the formation of a functional cell wall, but not for efficient protein secretion (Simons *et al.*, 1998; Shahinian *et al.*, 1998). In *S. pombe*, genetic depletion of the quality-control sensor protein UDP-Glc:glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) was also reported to cause cell-wall defects (Fanchiotti *et al.*, 1998). Moreover, the fission yeast's calnexin/Cnx1p was shown to functionally interact with UGGT, glucosidases I and II, and to form a complex with BiP *in vivo* (Jannatipour & Rokeach, 1995; Franchiotti *et al.*, 1998; Elagöz *et al.*, 1999). *In vivo*, the interaction with BiP occurs via a 52-residue portion of calnexin/Cnx1p found in both *mini\_Cnx1p* and *Δhcd\_Cnx1p* mutants (Elagöz *et al.*, 1999; Maréchal *et al.*, 2004). Since no interaction between calnexin/Cnx1p and BiP could be observed *in vitro*, it was proposed that *in vivo* this 52-residues region of calnexin/Cnx1p could act in the scaffolding of a complex

including BiP (Elagöz *et al.*, 1999; Maréchal *et al.*, 2004). Thus, one could speculate that the *mini\_cnx1* and  $\Delta hcd\_cnx1$  strains are more resistant to cell-wall stresses as compared to Cin cells because the calnexin/Cnx1p mutants engage via the 52-residue region in interactions with components of the folding/quality control machineries that are important for cell-wall integrity.

Because of its various implications in the protein folding process, we investigated if the absence of calnexin/Cnx1p resulted in a higher sensitivity to protein folding stresses. Cin cells displayed the same sensitivity to DTT and EtOH stresses as the *mini\_cnx1* and  $\Delta hcd\_cnx1$  mutants. This lack of sensitivity to protein folding stresses for Cin cells correlated with undetected UPR induction in these cells. These phenotypes suggest that the sum of chaperones and accessory proteins in Cin cells is sufficient to cope with the amount of misfolded proteins caused by DTT and EtOH treatments in the absence of calnexin/Cnx1p.

Calnexin is implicated in the correct folding of secretory proteins. Experimentally, protein secretion can be modulated by altering the folding and quality control machinery of the ER, but different effects are observed depending on the substrates studied (reviewed in Conesa *et al.*, 2001). For example, deletion of the calnexin homologue *CNE1* did not alter the secretion levels of non-glycosylated proteins in *S. cerevisiae*, but it did affect differently the secretion of two glycosylated proteins (Song *et al.*, 2002). In *S. pombe*, *cnx1*-deletion mutants devoid of chaperone function showed increased secretion of several proteins (Maréchal *et al.*, 2004). The results presented here demonstrate that the absence of calnexin/Cnx1p chaperone activity in Cin cells did not influence the secretion of the non-glycosylated protein HSA, while it resulted in a considerable increase in secretion of the glycosylated protein cellulase. Interestingly, both model proteins were shown to transiently bind calnexin/Cnx1p *in vivo* (Maréchal *et al.*, 2004). Further analysis of the cellulase secreted by Cin cells revealed a lowered activity/amount ratio than that secreted by the WT strain, indicating a reduced efficiency of quality control of folding for this glycoprotein. Intriguingly, the Cin and *cnx1*-mutant strains studied did not exhibit significant UPR induction nor were they severely affected by protein-folding stresses,



suggesting that the balance of chaperones in the ER is adequate to ensure protein folding. Thus these observations suggest that calnexin/Cnx1p may be of greater importance for the folding and quality control of specific proteins as is the case for cellulase. Also, because of the cell-wall sensitivity displayed by the Cin cells, it appears reasonable to assume that calnexin/Cnx1p would be implicated directly or indirectly in the biosynthesis of some cell-wall proteins. On the other hand, the reintroduction of plasmid-borne *cnx1*<sup>+</sup> in Cin cells resulted in a diminished cellulase secretion of about half WT levels while the secreted proteins display a 4-times higher activity. One could envisage that the quality-control machinery in place in Cin cells replaces some of calnexin's functions and the addition of *cnx1*<sup>+</sup> to the system somewhat enhances the quality control levels. The apparent increase in quality control in Cin + *pcnx1*<sup>+</sup> cells may result from the enhanced retention of secreted glycosylated proteins in which a protein can only escape the machinery when correctly folded.

Heat-shock response and thermosensitivity imply two distinct pathways in yeast (Lindquist, 1992). In the primary response after heat shock, the expression of numerous genes (*hsp*), including chaperones, increases significantly in order to aid the cell in recuperating from heat stress, and this is different from the pathways required to tolerate prolonged culture at elevated temperature (Morano *et al.*, 1998). In this vein, calnexin/Cnx1p seems to have a role in the heat-shock response since Cin cells display higher sensitivity than the *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* mutant strains. This also indicates that the pathway compensating for the essential function(s) of calnexin/Cnx1p in Cin cells does not provide sufficient protection against heat shock. Since the role of calnexin/Cnx1p in response to heat shock is accomplished by the *mini\_cnx1* and *Δhcd\_cnx1* mutants, which lack chaperone activity, these observations suggest that this calnexin/Cnx1p function may lie in its interactions with other components of the protein folding machinery, such as BiP. On the other hand, the pathway compensating for the essential function(s) of calnexin/Cnx1p provides enough resistance to Cin cells to afford prolonged growth at 37°C and resistance to folding stresses.

Initial indications for PCD in *S. pombe* were obtained by examining the effects of expressing human Bcl-2 family proteins Bax, Bak, Bcl-2, and Bcl-XL in the fission yeast (Jurgensmeier *et al.*, 1997; Low *et al.*, 2005). Expression of the pro-apoptotic proteins Bak resulted in *S. pombe* lethality and this phenotype was suppressed by co-expression of the anti-apoptotic protein Bcl-XL or Bcl-2. A two-hybrid system screen aimed at discovering the *S. pombe* lethal partner of Bak identified calnexin/Cnx1p as required for Bak-induced cell death (Torgler *et al.*, 1997). On the basis of the potential implication of calnexin/Cnx1p in apoptosis, it was interesting to explore the possible induction of caspase activity as a marker for apoptosis in the Cin strain, since it is able to survive in the absence of calnexin/Cnx1p. The use of a fluorogenic marker in exponential phase revealed that all strains undergo approximately the same level of caspase activation as WT. However, after four days in stationary phase, increased caspase response was observed for the Cin strain as compared with WT. Because of the alluded implication of calnexin/Cnx1p in apoptosis signalling, it appears that the mini\_Cnx1p and  $\Delta$ hcd\_Cnx1p mutants may efficiently act in apoptosis signalling. The high rate of caspase activation in Cin cells could be due to the absence of calnexin/Cnx1p. Interestingly however, reintroduction of WT calnexin/Cnx1p into the Cin strain did not re-establish the basal level of metacaspase activation, indicating that the Cin state could itself be implicated in the induction of the apoptosis cascade. This also suggests a dominance of the Cin state on calnexin function as we previously observed (Collin *et al.*, 2004). Our results are consistent with the notion that calnexin/Cnx1p plays a role in signalling apoptosis in *S. pombe*, a hypothesis which is now under investigation in our laboratory.

## **2.8 Acknowledgements**

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant MOP-62703) to L.A.R. P.B.B. received an NSERC PhD studentship, and P.S., an FRSQ MSc studentship. R.G., A.R., P.S and C.T. received scholarships from Faculté des Études Supérieures-Département de biochimie, Université de Montréal.

We thank Alexandre Leroux and Dr. Jim Omichinski for critical reading of the manuscript and useful suggestions.

## 2.9 Reference list

Ahner A and Brodsky JL (2004) Checkpoints in ER-associated degradation: excuse me, which way to the proteasome? *Trends Cell Biol* **14**: 474-478.

Barral JM, Broadley SA, Schaffar G, and Hartl FU (2004) Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* **15**: 17-29.

Beaulieu H, Elagöz A, Crine P, and Rokeach LA (1999) Interaction of mammalian neprilysin with binding protein and calnexin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem J* **340**: 813-819.

Burhans WC, Weinberger M, Marchetti MA, Ramachandran L, Urso G, and Huberman JA (2003) Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat. Res.* **532**: 227-243.

Burke JD and Gould KL (1994) Molecular cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe his3* gene for use as a selectable marker. *Mol Gen Genet* **242**: 169-176

Chen D, Toone WM, Mata J, Lyne R, Burns G, Kivinen K, Brazma A, Jones N, and Bahler J (2003) Global Transcriptional Responses of Fission Yeast to Environmental Stress. *Mol Biol Cell* **14**: 214-229.

Chien P, Weissman JS, and DePace AH (2004) Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Ann Rev Biochem* **73**: 617-656.

Collin P, Beauregard PB, Elagöz A, and Rokeach LA (2004) A non-chromosomal factor allows viability of *Schizosaccharomyces pombe* lacking the essential chaperone calnexin. *J Cell Sci* **117**: 907-918.

Conesa A, Punt PJ, van Luijk N, and van den Hondel CAMJJ (2001) The Secretion Pathway in Filamentous Fungi: A Biotechnological View. *Fungal Genet Biol* **33**: 155-171.

Dean N (1995) Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1287-1291.

Dobson CM (2003) Protein folding and misfolding. *Nature* **426**: 884-890.

Elagöz A, Callejo M, Armstrong J, and Rokeach LA (1999) Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved domain is dispensable for viability. *J Cell Sci* **112**: 4449-4460.

- Elbe R (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* **13**: 18-19.
- Ellgaard L and Frickel E (2003) Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* **39**: 223-347.
- Ellgaard L and Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 181-191.
- Fanchiotti S, Fernandez F, D'Alessio C, and Parodi AJ (1998) The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biol* **143**: 625-635.
- Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, and Brodsky JL (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* **35**: 149-191.
- Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, and Aguzzi A (2005) Human Prion Diseases: Molecular and Clinical Aspects. *Arch Neurol* **62**: 545-552.
- Hampsey M (1997) A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1099-1133.
- Hebert DN, Garman SC, and Molinari M (2005) The glycan code of the endoplasmic reticulum: asparagine-linked carbohydrates as protein maturation and quality-control tags. *Trends in Cell Biol* **15**: 364-370
- Helenius A and Aebi M (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**: 1019-1049.
- Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Frohlich KU, Wissing S, Buttner S, Fehr M, Sigrist S, and Madeo F (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* **164**: 501-507.
- Ihara Y, Cohen-Doyle MF, Saito Y, and Williams DB (1999) Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol Cell* **4**: 331-341
- Jannatipour M, Callejo M, Parodi AJ, Armstrong J, and Rokeach LA (1998) Calnexin and BiP interact with acid phosphatase independently of glucose trimming and reglucosylation in *S. pombe*. *Biochemistry* **37**: 17253-17261.
- Jannatipour M and Rokeach LA (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J Biol Chem* **270**: 4845-4853.
- Jimenez J and Oballe J (1994) Ethanol-hypersensitive and ethanol-dependent cdc-mutants in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* **245**: 86-95.

- Jurgensmeier JM, Krajewski S, Armstrong RC, Wilson GM, Oltersdorf T, Fritz LC, Reed JC, and Otilie S (1997) Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **8**: 325-339.
- Kleizen Z and Braakman I (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Cur Opin Cell Biol* **16**: 343-349.
- Knorre DA, Smirnova EA, and Severin FF (2005) Natural conditions inducing programmed cell death in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc)* **270**: 264-266.
- Kretzschmar H (1999) Molecular pathogenesis of prion diseases. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249 S3**: 56-63.
- Kuznetsov G and Nigam SK (1998) Folding of secretory and membrane proteins. *New Eng J Med* **339**: 1668-1695.
- Lederkremer GZ and Glickman MH (2005) A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends in Biochemical Sciences* **30**: 297-303.
- Liebman SW and Derkatch IL (1999) The yeast (*PSI*<sup>+</sup>) prion: making sense of nonsense. *J Biol Chem* **274**: 1181-1184.
- Lindquist S (1992) Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Cur Opin Gen Develop* **2**: 748-755.
- Low CP, Liew LP, Pervaiz S, and Yang H (2005) Apoptosis and lipoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* **5**: 1199-1206.
- Ma Y and Hendershot LM (2004) ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* **28**: 51-65.
- Madeo F, Engelhardt S, Herker E, Lehmann N, Maldener C, Proksch A, Wising S, and Frölich K-U (2002) Apoptosis in yeast: a new model system with application in cell biology and medicine. *Curr Genet* **41**: 208-216.
- Maréchal A, Tanguay P-L, Callejo M, Guérin R, Boileau G, and Rokeach LA (2004) Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *Biochem J* **380**: 441-448.
- Martin H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C, and Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Sit2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.

- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, and Sommer T (2005) ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* **7**: 766-772.
- Morano KA, Liu PCC, and Thiele DJ (1998) Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 197-203.
- Moreno S, Klar A, and Nurse P (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth Enzymol* **194**: 795-823.
- Parlati F, Dignard D, Bergeron JJM, and Thomas DY (1995) The calnexin homologue *cnxI*<sup>+</sup> in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *EMBO J* **14**: 3064-3072.
- Parsell DA and Lindquist S (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* **27**: 437-496.
- Parsons WJ, Ramkumar V, and Stiles GL (1988) Isobutylmethylxanthine stimulates adenylate cyclase by blocking the inhibitory regulatory protein, Gi. *Mol Pharmacol* **34**: 37-41
- Pidoux AL and Armstrong J (1992) Analysis of the BiP and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **11**: 1583-1591.
- Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13363-13383.
- Rose MD and Fink GR (1987) *KAR1*, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell* **48**: 1047-1060.
- Ross ED and Wickner RB (2004) Prions of yeast fail to elicit a transcriptional response. *Yeast* **21**: 963-972.
- Saito Y, Ihara Y, Leach MR, Cohen-Doyle MF, and Williams DB (1999) Calreticulin functions as a molecular chaperone for both glycosylated and non-glycosylated proteins. *EMBO J* **18**: 6718-6729.
- Saris N and Makarow M (1998) Transient ER retention as stress response: conformational repair of heat-damaged proteins to secretion-competent structures. *J Cell Sci* **111**: 1575-1582.
- Schrag JD, Procopio DO, Cygler M, Thomas DY, and Bergeron JJM (2003) Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 49-57
- Schroder M and Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* **569**: 29-63

- Selkoe D (2003) Folding proteins in fatal ways. *Nature* **426**: 900-904.
- Shahinian S, Dijkgraaf GJP, Sdicu AM, Thomas DY, Jakob CA, Aebi M, and Bussey H (1998)  
Involvement of protein *N*-glycosylation and processing in the biosynthesis of cell wall  $\beta$ -1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **149**: 843-856.
- Simons JF, Ebersold M, and Helenius A (1998) Cell wall 1,6- $\beta$ -glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *EMBO J* **17**: 396-405.
- Sirisattha S, Momose Y, Kitagawa E, and Iwahashi H (2004) Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Research* **38**: 61-70.
- Song Y, Azakami H, Shamima B, Jianwei H, and Kato A (2002) Different effects of calnexin deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on the secretion of two glycosylated amyloidogenic lysozymes. *FEBS Lett* **512**: 213-217.
- Stronge VS, Saito Y, Ihara Y, and Williams DB (2001) Relationship between Calnexin and BiP in Suppressing Aggregation and Promoting Refolding of Protein and Glycoprotein Substrates. *J Biol Chem* **276**: 39779.
- Torgler CN, Tiani M, Raven T, Aubry J, Brown R, and Meldrum E (1997) Expression of bak in *S. pombe* results in a lethality mediated through interaction with the calnexin homologue Cnx1. *Cell Death and Differen* **4**: 263-271.
- Trombetta ES and Parodi AJ (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 649-676.
- Uptain SM and Lindquist S (2002) Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol* **56**: 703-741.
- van Anken E and Braakman I (2005) Versatility of the endoplasmic reticulum protein folding factory. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **40**: 191-228.
- Wickner RB, Edskes HK, Ross ED, Pierce MM, Baxa U, Brachmann A, and Shewmaker F (2004) Prion genetics: new rules for a new kind of gene. *Ann Rev Genet* **38**: 681-707.



### **3. Caractérisation de la voie d'induction de l'état Cin**

## Caractérisation de la voie d'induction de l'état Cin

Cynthia Turcotte, Renée Guérin, Alexandre Leroux et Luis A. Rokeach

### 3.1 Contribution des auteurs

Ce projet a été réalisé en collaboration avec Renée Guérin. Nous avons réalisé ensemble le criblage génétique présenté aux Figure 15 et 16, tous les immunobuvardages western pour vérifier la présence de la calnexine dans les souches Ura- identifiées ainsi que la retransformation des candidats pour vérifier si le phénotype était lié. J'ai effectué la détection de la calnexine présentée à la Figure 16C, les essais de perte plasmidique (pLEV, *mrfp1*, *pfk1*, *gpd1*) de la Figure 18C ainsi que ceux de la Figure 19 et du Tableau II. J'ai sous-cloné le gène *mrfp1* sur le vecteur pRep3X, les protéines de fusion *pgk1mrfp1* et *pyk1mrfp1* et effectué la transformation dans les souches appropriées de *S. pombe*. Renée Guérin a effectué l'essai d'électrophorèse sur gel d'agarose présenté à la Figure 17, les immunobuvardages de la Figure 18A,B et les essais de perte plasmidique (*pgk1*, *pyk1*) de la Figure 18C. Elle a cloné les gènes *pgk1* et *pyk1* sur le vecteur pLEV et créé les souches de *S. pombe* contenant ces vecteurs. Nous avons fait conjointement les essais de microscopie confocale présentés à la Figure 20. Alexandre Leroux a effectué le clonage des gènes *gpd1* et *pfk1* sur le vecteur pLEV et notre directeur de recherche Luis A. Rokeach a supervisé le déroulement du projet.

### 3.2 Introduction

Le repliement des protéines et le contrôle de qualité de ce repliement sont des processus clés pour la cellule puisque les protéines doivent atteindre leur conformation pour exercer leurs fonctions. L'accumulation de protéines inactives ou encore mal repliées peut entraîner l'apparition de maladies dues au repliement des protéines. Des altérations géniques nuisent également au bon repliement de certaines protéines en les empêchant d'atteindre leur conformation active. Ce phénomène cause de nombreuses maladies héréditaires comme la fibrose kystique, l'emphysème juvénile et l'hypercholestérolémie familiale (119-121). Bien que certaines protéines arrivent à se replier correctement *in vitro*, le processus de repliement est facilité *in vivo* par une batterie de chaperones moléculaires et de foldases de façon à atteindre une vitesse compatible avec la vie (22).

Dans le réticulum endoplasmique, les chaperones moléculaires calnexine et calréticuline participent au repliement et au contrôle de la qualité d'un grand nombre de protéines membranaires et sécrétées (15, 22, 67, 150). Ces deux chaperones peuvent interagir en tant que lectine avec les peptides néo-synthétisés via leur glycan mono-glucosylé (15, 17) ou encore interagir comme une chaperone classique via des interactions peptide-peptide (67). La calnexine est une protéine membranaire composée de deux domaines similaires à ceux de la calréticuline, son paralogue soluble. Le domaine globulaire est formé des sections C- et N-terminales de la partie luminale et est impliqué dans la fonction lectine (53, 151). Le domaine en épingle à cheveux contient trois ou quatre répétitions des motifs I [I-DP(D/E)A-KPEDWD(D/E)] et II [G-W—P-IN-P-Y] qui forment le domaine hautement conservé (hcd) et est impliqué dans la liaison d'ions de calcium ainsi que dans les interactions avec les autres protéines (53, 151). La calnexine peut former des complexes *in vivo* avec les chaperones ERp57, BiP et Sec61 $\beta$ , permettant ainsi une coopération entre les chaperones pour le repliement des protéines (50, 52, 67).

Le gène *cnx1*<sup>+</sup> codant pour l'homologue de la calnexine chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* est essentiel à sa viabilité (48, 49). Cette levure ne possède pas de gène codant pour un homologue de la calréticuline, suggérant que la calnexine

suffit au repliement des protéines de cet organisme. Notre laboratoire a construit plusieurs mutants de délétion de *cnx1* afin de déterminer la région conférant l'essentialité du gène. Ainsi, nous avons observé que la région hautement conservée (*hcd*) n'est pas nécessaire pour soutenir la viabilité de cette levure avec le mutant  $\Delta hcd\_cnx1$ . Le plus petit mutant caractérisé permettant la viabilité est nommé *mini\_cnx1* et code pour une protéine de 123 acides aminés, dont seulement 52 résidus sont situés dans le domaine luminal (52). Ces deux mutants de délétion peuvent former un complexe avec la chaperone BiP (52), mais ils n'ont aucune action chaperone *in vivo* (83).

Un phénomène permettant la viabilité de la levure *Schizosaccharomyces pombe* en l'absence de la chaperone essentielle calnexine a récemment été découvert. Cet état a été nommé Cin pour calnexine indépendant. Il peut être induit spécifiquement par le mutant  $\Delta hcd\_cnx1$ , mais pas par la forme sauvage *cnx1*<sup>+</sup> par la protéine plus courte encodée par *mini\_cnx1*. Ce phénomène présente les mêmes caractéristiques que les prions de levure. Il a été proposé que ce phénomène soit médié par un élément extra chromosomique protéique qui permettrait l'expression d'un suppresseur hypothétique de la calnexine, nommé *scx*, qui remplirait la fonction essentielle de la calnexine et ainsi supporterait la viabilité de la cellule en l'absence de calnexine (140). De plus, la caractérisation de la souche Cin a permis d'établir que l'état Cin ne remplit pas toutes les fonctions de la calnexine puisque cette souche est plus sensible à certains stress, démontre une diminution du contrôle de qualité de la protéine hétérologue cellulase et a un taux d'apoptose plus élevé tel que démontré par le marquage des caspases activées. Ces résultats démontrent que la viabilité en l'absence de la calnexine nécessite effectivement l'activation d'une voie alternative distincte de la calnexine.

Il était ensuite intéressant de caractériser cette voie menant à l'état Cin. Afin d'identifier les éléments impliqués dans la voie Cin, un criblage génétique été effectué par la surexpression de banques d'ADN complémentaire dans une souche de *S. pombe* ayant une délétion génomique de la calnexine complémentée par une copie plasmidique de la calnexine. Les transformants ont été sélectionnés pour la perte du plasmide calnexine, impliquant ainsi l'induction de l'état Cin. Ce criblage a permis l'identification des gènes

*pyk1* et *pgk1*, codant respectivement pour les enzymes glycolytiques pyruvate kinase/Pyk1p et phosphoglycérate kinase/Pgk1p. L'effet observé était bien lié aux gènes identifiés, puisque le clonage de *pyk1* et de *pgk1* suivi de leur transformation dans une souche de levure naïve a induit *de novo* l'état Cin. Par ailleurs, la surexpression de deux autres gènes glycolytiques, *pfk1* et *gpd1*, n'a pas entraîné l'apparition de l'état Cin, confirmant ainsi la spécificité de l'induction des candidats du criblage. Un lien entre la glycolyse et la calnexine a donc été étudié.

En second lieu, l'impact de certaines conditions de stress sur l'induction de l'état Cin a été étudié. Nos résultats précédents ont démontrés que les cellules Cin sont sensibles au choc thermique et à des stress affectant la paroi cellulaire, mais qu'elles résistent aussi bien aux stress de repliement des protéines que les cellules sauvages (152). À partir d'une souche de *S. pombe* ayant une délétion génomique de la calnexine suppléée d'une copie de la calnexine sur un plasmide *ura4<sup>+</sup>*, des essais de ségrégation plasmidique ont été effectués dans des conditions de stress thermique, osmotique, oxydatif et de repliement des protéines. Les résultats préliminaires présentés ici ne démontrent pas de lien entre ces conditions de stress et l'apparition de l'état Cin.

### 3.3 Matériel et méthodes

#### Souches et milieux

Les souches de *Schizosaccharomyces pombe* utilisées dans cette étude sont décrites au Tableau I (p. 87). Les cellules sont cultivées à 30°C dans du milieu minimal d'Édimbourg (MM) supplémenté avec les nutriments nécessaires tel que décrit dans (153). Les transformations de levures ont été faites avec la méthode au polyéthylène glycol (PEG)-acétate de lithium (154).

#### Plasmides et manipulations génétiques

*cnx1*<sup>+</sup> est exprimé sous le contrôle du promoteur répressible à la thiamine *nmt42* et du terminateur *nmt*. pREP42 est un vecteur d'expression multicopies chez *S. pombe* portant le marqueur *ura4* et l'origine de réplication *ars1* (52). pREP3X est un vecteur qui permet d'exprimer des gènes sous le contrôle du promoteur répressible à la thiamine *nmt* et du terminateur *nmt*. C'est un plasmide multicopie portant le marqueur de sélection *LEU2* et l'origine de réplication *ars1* (155). Le vecteur d'expression multicopie pLEV permet d'exprimer des gènes sous le contrôle du promoteur *adh1* et du terminateur de l'actine. Ce plasmide possède le marqueur de sélection *LEU2* et l'origine de réplication *ars1*. Les produits PCR ont été clonés dans le vecteur de clonage p-Drive selon les directives du fabricant (Qiagen). Les manipulations et analyses d'acides nucléiques ont été faites comme décrits précédemment (156).

#### Réaction de polymérase en chaîne

Les amplifications PCR ont été faites en utilisant la polymérase *Taq* ou la polymérase *Vent* selon les directives du fabricant (Amersham Biosciences; New England Biolabs), avec 100 ng d'ADN génomique de souches de *S. pombe* utilisées dans cette étude. Les séquences des gènes de *S. pombe* proviennent de (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/index.jsp>).

Le gène *pyk1* (nom systématique SPAC4H3.10c) a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides PKpLEVFor (AACTGCAGATGTCCTCTTCTGC) où le site PstI est

barré, et PKpLEVRev (CGGGATCCTTACTCGGCAAC) où le site *BamHI* est en gras. Le gène a été cloné dans le vecteur pDrive, puis sous-cloné *PstI-BamHI* dans le vecteur pLEV. Le gène *pgk1* (nom systématique SPBC14F5.04c) est amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides PGKpLEVFor (AACTGCAGATGTC TTTGTCTAC) et PGKpLEVRev (CGGGATCCTTACTTGGGAAGAAA), cloné dans le vecteur pDrive, puis sous-cloné *PstI-BamHI* dans le vecteur pLEV. Le gène *pfk1* (nom systématique SPBC16H5.02) a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides PFK1For (GAAGATCTTCCATATGAGTGGAGAACCG) où les sites *BglII* et *NdeI* sont respectivement en gras et souligné et PFK1Rev (GAAGATCTTAATCAGC AAAGGTCTTGCC) où le site *BglII* est en gras. Le gène a été cloné dans le vecteur pDrive, puis sous-cloné sur le vecteur pLEV à l'aide des sites *BglII* compatibles au site *BamHI* du plasmide. Le gène *gpd1* (nom systématique SPBC32F12.11) a été amplifié par PCR à l'aide des oligonucléotides Gpd1For (AACTGCAGATGGCAATTCCTAAGGTT) où le site *PstI* est barré, et Gpd1Rev (TTAGTTGTCCTTGGCGGCAGTGTA) où le site *StyI* est en gras. Le gène a été cloné dans le vecteur pDrive, puis sous-cloné *PstI-BamHI* (site présent sur le vecteur pDrive) dans le vecteur pLEV.

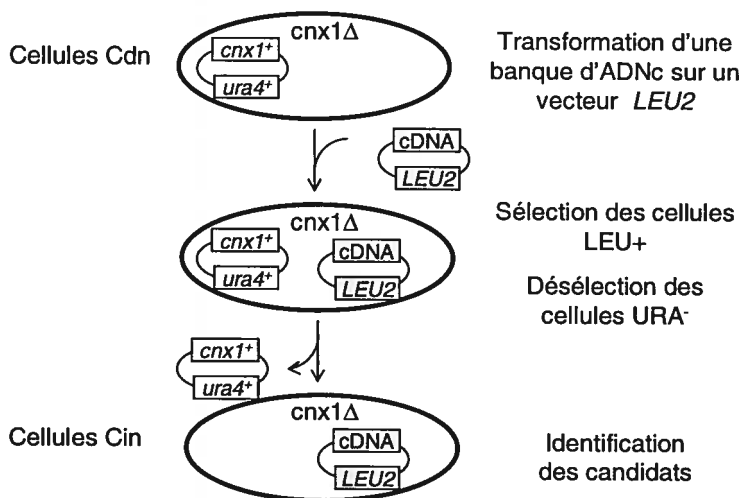
Le gène *mrfp1* est amplifié par PCR à partir du plasmide pRsetB-mrfp1 (un don de Roger Tsien, (157)) pour être sous-cloné sur le vecteur pREP3X *XhoI-BamHI*. Les oligonucléotides utilisés sont mRFP3For (CCGCTCGAGGTTTAAACATGGCCT CCTCCGAG) où le site de restriction *XhoI* est souligné et *PmeI* est en italique, et mRFP1Rev (CGGGATCCTTAGGCGCCGGTGGAGTG) où le site de restriction *BamHI* est en gras. L'amplification est faite par 35 cycles de 1 minute à 94° C, 1 minute à 50° C et 1 minute à 72° C. Pour la construction des protéines de fusion, le gène *mrfp1* (-ATG) est amplifié sans codon de départ, cloné dans le vecteur pDrive, puis sous-cloné *XhoI-BamHI* dans le vecteur pREP3X. Les oligonucléotides utilisés sont mRFP2For (CCGCTCGAGGTTTAAACGCCTCCTCCGA) où le site de restriction *XhoI* est souligné et *PmeI* est en italique, et mRFP1Rev. L'amplification est faite par 35 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 50°C et 1 minute à 72°C. Pour la construction de la fusion *pyk1mrfp1*, le gène *pyk1* est amplifié sans codon stop, cloné dans le vecteur pDrive, puis sous-cloné *XhoI-PmeI* dans le vecteur pREP3X*mrfp1* (-ATG). Les oligonucléotides utilisés sont

PKFor (CCGCTCGAGATGTCTCTTCTGCTGT) et PKfusion2Rev (AGTTTAAACACT CGGCAACGGTA) où le site *PmeI* est en italique. La même stratégie est utilisée pour la construction de la fusion *pgk1mrfp1*, où les oligonucléotides utilisés sont PGKFor (CCGCTCGAGATGTCTTGTCTACTAAGC) et PGKfusion2Rev (AGTTTAAACACTTG GAAGAAAGAGC). Les amplifications sont faites à l'aide de la polymérase *Vent* par 35 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 50°C et 2 minutes à 72°C.

### **Criblage génétique par surexpression**

Le criblage a été effectué à l'aide des banques d'ADN complémentaire *SpleI* et *SpleII*, qui sont construites sur le vecteur pLEV-3 (marqueur *LEU2*, un don de Dr. C.S. Hoffman) et pRep3X (marqueur *LEU2*, un don de Dr. C. Norbury) (Figure 15). Cinq µg d'ADN des banques sont transformés dans la souche Cdn SP6089 puis les levures sont sélectionnées pour leur prototrophie à la leucine en étalant les transformants sur un milieu solide MM–Leu. Les transformants sont ensuite soumis à un essai de perte plasmidique en milieu MM+Ura pour permettre la perte du plasmide pRep42*cnx1*<sup>+</sup>. Pour confirmer l'absence de calnexine, les cellules Ura- sont ensuite analysées par immunobuvardage western contre la calnexine/Cnx1p. Les plasmides des cellules Cin sont extraits, puis séquencés par le service de séquençage de l'Université Laval (<http://nucleus.rsvs.ulaval.ca:8000/seq-info.html>).





**Figure 15 Stratégie du criblage génétique de surexpression**

La souche de *S. pombe* SP6089 *LEU<sup>-</sup> Ura<sup>-</sup>* ayant la délétion génomique de la calnexine  $\Delta cnx1::His3^+$  complétée par un plasmide *ura4<sup>+</sup>-cnx1* est transformée avec les banques d'ADN complémentaire sur un vecteur *LEU2*. Les transformants sont sélectionnés, puis un essai de perte plasmidique en milieu riche en uracile permet d'identifier les cellules qui ont perdu le plasmide *ura4<sup>+</sup>* portant la calnexine. Les plasmides des cellules *Cin* sont ensuite extraits et séquencés afin d'identifier les gènes permettant l'induction du phénomène *Cin*.

### Essais de perte plasmidique

Les essais ont été faits tels que décrits dans (140). En bref, les souches de *S. pombe* portant un ou deux plasmides ont été cultivées 6 jours à 30°C dans 3mL de MM liquide supplémenté d'uracil (Ura) pour chasser le plasmide pREP42-*cnx1*<sup>+</sup> (marqueur *ura4*) et des autres nutriments tels qu'indiqué. Les cellules ont été étalées sur des milieux solides MM et MM+Ura additionnés des nutriments nécessaires. Les phénotypes pour les cellules auxotrophes à l'uracil ont été analysés après 5 jours d'incubation à 30°C et des analyses statistiques pour les pertes plasmidiques ont été calculées.

### Extraction des plasmides de levure

Les cellules provenant de 10 mL d'une culture en phase exponentielle ( $DO_{595\text{ nm}}=0,8-1$ ) sont récoltées, resuspendues dans un tampon de lyse contenant 50 mM citrate/phosphate, pH 5,6, 0,2 M sorbitol et 2 mg/mL Zymoloase-20T; puis incubées deux heures à 37°C. Les cellules sont récoltées et resuspendues dans 300 µL de tampon TE (10 mM Tris-Cl, pH 7,5, 1 mM EDTA). 35 µL d'une solution de sodium dodécylsulfate (SDS) 10% sont ajoutés, puis le mélange est incubé à 65°C pendant 10 minutes. 100 µL d'une solution d'acétate de potassium 5 M sont ajoutés au mélange et ce dernier est placé sur glace pendant 30 minutes. Le mélange est centrifugé pendant 10 minutes à 4°C. 250 µL de surnageant sont prélevés, auxquels sont ajoutés 400 µL d'une solution d'iodure de sodium (NaI) et 5 µL de billes de verre *glassmilk* provenant toutes deux de l'ensemble de GENE CLEAN (Q-Biogene). Ce mélange est incubé pendant 20 minutes à température ambiante et centrifugé 5 secondes. Le surnageant est jeté, puis le culot est lavé à trois reprises à l'aide de 400 µL de la solution *NEW wash* (Ensemble GENE CLEAN, Q-Biogene). Le culot est bien asséché. L'ADN est ensuite élué des billes à deux reprises à l'aide de 10 µL d'eau distillée, puis 5 µL de cette solution sont transformés dans des bactéries *E. coli* DH5α chimiocompétentes par choc thermique tel que décrit dans (156).

### Électrophorèse sur gel d'agarose en présence de SDS (SDS-age)

Les essais ont été faits tels que décrit dans (158). Brièvement, les cellules provenant de 100 mL d'une culture en phase exponentielle ( $DO_{595\text{ nm}}=0,8-1$ ) sont récoltées, lavées puis lysées en vortexant avec des billes de verre de 0,5 mm dans un tampon contenant 50 mM

Tris-HCl pH 7,5, 200 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% glycérol et 0,1% triton. Les débris sont enlevés du lysat par centrifugation 1 minute à 600 g à 4°C. L'agarose (1,5% M/V) est fondu dans un tampon 20 mM Tris, 200 mM glycine. Du SDS 10% est ajouté goutte à goutte jusqu'à une concentration finale de 0,1%, puis le gel est coulé dans un moule à électrophorèse d'ADN. Des échantillons de 20 µg de protéines doivent être incubés dans un tampon de chargement (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 5% glycérol, 2% SDS, 0,05% bleu de bromophénol) pendant 7 minutes à la température de la pièce avant d'être chargés sur le gel. Les échantillons sont séparés par électrophorèse horizontale à 110V dans un tampon contenant 20 mM Tris, 200 mM glycine, 0,1% SDS et transférés sous vide sur une membrane de nitrocellulose. La détection immunologique est faite à l'aide d'anticorps polyclonaux de lapin (notre laboratoire) dirigés contre la protéine Cif1p.

### **Microscopie confocale**

Les cellules vivantes ont été récoltées en phase exponentielle, lavées 2 fois dans 0,5 mL de tampon saline-phosphate 0,1M pH 7.4 (136 mM NaCl, 25 mM KCl, 12 mM NaHPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), resuspendues dans 100 µL PBS et analysées sous microscope confocal Olympus FV300. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel MetaMorph (Molecular Devices).

**Tableau I Souches de *Schizosaccharomyces pombe* utilisées dans cette étude**

Souche	Génotype	Source
SP248	h-, <i>his3-D1</i> , <i>ade6-M216</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4-D18</i>	(159)
SP6089 (Cdn)	SP248 $\Delta$ <i>cnx1</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> + pRep42 <i>cnx1</i> <sup>+</sup>	(52)
SP7188 (Cin $\Delta$ <i>hcd_cnx1</i> )	SP248 $\Delta$ <i>cnx1</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> [ <i>cif</i> ]	(140)
SP11566	SP248 $\Delta$ <i>cnx1</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> [ <i>cif</i> ] + pRep3X <i>cif1</i> (criblage)	cette étude
SP11568	SP248 $\Delta$ <i>cnx1</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> [ <i>cif</i> ] + pLEV <i>pyk1</i> (criblage)	cette étude
SP11569	SP248 $\Delta$ <i>cnx1</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> [ <i>cif</i> ] + pLEV <i>pgk1</i> (criblage)	cette étude
SP11574 (Cin <i>cif1</i> )	SP248 $\Delta$ <i>cnx1</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> [ <i>cif</i> ] + pRep3X <i>cif1</i> (retransformant)	cette étude
SP11580 (Cin <i>pyk1</i> )	SP248 $\Delta$ <i>cnx1</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> [ <i>cif</i> ] + pLEV <i>pyk1</i> (retransformant)	cette étude
SP11583 (Cin <i>pgk1</i> )	SP248 $\Delta$ <i>cnx1</i> :: <i>his3</i> <sup>+</sup> [ <i>cif</i> ] + pLEV <i>pgk1</i> (retransformant)	cette étude
SP11663	SP6089 + pLEV	cette étude
SP11691	SP6089 + pLEV <i>pfk1</i>	cette étude
SP11693	SP6089 + pLEV <i>gpd1</i>	cette étude
SP7913	SP6089 + pLEV <i>pyk1</i>	cette étude
SP7910	SP6089 + pLEV <i>pgk1</i>	cette étude
SP11734	SP6089 + pRep3X <i>mrfp1</i>	cette étude
SP11742	SP6089 + pRep3X <i>pyk1-mrfp1</i>	cette étude
SP11745	SP6089 + pRep3X <i>pgk1-mrfp1</i>	cette étude
SP11754	SP7188 + pRep3X <i>pyk1-mrfp1</i>	cette étude
SP11757	SP7188 + pRep3X <i>pgk1-mrfp1</i>	cette étude

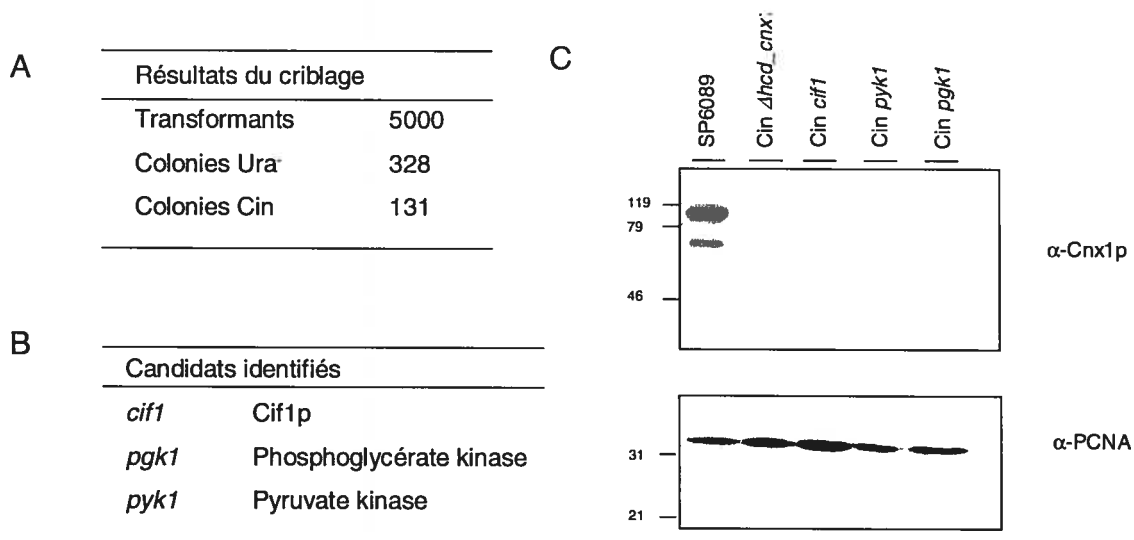
### 3.4 Résultats

Afin d'identifier les éléments impliqués dans la voie Cin, un criblage génétique a été conçu à partir de la prémisse suivante : la surexpression de n'importe quel élément d'une voie devrait permettre de créer un contournement dans cette voie et l'activer (148). Ainsi, un criblage de surexpression a été effectué par la transformation de banques d'ADNc dans les cellules de *S. pombe* ayant une délétion génomique de la calnexine suppléée d'une copie de la calnexine sur un plasmide *ura4<sup>+</sup>* (détails dans la section Matériel et méthodes, Figure 15, p.84). Un essai de ségrégation plasmidique a permis de sélectionner les transformants dans lesquels la voie Cin a été activée, qui ont perdu le plasmide portant la calnexine et qui possèdent un phénotype *Ura<sup>-</sup>*. Les faux positifs ont été éliminés en vérifiant l'absence de calnexine par immunobuvardage western puisqu'il est possible que le gène *cnx1<sup>+</sup>* ait été présent dans les banques d'ADNc ou qu'il y ait eu intégration du plasmide. Par la suite, les plasmides ont été extraits des cellules Cin et séquencés pour identifier les gènes responsables de l'état Cin.

### 3.4.1 Un criblage génétique lie *pyk1* et *pgk1* à l'état Cin

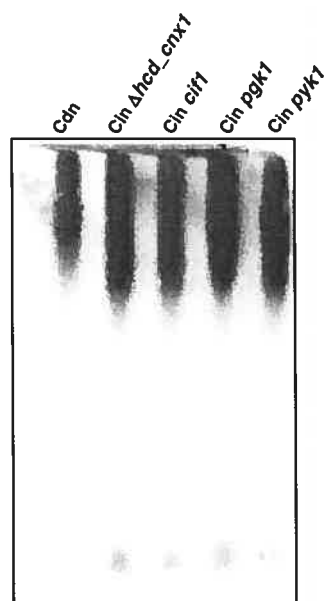
Le criblage d'environ 5000 transformants a permis d'identifier 328 colonies Ura<sup>-</sup> (Figure 16A). Suite à l'élimination des faux-positifs par immunobuvardage western, 131 colonies identifiées ne contenaient pas de calnexine. Quelques gènes ont ensuite été identifiés comme responsables du phénomène Cin suite à leur surexpression; il s'agit des gènes *cif1*, le gène codant pour une protéine prion potentiel (nos résultats non publiés), *pyk1*, le gène codant pour la pyruvate kinase/Pyk1p et *pgk1*, le gène codant pour la phosphoglycérate kinase/Pgk1p (Figure 16B). L'enzyme pyruvate kinase catalyse la dernière réaction de la glycolyse, durant laquelle le groupement phosphoryl du phosphoénolpyruvate est transféré à l'ADP pour former du pyruvate et de l'ATP. Cette enzyme est activée par le fructose-1,6-biphosphate (FBP) chez les eucaryotes alors que chez les procaryotes, elle est activée par les sucres monophosphorylés. Chez *S. pombe*, Pyk1p adopte une structure quaternaire prédominante de dimère alors qu'elle adopte généralement une forme de tétramère. Son activité nécessite la présence des ions K<sup>+</sup> et Mg<sup>+</sup> et est activée par le FBP (160). L'enzyme Pgk1p catalyse la conversion du 1,3-biphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate en produisant une molécule d'ATP à partir d'une molécule d'ADP. L'enzyme Pgk1p n'est pas caractérisée chez *S. pombe*, mais son rôle est inféré par homologie.

Pour vérifier si l'induction de l'état Cin était bien liée aux gènes identifiés, ces plasmides ont été retransformés dans une souche naïve et un essai de perte plasmidique a permis de confirmer l'induction du phénomène par la perte de la calnexine. Un immunobuvardage western dirigé contre la calnexine démontre que toutes ces souches ne contiennent effectivement pas de calnexine (Figure 16C). Ainsi, la surexpression de deux gènes codant pour des protéines glycolytiques entraîne l'apparition de l'état Cin. Il est donc intéressant d'explorer plus loin cette voie puisqu'à première vue, il n'y a pas de lien entre le métabolisme et le repliement des protéines.



**Figure 16 Résultats du criblage génétique**

A) Résumé du criblage. B) Candidats identifiés. Les souches sont Cin *cif* SP11566, Cin *pgk1* SP11569, Cin *pyk1* SP11568. C) Confirmation du phénotype Cin. Les plasmides contenant les gènes identifiés sont retransformés dans une souche naïve. Les transformants sont soumis à un essai de perte plasmidique. La détection de la calnexine/Cnx1p permet de confirmer l'état Cin dans plusieurs souches différentes. Brièvement, 50 µg d'extraits protéiques ont été séparés sur un gel SDS-12% acrylamide, transférés sur une membrane de nitrocellulose, puis analysés par immunobuvardage avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-calnexine/Cnx1p. La même membrane a été déshybridée, puis réhybridée avec des anticorps monoclonaux de souris anti-PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Les souches utilisées sont SP6089, Cin *Δhcd\_cnx1* SP7188, Cin *cif1* SP11574, Cin *pyk1* SP11580, Cin *pgk1* SP11583.



**Figure 17 Analyse de la protéine prion Cif1p**

20  $\mu$ g d'extrait cellulaires sont séparés sur un gel SDS-1,5% agarose, transférés sur une membrane de nitrocellulose, puis analysés par immunobuvardage avec des anticorps polyclonaux de lapin anti-Cif1p. Les souches utilisées sont Cdn SP6089, Cin  $\Delta hcd\_cnx1$  SP7188, Cin *cif1* SP11574, Cin *pgk1* SP11583, Cin *pyk1* SP11580.

### 3.4.2 Implication d'un prion dans la voie

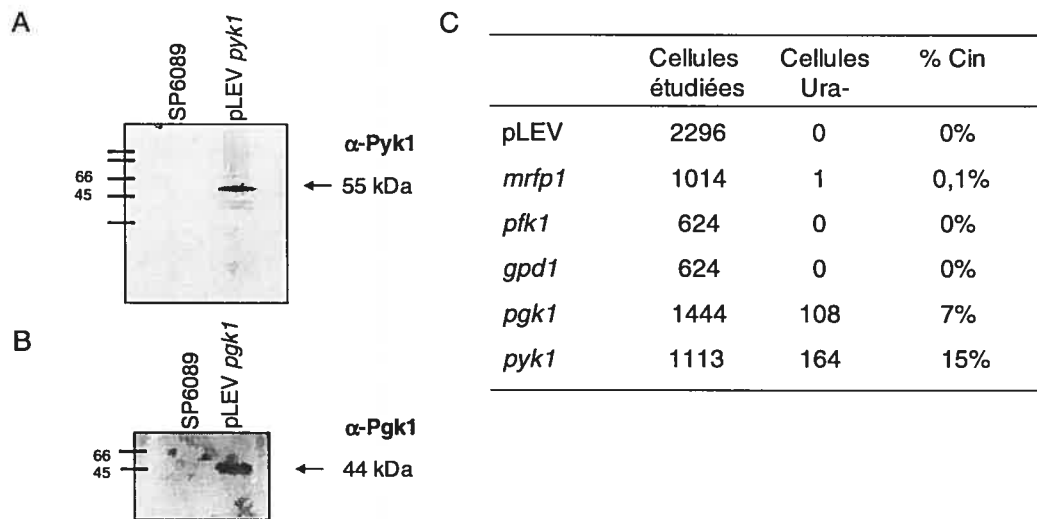
Pour débiter, il était intéressant de vérifier si les gènes glycolytiques *pyk1* et *pgk1* agissent dans la même voie d'induction de l'état Cin que la surexpression du gène *cif1*. Or, un essai d'électrophorèse sur gel SDS-agarose suivi d'un immunobuvardage contre la protéine Cif1p permet de voir une différence nette entre la conformation de la protéine Cif1p entre les Cin et Cdn (nos résultats non publiés). Ainsi, si l'induction de l'état Cin passe par la protéine Cif1p, on peut émettre l'hypothèse qu'elle changera de conformation à condition que l'induction se fasse en amont de cette dernière. On peut remarquer à la Figure 17 que les cellules Cin provenant de la surexpression des gènes *pyk1* et *pgk1* présentent les mêmes bandes que les cellules Cin induites par le mutant de délétion  $\Delta hcd\_cnx1$  ainsi que celles induites par la surexpression de *cif1*. Ce résultat suggère que Cif1p adopte la même conformation dans les cellules Cin induites par la surexpression d'enzymes glycolytiques que dans les autres types de cellules Cin et que, par extension, l'induction se ferait dans la même voie en amont de Cif1p.



### 3.4.3 Implication métabolique

Il est justifié de se demander s'il existe un lien entre le métabolisme et l'état Cin. Dans ce cas, la voie glycolytique serait impliquée dans l'induction de l'état Cin. Dans le cas contraire, seules les protéines Pyk1p et Pfk1p seraient impliquées, soit par leur rôle glycolytique, soit par un autre rôle qui n'est pas encore caractérisé. Les enzymes métaboliques ont longtemps été considérées comme des protéines de ménage servant uniquement à l'entretien de la cellule, mais les enzymes phosphoglucose isomérase, aldolase et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ont récemment été impliqués dans plusieurs processus cellulaires différents (161). Par exemple, l'enzyme GAPDH humaine, qui catalyse la conversion du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate, a été identifiée comme une protéine qui lie l'ADN et l'ARN, stimule la transcription de l'ADN polymérase II chez *Xenopus laevis*, sert de cofacteur à l'ADN polymérase dans les fibroblastes humains, agit dans la réparation de l'ADN en tant que uracil-DNA glycosylase et augmente de trois fois l'épissage des introns de groupe II *in vitro* (162-165). Comme plusieurs fonctions peuvent être associées à une même protéine, il serait donc possible que des fonctions différentes associées aux protéines Pyk1p et Pfk1p soient la cause de l'état Cin.

Pour étudier l'implication de la voie métabolique dans l'induction de l'état Cin, les gènes *pyk1* et *pfk1* ont été clonés et surexprimés dans des levures comportant la délétion génomique de la calnexine complémentée par un plasmide exprimant la calnexine. Un immunobuvardage western montre que ces protéines sont bien surexprimées (Figure 18A,B). Les gènes *pfk1* et *gpd1/tdh1* codant respectivement pour les enzymes glycolytiques phosphofructokinase (Pfk1p) et glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) ont également été clonés et surexprimés sous le même promoteur. Pfk1p est une kinase qui phosphoryle le fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate. De plus, Pfk1p est une enzyme clé dans la régulation du flux glycolytique tant chez les procaryotes que chez les eucaryotes, tout comme la Pyk1p. Finalement, cette enzyme catalyse également une réaction irréversible (166).



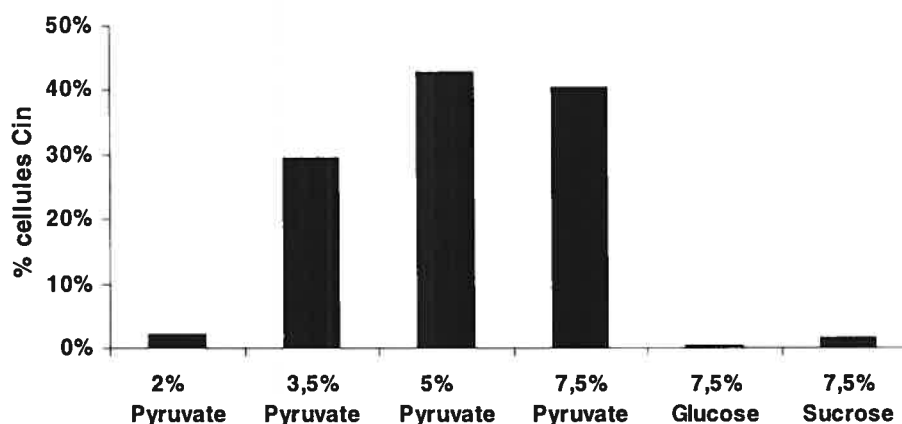
### Figure 18 Implication de la glycolyse dans l'état Cin

Quantification des enzymes surexprimées. 20  $\mu$ g d'extraits cellulaires sont séparés sur un gel SDS- 10% polyacrylamide et analysés par immunobuvardage avec des anticorps polyclonaux de chèvre A) anti-Pyk1p (Chemicon) et B) anti-Pgk1 (Santa Cruz). C) Analyse de ségrégation plasmidique. Les cellules sont cultivées 6 jours dans un milieu non sélectif pour le plasmide portant la calnexine, puis sont étalées sur des milieux non-sélectif et sélectif et analysées pour leur auxotrophie à l'uracile. Les souches utilisées sont SP6089, pLEV SP11663, *mrfp1* SP11734, *pfk1* SP11691, *gpd1* SP11693, *pgk1* SP7910 *pyk1* SP7913.

L'enzyme GAPDH catalyse la réaction du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,2-biphosphoglycérate. C'est une des trois enzymes dont la réaction produit de l'énergie, avec la Pyk1p et la Pck1p (166). GAPDH a également été sélectionnée pour l'abondance de ses rôles non glycolytiques décrits précédemment. Étonnamment, la GAPDH a été retrouvée associée à des plaques de fibres amyloïdes dans le cas de la maladie d'Alzheimer (167). Des essais de perte pour le plasmide calnexine ont été tentés avec ces souches. La surexpression des gènes *pgk1* et *pyk1* induit le phénomène Cin à une fréquence de 7% et de 15% respectivement, alors que la surexpression des gènes *pfk1* et *gpd1* ne cause pas la perte du plasmide calnexine (Figure 18). Par ailleurs, la surexpression du gène codant pour la protéine hétérologue mRFP (protéine fluorescente rouge monomérique) de *Discosoma* n'induit pas le phénomène Cin, indiquant que ce n'est pas le fait de surexprimer un gène mais bien la surexpression spécifique de certains gènes qui cause l'état Cin. Ceci indique que ce ne sont pas tous les gènes glycolytiques qui sont impliqués dans l'induction du phénomène.

Dans une voie, l'augmentation du niveau d'un élément peut influencer le niveau de tous les autres. Ainsi, la présence de l'état Cin pourrait faire varier le niveau des protéines causant son apparition. Les protéines Pyk1p et Pck1p ont été quantifiées par immunobuvardage western contre le contrôle interne PCNA dans les états Cdn et Cin, mais aucune différence significative n'a été observée entre les souches (résultats non présentés).

Il était ensuite intéressant de vérifier si le pyruvate, le produit de Pyk1p, possède aussi l'action inductrice de l'état Cin. Des essais de ségrégation plasmidique ont été effectués avec des concentrations croissantes de 2% à 7,5% de pyruvate, ce qui a pour effet d'induire l'état Cin dans des proportions croissantes (Figure 19). Cet effet n'est pas causé par une augmentation de la pression osmotique sur les cellules puisque l'addition d'une concentration équivalente de glucose ou de sucrose n'induit pas l'état Cin de façon significative. Tous ces essais ont été effectués en présence de 2% glucose comme source de carbone. Puisque le glucose ne semble pas avoir d'effet, on peut conclure que l'effet mesuré est bien causé par le pyruvate.



**Figure 19 Effets de métabolites sur l'induction de l'état Cin**

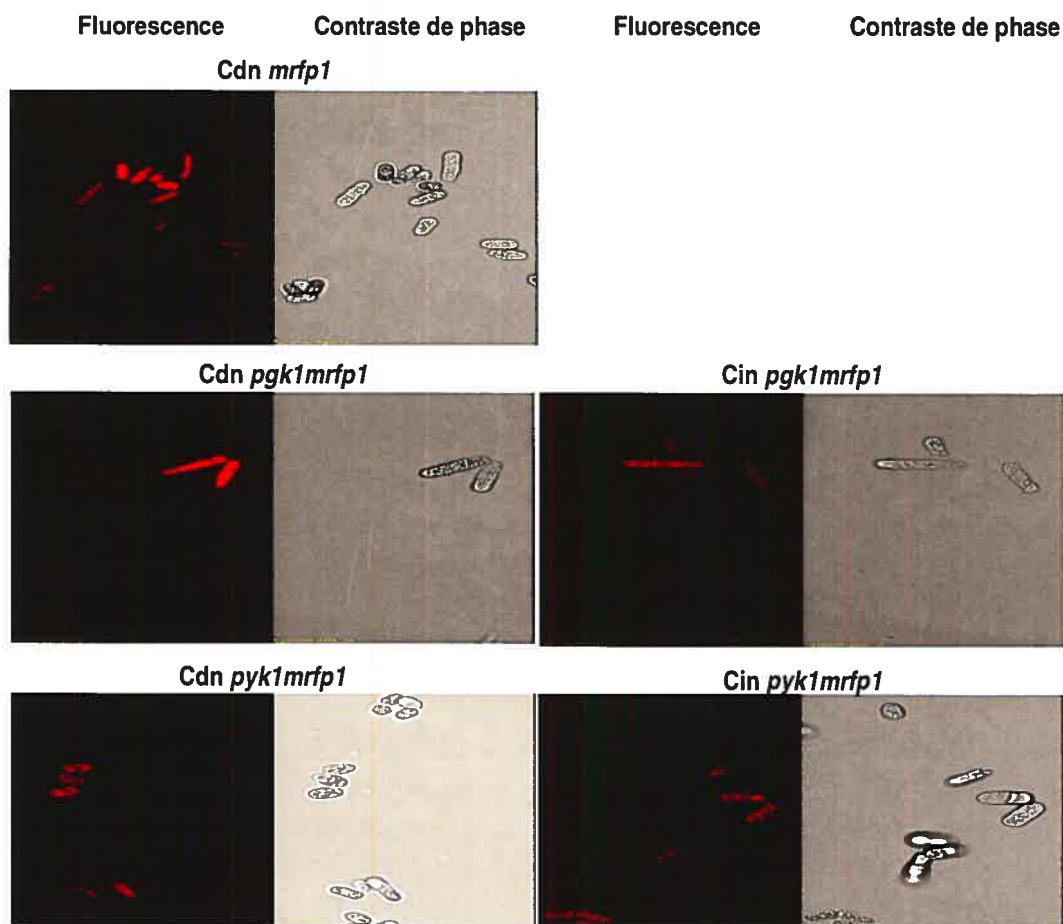
Des essais de perte plasmidique pour *pcnx1*<sup>+</sup> sont effectués avec la souche SP6089 dans un milieu MM+Ura supplémenté de 2% glucose et de concentrations indiquées de pyruvate, de glucose ou de sucrose.

Pour vérifier si la présence de glucose est nécessaire à l'induction du phénomène, la culture de *S. pombe* en présence de sources de carbone non-fermentables comme le pyruvate, le lactate et l'acétate a été tentée sans succès. Toutefois, on savait que *S. pombe* utilise principalement le glucose et ses dérivés dimériques et trimériques comme source de carbone (168). Le glucose est transformé en pyruvate par les enzymes glycolytiques. En phase exponentielle, la forme d'énergie principalement utilisée chez *S. pombe* est la fermentation du pyruvate en éthanol via les enzymes pyruvate décarboxylase et alcool déshydrogénase. Par contre, en phase stationnaire, l'énergie provient principalement de la respiration et de la phosphorylation oxydative. Dans ce cas, le pyruvate est transformé en acétyl-coenzyme A et entre dans le cycle de Krebs pour produire de l'énergie (169). Comme les essais d'induction de l'état Cin sont effectués sur des levures en croissance exponentielle, il était intéressant de vérifier si le produit final de la fermentation, l'éthanol, induisait également l'état Cin. Ainsi, selon des résultats préliminaires, la croissance de *S. pombe* en présence de 0,5% d'éthanol n'induit pas de cellules Cin (Tableau II, p.99).

Certaines protéines comme la phosphoglucose isomérase exercent des fonctions différentes en des localisations distinctes (161). Les protéines Pgl1p et Pyk1p sont toutes deux localisées dans le cytosol, mais des molécules de Pgl1p ont également été retrouvées dans le noyau chez *S. pombe* (170). Il était donc intéressant de vérifier si les enzymes Pgl1p et Pyk1p présentaient une localisation particulière dans les cellules Cin. Pour ce faire, des fusions avec la protéine fluorescente rouge de *Discosoma* mRFP ont été construites et exprimées dans des cellules Cdn et Cin provenant du mutant  $\Delta hcd\_cnx1$ . Des études de microscopie confocale montrent que les deux protéines de fusion sont localisées dans le cytoplasme dans les deux états. Il n'y a donc pas de différence significative dans la localisation de Pgl1p et de Pyk1p entre les états Cdn et Cin (Figure 20). Toutefois, une localisation similaire n'exclut pas que ces enzymes puissent exercer une fonction alternative.

#### **3.4.4 Les conditions de stress n'induisent pas l'état Cin**

Notre laboratoire a récemment caractérisé la souche Cin face à des stress tels que la croissance à une température élevée, le choc thermique et les stress de repliement des protéines. Il était donc intéressant de vérifier l'effet inductif de ces différents stress qui affectent à différents degrés les cellules Cin. La croissance à 37°C des cellules Cin est légèrement plus faible que celle des cellules Cdn. Les cellules Cin sont également plus sensibles au stress thermique à 50°C et le prétraitement à une température intermédiaire de 37°C permet d'augmenter la résistance au stress thermique (152). De plus, chez *S. pombe* le stress thermique cause une augmentation du niveau du gène inducteur *pgk1* (171). Par contre, ni la croissance à 37°C, ni un choc thermique n'ont permis la perte du plasmide *pcnx1*<sup>+</sup> et par extension l'apparition de l'état Cin selon nos résultats préliminaires (Tableau II, p.99).



**Figure 20 Localisation de P<sub>gk1p</sub> et de P<sub>yk1p</sub>**

Microscopie confocale sur des cellules vivantes prises en phase exponentielle. Des protéines de fusion avec la protéine fluorescente rouge monomérique (mRFP1) de *Discosoma* permet de visualiser la pyruvate kinase et la phosphoglycérate kinase. Les souches utilisées sont dérivées de SP6089 pour les souches Cdn et de SP7188 pour les souches Cin. Ces souches sont Cdn *mrfp1* (SP11734), Cdn *pgk1mrfp1* (SP11745), Cdn *pyk1mrfp1* (SP11742), Cin *pgk1mrfp1* (SP11757), Cin *pyk1mrfp1* (SP11754).

La calnexine étant une chaperone moléculaire, des traitements affectant le repliement des protéines ont été effectués sur les cellules Cin. Ces dernières résistent aussi bien que des cellules Cdn à des traitements affectant le repliement des protéines tels que 5% éthanol et 1 mM DTT (152) et encore une fois de tels traitements n'ont pas entraîné la perte du plasmide *pcnx1*<sup>+</sup>.

On sait que l'ajout du stabilisateur osmotique sorbitol résorbe le phénotype de retard de croissance à une température élevée des cellules Cin. Il était donc intéressant de vérifier si la croissance en condition de stress osmotique causait l'état Cin, surtout que la présence de concentrations élevées de glucose ou de sucrose n'a pas eu d'influence sur le phénomène. Par ailleurs, le gène *pgk1* a été identifié comme un suppresseur multicopie de la sensibilité osmotique du mutant *hos2Δ* de *S. pombe* (172). Mais des essais préliminaires de perte plasmidique en présence d'osmolytes tels que le sorbitol, le chlorure de potassium (KCl), le tréhalose ou le PEG n'ont pas permis la perte du plasmide *pcnx1*<sup>+</sup>. Finalement, la présence des oxydants paraquat et peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) n'ont pas induit l'état Cin. Ces résultats indiquent qu'il n'y aurait pas de lien entre ces voies de réponses au stress et l'induction de l'état Cin.

**Tableau II Essais de perte plasmidique de la souche SP6089 dans des conditions de stress**

Stress		Cellules	Cin	% Cin
Thermique	MM	1248	0	0.0%
	37°C	104	0	0.0%
	6 h 37°C	208	0	0.0%
	24h 37°C	207	0	0.0%
	1 h 50°C	208	1	0.5%
Repliement des protéines	0,5% EtOH	154	0	0.0%
	1 mM DTT	54	0	0.0%
Osmotique	1,2 M Sorbitol	99	0	0.0%
	0,7 M KCl	185	0	0.0%
	4% Tréhalose	198	0	0.0%
	10% PEG	174	0	0.0%
Oxydatif	10 µM Paraquat	204	0	0.0%
	100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	162	0	0.0%

Les cellules sont cultivées 6 jours dans un milieu non sélectif pour le plasmide *pcnx1*<sup>+</sup> (MM+Ura) supplémenté de 2% glucose et des produits chimiques indiqués. La culture est effectuée à 30°C, sauf indication contraire, pour les temps indiqués.



## **4. Discussion**

Notre laboratoire a décrit pour la première fois un phénomène permettant la viabilité en l'absence de la protéine essentielle calnexine/Cnx1p chez *Schizosaccharomyces pombe*. Certaines caractéristiques de l'état calnexine indépendant correspondent aux caractéristiques des prions de levure, ce qui a permis l'élaboration d'un modèle où le changement de conformation d'un prion permettrait l'activation d'une voie alternative remplaçant la fonction essentielle de la calnexine (140). Afin d'approfondir les connaissances sur l'état calnexine indépendant, l'état Cin a été caractérisé en comparaison avec une souche sauvage (WT) ainsi que les mutants de délétion *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1* qui sont tout deux dépourvus de l'activité chaperone (83). Une souche Cin dans laquelle la calnexine a été réintroduite sur un plasmide permet de voir les effets de la complémentation de la calnexine à l'état Cin.

#### **4.1 La calnexine/Cnx1 est impliquée dans la synthèse de la paroi cellulaire.**

Il a été démontré que les cellules Cin sont plus petites que les cellules sauvages ou les mutants de délétion *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1* et qu'à 30°C, elles arborent une morphologie aberrante, plus ronde ou en forme de poire qui n'est pas retrouvée chez les autres mutants. Ce phénotype suggère fortement des défauts de la paroi cellulaire, ce qui est corroboré par une plus grande sensibilité aux stress de la paroi cellulaire tels que le Calcofluor white, l'hygromycine B, la caféine et le SDS. Comme *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1* encodent des protéines qui n'ont pas d'activité chaperone *in vitro*, il semble que la fonction chaperone de la calnexine/Cnx1p ne soit pas absolument nécessaire à la biosynthèse de la paroi cellulaire à 30°C. La morphologie altérée et la sensibilité de la paroi des cellules Cin ont été compensées par la réintroduction d'une copie plasmidique de *cnx1*<sup>+</sup>. D'une part, ceci indique que c'est bien l'absence de calnexine et non la voie compensatoire activée par l'état Cin qui cause la sensibilité de la paroi cellulaire. D'autre part, ces observations suggèrent un rôle pour la molécule calnexine/Cnx1p dans l'intégrité de la paroi cellulaire de *S. pombe* qui serait différente de sa fonction chaperone et qui pourrait résider dans ses interactions avec les autres composantes du mécanisme de contrôle de qualité du RE tels que Erp57 et Sec61b (50, 89).

Par ailleurs, l'implication de la machinerie de contrôle de qualité du RE dans la biosynthèse de la paroi cellulaire a déjà été documentée (173). Chez *S. cerevisiae* par exemple, la chaperone du RE Kar2p/BiP et les protéines du contrôle de qualité glucosidase I (*CWH41*) et glucosidase II (*GLS2*) sont nécessaires à la formation d'une paroi cellulaire fonctionnelle, mais pas pour la sécrétion efficace des protéines (80). Chez *S. pombe*, la délétion génomique de la protéine senseur du contrôle de qualité UGGT cause des défauts de la paroi cellulaire (99). De plus, il a été démontré que la calnexine/Cnx1p de la levure *S. pombe* interagit fonctionnellement avec l'UGGT, les glucosidases I et II, en plus de former un complexe avec BiP *in vivo* (48, 52, 55). L'interaction avec BiP implique les 52 résidus de la calnexine/Cnx1p encodés par les deux mutants *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1* mutants (52, 83). Puisque aucune interaction entre la calnexine/Cnx1p et BiP n'a pu être observée *in vitro*, il a été proposé qu'*in vivo*, ce domaine de la calnexine pourrait agir comme échafaudage à un complexe protéique incluant BiP (52, 83). Il est donc tentant de spéculer que les souches *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1* démontrent une plus faible sensibilité face aux stress de la paroi, par rapport aux cellules Cin, parce que les calnexines mutantes encodées sont engagées dans des interactions via la région de 52 résidus avec les autres composantes de la machinerie de repliement/contrôle de qualité, qui sont importantes pour l'intégrité de la paroi cellulaire.

#### **4.2 La calnexine/Cnx1p n'est pas essentielle à la résistance aux stress de repliement des protéines**

La calnexine étant impliquée dans divers processus du repliement des protéines, il était donc intéressant d'investiguer si l'absence de calnexine/Cnx1p pourrait mener à une plus grande sensibilité aux stress de repliement des protéines. Or, les cellules Cin ne sont pas plus sensibles à des stress de DTT et d'EtOH que les mutants *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1*. Ces phénotypes suggèrent que la quantité totale de chaperones et de protéines accessoires dans les cellules Cin est suffisante pour faire face aux protéines dépliées ou mal repliées engendrées par le traitement au DTT ou EtOH en l'absence de calnexine/Cnx1p. Cette absence de sensibilité face aux stress du repliement des protéines est corrélée avec

l'absence de détection de l'induction du UPR dans ces cellules. Ces résultats concordent avec des observations faites dans la souche de *S. cerevisiae*  $\Delta cne1$  et dans des cellules mammifères MEF  $\Delta$ calnexine dans lesquelles le UPR n'est pas induit en l'absence de calnexine (76, 82). Toutefois, des résultats contradictoires ont été observés dans une souche NKR sans calnexine (75).

### 4.3 La calnexine permet le repliement de certaines protéines sécrétées

La calnexine est impliquée dans le repliement correct des protéines sécrétées (82, 83). Expérimentalement, la sécrétion des protéines peut être modulée en altérant la machinerie de repliement et de contrôle de qualité du RE, mais les effets observés varient selon les substrats. Par exemple, chez la levure *S. cerevisiae*, la délétion de l'homologue de la calnexine *CNE1* n'altère pas le niveau de sécrétion de protéines non-glycosylées, mais affecte différemment le niveau de sécrétion de deux protéines glycosylées (82). Chez *S. pombe*, l'étude de plusieurs mutants de délétion de *cnx1* dépourvus de fonction chaperone a résulté en l'augmentation du niveau de sécrétion de quelques protéines (83). Les résultats présentés dans cette étude montrent que l'absence de calnexine/Cnx1p n'influence pas le niveau de sécrétion de la protéine non-glycosylée HSA, alors qu'elle mène à une augmentation considérable de la sécrétion de la protéine glycosylée cellulase, même si les deux protéines modèles sont connues pour lier de façon transitoire la calnexine/Cnx1p *in vivo* (83). Des analyses plus poussées de la cellulase sécrétée par les cellules Cin révèlent un ratio activité/quantité de protéines de beaucoup inférieur au niveau WT, indiquant une baisse d'efficacité du contrôle de qualité du repliement de cette glycoprotéine. Ces observations suggèrent qu'en plus de jouer un rôle général dans le repliement des protéines et dans le contrôle de qualité, la calnexine/Cnx1p pourrait jouer un rôle plus important dans le repliement de protéines spécifiques. Cette hypothèse est supportée par les observations que les cellules Cin et les souches exprimant les mutants de délétion de la calnexine ne montrent pas une induction significative du UPR et ne sont pas affectées particulièrement par des stress de repliement des protéines. À cause de la grande sensibilité de la paroi cellulaire exhibée par les cellules Cin, il est raisonnable d'assumer

que la calnexine/Cnx1p serait impliquée directement ou indirectement dans la biosynthèse de certaines protéines de la paroi.

#### 4.5 La calnexine et le stress thermique

La réponse au choc thermique et la sensibilité thermique impliquent deux voies de réponse distinctes chez la levure (174). Dans la réponse primaire suite à un choc thermique, l'expression de nombreux gènes (hsp), incluant les chaperones moléculaires, augmente de façon significative afin d'aider la cellule à récupérer du stress thermique et cette réponse est différente de la voie nécessaire pour tolérer la culture prolongée à une température élevée (175). Dans cette veine, la calnexine/Cnx1p semble jouer un rôle dans la réponse au stress thermique puisque les cellules Cin montrent une sensibilité plus élevée que les cellules exprimant les mutants *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1*. Ceci indique également que la voie remplaçant la fonction essentielle de la calnexine/Cnx1p dans les cellules Cin ne procure pas une protection efficace contre le choc thermique. Puisque le rôle de la calnexine/Cnx1p dans la réponse au choc thermique est accomplie par les mutants *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1*, qui n'ont pas d'activité chaperone, ces observations suggèrent que cette fonction de la calnexine réside en des interactions avec d'autres composantes de la machinerie de repliement des protéines, comme BiP. D'un autre côté, la voie remplaçant la fonction essentielle de la calnexine/Cnx1p dans les cellules Cin confère assez de résistance pour permettre la croissance à 37°C et la résistance aux stress de repliement des protéines.

#### 4.6 La calnexine liée à l'apoptose

Chez *S. pombe*, la présence d'un processus de mort programmée similaire à l'apoptose dans les cellules mammifères a été étudié en examinant les effets de l'expression, dans cette levure, des protéines humaines de la famille de Bcl-2 : Bax, Bak et Bcl-XL (176). L'expression de la protéine pro-apoptotique Bak est létale pour *S. pombe* et ce phénotype est renversé par la co-expression des protéines anti-apoptotique Bcl-XL ou Bcl-2. De

plus, un criblage deux-hybrides cherchant des partenaires létaux de Bak chez *S. pombe* a identifié la calnexine/Cnx1p comme un partenaire essentiel pour la létalité associée à Bak (177). Depuis, la caractérisation du programme apoptotique de *S. pombe* continue et le gène codant pour la métacaspase Pca1 a récemment été cloné (178). Sur la base de l'implication potentielle de la calnexine/Cnx1p dans le processus apoptotique, il était intéressant d'analyser l'induction de l'activité des caspases dans les cellules Cin puisque ces dernières sont en mesure de survivre en l'absence de calnexine/Cnx1p. L'utilisation d'un marqueur fluorescent en phase exponentielle a révélé que toutes les souches présentent le même niveau d'activation des caspases que la souche sauvage.

Par contre, après quatre jours en phase stationnaire, une activation plus importante est observée pour les mutants de *cnx1* et la souche Cin comparativement à la souche sauvage. À cause des implications possibles de la calnexine/Cnx1p dans la signalisation de l'apoptose, il serait possible que les protéines mutantes encodées par *mini\_cnx1* et *Δhcd\_cnx1* provoquent une augmentation de l'activation des caspases. De plus, les cellules Cin présentent un haut niveau de caspases activées qui pourrait être dû à l'absence de la calnexine. Ceci ne semble pas être le cas, puisque la réintroduction d'une copie plasmidique de *cnx1*<sup>+</sup> dans la souche Cin ne rétablit pas le niveau basal de caspases activées, indiquant que l'état Cin lui-même pourrait être impliqué dans l'induction de la cascade apoptotique. Même si la protéine encodée par le mutant *Δhcd\_cnx1* comporte une plus petite délétion de résidus que le mutant *mini\_cnx1*, la souche *Δhcd\_cnx1* a un niveau d'activation des caspases significativement plus élevé que la souche *mini\_cnx1* ou la souche Cin. Ce niveau plus élevé pourrait résulter de l'addition des signaux provenant de la présence dans la même cellule d'une forme de calnexine et de la voie Cin activée. En effet, comme il a déjà été mentionné, seul le mutant *Δhcd\_cnx1* induit l'état Cin alors que *mini\_cnx1* et les autres mutants de *cnx1* ne le font pas (140). Nos résultats sont donc consistants avec la notion que la calnexine/Cnx1p pourrait avoir un rôle dans la signalisation de l'apoptose chez *S. pombe*.

#### 4.7 Deux gènes glycolytiques causent l'apparition de l'état Cin

La caractérisation phénotypique des cellules Cin a permis de déterminer que ce ne sont pas toutes les fonctions de la calnexine qui sont remplacées par l'état Cin. Pour obtenir plus d'informations sur le phénomène de viabilité en l'absence de la chaperone essentielle calnexine/Cnx1p chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, il était intéressant de commencer à caractériser la voie menant à l'état Cin. Pour ce faire, un criblage génétique de surexpression pour identifier les éléments pouvant induire l'état Cin chez *S. pombe* a permis d'identifier les gènes candidats codant pour la phosphoglycérate kinase et la pyruvate kinase, des protéines qui ont tout d'abord été caractérisées pour leur implication dans la glycolyse. Le phénotype d'induction de l'état Cin est bien lié à ces gènes, puisque ceux-ci ont été clonés, surexprimés dans la levure et induisent toujours l'état Cin. La spécificité de l'effet a été confirmée par l'absence d'induction du phénomène Cin par la surexpression des gènes *pfk1*, *gpd1* et *mrfp1*.

#### 4.8 *pgk1* et *pyk1* agiraient en amont de *cif1*

Il a été proposé que l'état Cin soit médié par un prion, une protéine qui peut adopter une conformation alternative et infectieuse (140). Des résultats préliminaires montrent que la protéine prion Cif1p adopte deux conformations différentes sur gel SDS-agarose entre les cellules Cin et Cdn. Or, les cellules Cin engendrées par les gènes *pyk1* et *pgk1* présentent un phénotype similaire sur gel à celui des cellules Cin provenant du mutant  $\Delta hcd\_cnx1$  ou encore de la surexpression de *cif1*, mais différent de celui des cellules Cdn. On peut donc supposer que la conformation de la protéine Cif1p est la même dans toutes les cellules Cin et que Cif1p soit dans sa conformation prion. Pour vérifier si Cif1p adopte bien une conformation infectieuse dans ces nouvelles souches Cin, des essais de transformations d'extraits protéiques suivis de perte plasmidique pour le plasmide *cnx1*<sup>+</sup> devront être effectués. En se basant sur le fait que des extraits protéiques provenant de cellules Cin peuvent induire l'état Cin alors que des extraits protéiques de cellules Cdn ne l'induisent

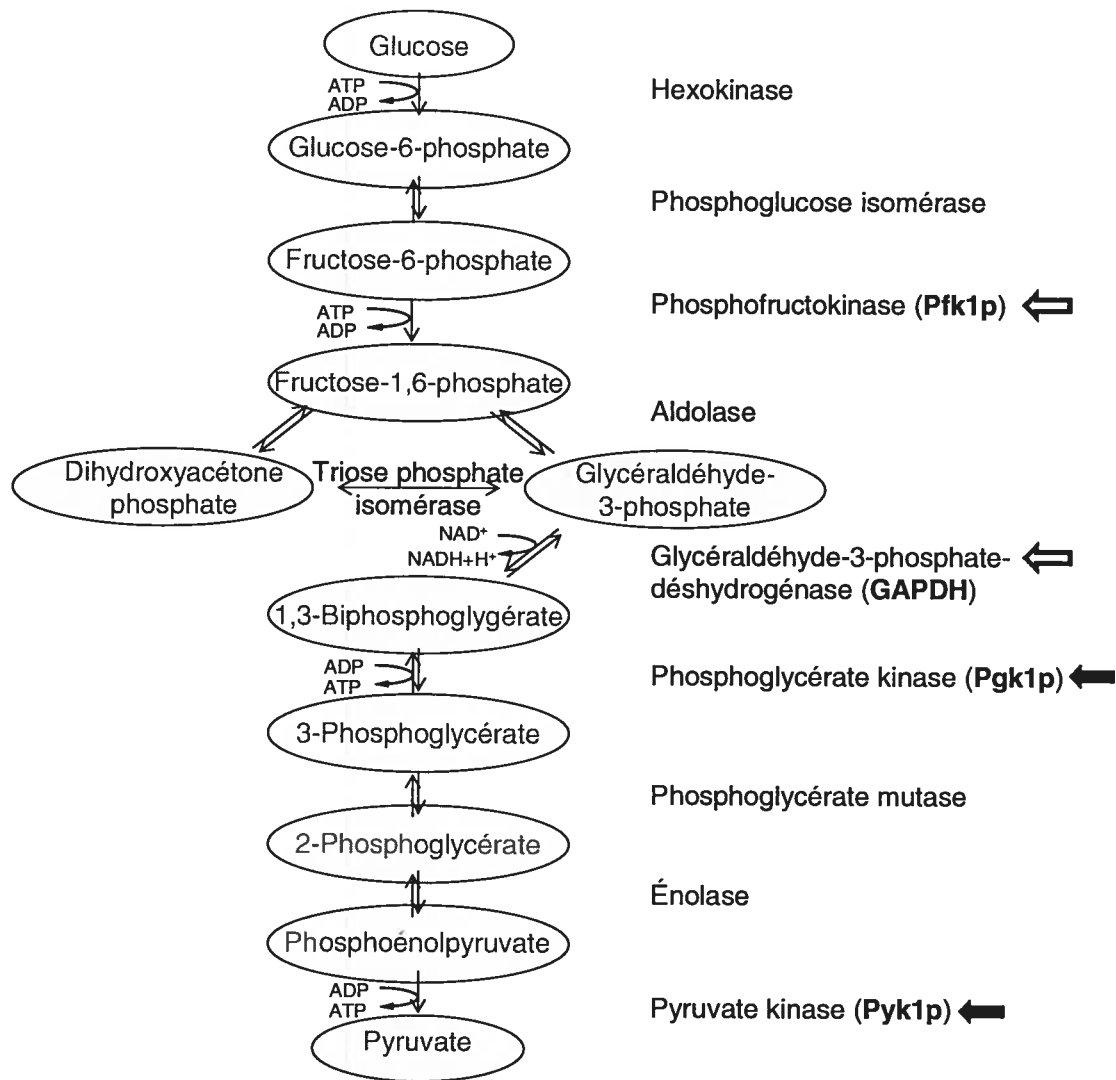
pas (140), on pourra confirmer que la conformation de la protéine Cif1p est la même dans toutes les souches Cin.

Cependant, il ne faut pas négliger la possibilité qu'un rétrocontrôle dans la voie d'induction de l'état Cin puisse induire un changement conformationnel de Cif1p et causer son avance sur gel même si la voie est activée en aval du prion. Pour confirmer que l'induction par les enzymes glycolytiques se fait bel et bien en amont du changement conformationnel du prion, des essais d'induction pourraient être effectués dans des cellules  $\Delta cif1$ . S'il n'y a pas d'induction, on pourra alors conclure que l'induction se fait en amont du prion et que ce dernier est nécessaire à la voie. Par contre, s'il y a toujours apparition de l'état Cin, alors on pourra conclure que l'induction se fait en aval de *cif1* et que le déplacement de la bande sur le gel SDS-agarose était causé par un rétro-contrôle ou encore que l'induction passe par une seconde voie.

#### 4.9 Un rôle métabolique pour *pgk1* et *pyk1*

Le rôle de la voie glycolytique dans l'induction de l'état Cin a été étudié suite à l'implication des gènes *pyk1* et *pgk1*. L'état Cin n'est pas induit par la surexpression des gènes *pfk1* et *gpd1*; ceci indique que ce ne sont pas tous les gènes de cette voie métabolique qui sont impliqués et que l'action des gènes *pyk1* et *pgk1* serait plus ciblée. Cependant, il faut noter que les gènes *pfk1* et *gpd1* sont situés en amont des gènes *pgk1* et *pyk1* dans la voie glycolytique (Figure 21). Il est possible que la fin de la voie glycolytique soit impliquée dans l'activation de l'état Cin. Pour infirmer cette hypothèse, il faudrait surexprimer une enzyme située entre *pgk1* et *pyk1*, ainsi qu'une enzyme située en aval de *pyk1* comme une enzyme de la fermentation telle que la pyruvate décarboxylase ou une enzyme menant à l'acétyl-CoA et au cycle de Krebs telle que la pyruvate déshydrogénase, puis vérifier son effet sur l'induction de la voie Cin par un essai de perte plasmidique pour la calnexine (166). Finalement, il serait important de vérifier que les protéines Pfk1p et GAPDH sont bien surexprimées par immunobuvardage western.





**Figure 21 Dégradation du glucose par la voie de la glycolyse**

La molécule de glucose est phosphorylée à deux reprises, puis scindée en deux molécules du triose glycéraldéhyde-3-phosphate qui sont ensuite transformés en pyruvate. L'apport énergétique de la glycolyse est de 2 ATP pour 1 molécule de glucose. Les enzymes nécessaires à chacune des réactions sont identifiées à la droite de chacune d'elles. Les flèches noires indiquent les enzymes identifiées lors du criblage génétique et les flèches blanches, les enzymes utilisées comme contrôle. Adapté de (166).

La pyruvate kinase est une enzyme unidirectionnelle qui est vue comme une enzyme limitante qui contrôle le flux de la seconde partie de la glycolyse (179). On pourrait penser que sa surexpression entraînerait une augmentation du flux et que cette augmentation serait responsable de l'induction de l'état Cin. Par contre, il a été démontré chez la levure *S. cerevisiae* que la surexpression de *PFK1/2* ou de *PYK1* n'a pas d'effet sur le flux métabolique, mais qu'une diminution de l'expression de *PYK1* diminuait ce flux (179). Un second groupe a confirmé que le flux glycolytique de la levure n'était pas modifié par la surexpression de ces enzymes, en plus des enzymes hexokinase, PGK, phosphoglycérate mutase, pyruvate décarboxylase ou alcool déshydrogénase (180). Il est donc peu probable que l'induction de l'état Cin suite à la surexpression des gènes *pyk1* et *pgk1* ait lieu via une augmentation du flux glycolytique. On peut donc penser que l'effet activateur dans la voie Cin des gènes *pyk1* et *pgk1* serait spécifique aux protéines encodées par ces gènes.

#### 4.10 Un rôle alternatif pour Pgc1p et Pyk1p

Certaines enzymes glycolytiques ont été impliquées dans des divers processus cellulaires en plus de leurs fonctions métaboliques (161). La phosphoglucose isomérase est une enzyme cytosolique qui catalyse l'interconversion du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate, mais qui dans le milieu extracellulaire est à la fois un facteur de croissance neuronal, une cytokine qui fait murer les cellules B en cellules productrices d'anticorps, une cytokine qui stimule la migration cellulaire (AMF, *autocrine motility factor*), ou encore un facteur de différenciation dans les cellules myéloïdes leucémiques humaines (DMM, *differentiation and maturation mediator*) (161). Chez *S. cerevisiae*, il a également été démontré que l'aldolase est nécessaire à l'assemblage et à l'activité de la pompe à proton  $H^+$ -ATPase de la vacuole (181). En plus de ses propriétés de liaison aux acides nucléiques décrites précédemment, la GAPDH peut phosphoryler le récepteur GABA<sub>A</sub> dans les neurones et dans le muscle de lapin (182, 183). Chez le cobaye, la GAPDH est associée au canal  $K^+$  ATP-dépendant du muscle sarcoplasmique cardiaque et permet sa régulation glucose-dépendante par la production de 1,3-biphosphoglycérate, une

molécule permettant l'ouverture du canal de façon indépendante de l'ATP (184). La GAPDH est également nécessaire au transport du RE au golgi pour les vésicules RAB2 et elle peut moduler le cytosquelette, promouvoir la fusion des vésicules (185) et est nécessaire à l'endocytose dans les cellules CHO (186). Comme plusieurs fonctions peuvent être associées à une même protéine, il serait donc possible que des fonctions différentes associées aux protéines Pyp1p et Ppk1p soient la cause de l'état Cin.

Des fonctions supplémentaires ont également été associées à la phosphoglycérate kinase. Elle a été identifiée comme une protéine liant l'ADN suite au fractionnement des protéines de reconnaissance des amorces de l'ADN polymérase alpha des cellules HeLa (187). Ainsi, PGK servirait de cofacteur à la DNA polymérase et pourrait être impliquée dans la réplication du brin retardé. Des essais *in vivo* dans des cellules HeLa démontrent que la synthèse d'ADN est réduite lorsque le niveau de PGK est diminué par RNAi (188). Comme la PGK est partiellement localisée au noyau, il est possible que cette association avec l'ADN ait un impact biologique. Il a également été démontré que la surexpression de *PGK1* humain cause un phénotype de résistance à de multiples drogues anticancer (189) et que la PGK phosphoryle et active *in vivo* un nouveau type d'agents antiviraux et anticancer, les analogues de L-nucléosides (190). Donc, il est possible qu'un rôle supplémentaire soit associé à Ppk1p dans l'induction de l'état Cin. Bien que jusqu'à maintenant de nouveaux rôles n'aient pas été identifiés pour la pyruvate kinase, il est possible qu'une fonction supplémentaire de la pyruvate kinase cause l'état Cin.

#### 4.11 Impact des métabolites

Afin de vérifier si l'implication de l'enzyme pyruvate kinase était directe, l'impact de son produit le pyruvate a été étudié. Nos résultats démontrent qu'une concentration croissante de pyruvate a un pouvoir inductif croissant, alors que ni le glucose ni le sucrose n'ont d'effets significatifs à concentration identique. L'effet inductif observé pour le pyruvate n'est donc pas dû à une plus haute pression osmotique, ni à une plus grande quantité de carbone disponible, mais bien à une propriété du pyruvate. Le pyruvate est situé au carrefour des voies métaboliques de la fermentation et de la respiration, il pourrait donc

avoir un effet sur la voie empruntée pour produire l'énergie dans la cellule. Cependant, ces résultats ne permettent pas de discriminer si l'effet de la surexpression de *pyk1* qui induit l'état Cin est causé par une action de la protéine Pyk1p ou par une augmentation de la concentration du pyruvate qui serait active.

La calnexine semble liée au processus de signalisation apoptotique chez *S. pombe*. Nos résultats ont révélé une plus grande activation des caspases dans les cellules Cin que dans les cellules Cdn et que cette activation n'est pas compensée par la réintroduction d'une copie plasmidique de la calnexine, indiquant une possible implication de l'état Cin dans le déclenchement du processus apoptotique. Plusieurs études ont démontré que le pyruvate aide à réduire le stress oxydatif par son action rédox et à prévenir l'apoptose dans plusieurs types cellulaires. Par exemple, un apport en pyruvate module les fonctions mitochondriales hépatiques et réduit les indicateurs d'apoptose lors du choc hémorragique chez le rat (191). Il prévient les changements morphogéniques et apoptotiques dans la cataracte de la souris diabétique (192) et l'apoptose causée par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans les cellules endothéliales humaines, mais les agents redox L-lactate, acétate ou aminooxyacétate n'ont pas cet effet protecteur (193). Le pyruvate protège également les cellules endothéliales des artères pulmonaires bovines (PBAEC) de la cytotoxicité engendrée par l'inhibition de l'import du glucose via le 2-déoxyglucose (194). De plus, la surexpression du gène codant pour la pyruvate kinase est possiblement impliquée dans l'acquisition de la tolérance au stress hypoxique dans les cellules gliales (195). Il serait ainsi possible que l'implication du pyruvate soit de minimiser l'impact de l'activation de l'état Cin sur le processus apoptotique et ainsi préserver la viabilité des cellules qui entrent dans l'état Cin.

## Références

- (1) Voeltz, G. K., Rolls, M. M., and Rapoport, T. A. (2002) Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep* 3, 944-50.
- (2) Swanton, E., and Bulleid, N. J. (2003) Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Membr Biol* 20, 99-104.
- (3) Watson, P., and Stephens, D. J. (2005) ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochim Biophys Acta* 1744, 304-15.
- (4) Tang, B. L., Wang, Y., Ong, Y. S., and Hong, W. (2005) COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* 1744, 293-303.
- (5) Reynaud, E. G., and Simpson, J. C. (2002) Navigating the secretory pathway: conference on exocytosis membrane structure and dynamics. *EMBO Rep* 3, 828-33.
- (6) Helenius, A., and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-9.
- (7) Osborne, A. R., Rapoport, T. A., and van den Berg, B. (2005) Protein Translocation by the Sec61/Secy Channel. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 529-550.
- (8) 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, 925-34.
- (9) 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, 887-94.
- (10) Laird, V., and High, S. (1997) Discrete cross-linking products identified during membrane protein biosynthesis. *J Biol Chem* 272, 1983-9.
- (11) Hamman, B. D., Chen, J. C., Johnson, E. E., and Johnson, A. E. (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* 89, 535-44.
- (12) Egea, P. F., Stroud, R. M., and Walter, P. (2005) Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr Opin Struct Biol* 15, 213-20.
- (13) Stirling, C. J. (1999) Protein targeting to the endoplasmic reticulum in yeast. 1997 Fleming Lecture. *Microbiology* 145 ( Pt 5), 991-8.
- (14) Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K., and Rapoport, T. A. (1999) BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* 97, 553-64.
- (15) Helenius, A., and Aebi, M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73, 1019-49.
- (16) Burda, P., and Aebi, M. (1998) The ALG10 locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the alpha-1,2 glucosyltransferase of the endoplasmic reticulum: the terminal glucose of the lipid-linked oligosaccharide is required for efficient N-linked glycosylation. *Glycobiology* 8, 455-62.
- (17) Spiro, R. G. (2000) Glucose residues as key determinants in the biosynthesis and quality control of glycoproteins with N-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* 275, 35657-60.

- (18) Jones, J., Krag, S. S., and Betenbaugh, M. J. (2005) Controlling N-linked glycan site occupancy. *Biochim Biophys Acta* 1726, 121-37.
- (19) Imperiali, B., and O'Connor, S. E. (1999) Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure. *Curr Opin Chem Biol* 3, 643-9.
- (20) Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., and Wormald, M. R. (2004) Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* 14, 103-14.
- (21) O'Connor, S. E., and Imperiali, B. (1996) Modulation of protein structure and function by asparagine-linked glycosylation. *Chem Biol* 3, 803-12.
- (22) Fewell, S. W., Travers, K. J., Weissman, J. S., and Brodsky, J. L. (2001) The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* 35, 149-91.
- (23) Jessop, C. E., Chakravarthi, S., Watkins, R. H., and Bulleid, N. J. (2004) Oxidative protein folding in the mammalian endoplasmic reticulum. *Biochem Soc Trans* 32, 655-8.
- (24) Freedman, R. B., Klappa, P., and Ruddock, L. W. (2002) Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains. *EMBO Rep* 3, 136-40.
- (25) Ferrari, D. M., and Soling, H. D. (1999) The protein disulphide-isomerase family: unravelling a string of folds. *Biochem J* 339 ( Pt 1), 1-10.
- (26) Kettner, K., Blomberg, A., and Rodel, G. (2004) Schizosaccharomyces pombe ER oxidoreductin-like proteins SpEro1a p and SpEro1b p. *Yeast* 21, 1035-44.
- (27) Kim, S. J., Choi, Y. S., Kim, H. G., Park, E. H., and Lim, C. J. (2006) Cloning, characterization and regulation of a protein disulfide isomerase from the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Mol Biol Rep* 33, 187-96.
- (28) Shaw, P. E. (2002) Peptidyl-prolyl isomerases: a new twist to transcription. *EMBO Rep* 3, 521-6.
- (29) Crenshaw, D. G., Yang, J., Means, A. R., and Kornbluth, S. (1998) The mitotic peptidyl-prolyl isomerase, Pin1, interacts with Cdc25 and Plx1. *Embo J* 17, 1315-27.
- (30) Levenson, J. D., and Ness, S. A. (1998) Point mutations in v-Myb disrupt a cyclophilin-catalyzed negative regulatory mechanism. *Mol Cell* 1, 203-11.
- (31) Gething, M. J. (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10, 465-72.
- (32) Bole, D. G., Hendershot, L. M., and Kearney, J. F. (1986) Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecreting and secreting hybridomas. *J Cell Biol* 102, 1558-66.
- (33) Gething, M. J., McCammon, K., and Sambrook, J. (1986) Expression of wild-type and mutant forms of influenza hemagglutinin: the role of folding in intracellular transport. *Cell* 46, 939-50.
- (34) Simon, S. M., Peskin, C. S., and Oster, G. F. (1992) What drives the translocation of proteins? *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 3770-4.
- (35) Glick, B. S. (1995) Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell* 80, 11-4.
- (36) Brodsky, J. L., Werner, E. D., Dubas, M. E., Goeckeler, J. L., Kruse, K. B., and McCracken, A. A. (1999) The requirement for molecular chaperones during

- endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem* 274, 3453-60.
- (37) Hamman, B. D., Hendershot, L. M., and Johnson, A. E. (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, 747-58.
- (38) Alder, N. N., Shen, Y., Brodsky, J. L., Hendershot, L. M., and Johnson, A. E. (2005) The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 168, 389-99.
- (39) Pidoux, A. L., and Armstrong, J. (1992) Analysis of the BiP gene and identification of an ER retention signal in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo J* 11, 1583-91.
- (40) Pidoux, A. L., and Armstrong, J. (1993) The BiP protein and the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe*: fate of the nuclear envelope during cell division. *J Cell Sci* 105 ( Pt 4), 1115-20.
- (41) Wada, I., Rindress, D., Cameron, P. H., Ou, W. J., Doherty, J. J., 2nd, Louvard, D., Bell, A. W., Dignard, D., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J. (1991) SSR alpha and associated calnexin are major calcium binding proteins of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 266, 19599-610.
- (42) Wada, I., Imai, S., Kai, M., Sakane, F., and Kanoh, H. (1995) Chaperone function of calreticulin when expressed in the endoplasmic reticulum as the membrane-anchored and soluble forms. *J Biol Chem* 270, 20298-304.
- (43) Tjoelker, L. W., Seyfried, C. E., Eddy, R. L., Jr., Byers, M. G., Shows, T. B., Calderon, J., Schreiber, R. B., and Gray, P. W. (1994) Human, mouse, and rat calnexin cDNA cloning: identification of potential calcium binding motifs and gene localization to human chromosome 5. *Biochemistry* 33, 3229-36.
- (44) Fuller, J. R., Pitzer, J. E., Godwin, U., Albertino, M., Machon, B. D., Kearse, K. P., and McConnell, T. J. (2004) Characterization of the molecular chaperone calnexin in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and its association with MHC class II molecules. *Dev Comp Immunol* 28, 603-17.
- (45) Christodoulou, S., Lockyer, A. E., Foster, J. M., Hoheisel, J. D., and Roberts, D. B. (1997) Nucleotide sequence of a *Drosophila melanogaster* cDNA encoding a calnexin homologue. *Gene* 191, 143-8.
- (46) Huang, L., Franklin, A. E., and Hoffman, N. E. (1993) Primary structure and characterization of an *Arabidopsis thaliana* calnexin-like protein. *J Biol Chem* 268, 6560-6.
- (47) Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (1995) *Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. *J Biol Chem* 270, 244-53.
- (48) Jannatipour, M., and Rokeach, L. A. (1995) The *Schizosaccharomyces pombe* homologue of the chaperone calnexin is essential for viability. *J Biol Chem* 270, 4845-53.
- (49) Parlati, F., Dignard, D., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (1995) The calnexin homologue *cnx1+* in *Schizosaccharomyces pombe*, is an essential gene which can be complemented by its soluble ER domain. *Embo J* 14, 3064-72.

- (50) 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, 4947-56.
- (51) Wang, H., Entwistle, J., Morlon, E., Archer, D. B., Peberdy, J. F., Ward, M., and Jeenes, D. J. (2003) Isolation and characterisation of a calnexin homologue, clxA, from *Aspergillus niger*. *Mol Genet Genomics* 268, 684-91.
- (52) Elagoz, A., Callejo, M., Armstrong, J., and Rokeach, L. A. (1999) Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *J Cell Sci* 112 ( Pt 23), 4449-60.
- (53) Schrag, J. D., Bergeron, J. J., Li, Y., Borisova, S., Hahn, M., Thomas, D. Y., and Cygler, M. (2001) The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell* 8, 633-44.
- (54) Baksh, S., and Michalak, M. (1991) Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca<sup>2+</sup> binding domains. *J Biol Chem* 266, 21458-65.
- (55) Ellgaard, L., and Frickel, E. M. (2003) Calnexin, calreticulin, and ERp57: teammates in glycoprotein folding. *Cell Biochem Biophys* 39, 223-47.
- (56) Chevet, E., Wong, H. N., Gerber, D., Cochet, C., Fazel, A., Cameron, P. H., Gushue, J. N., Thomas, D. Y., and Bergeron, J. J. (1999) Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes. *Embo J* 18, 3655-66.
- (57) Vassilakos, A., Michalak, M., Lehrman, M. A., and Williams, D. B. (1998) Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry* 37, 3480-90.
- (58) Elbein, A. D. (1983) Inhibitors of glycoprotein synthesis. *Methods Enzymol* 98, 135-54.
- (59) Cannon, K. S., Hebert, D. N., and Helenius, A. (1996) Glycan-dependent and -independent association of vesicular stomatitis virus G protein with calnexin. *J Biol Chem* 271, 14280-4.
- (60) Swanton, E., High, S., and Woodman, P. (2003) Role of calnexin in the glycan-independent quality control of proteolipid protein. *Embo J* 22, 2948-58.
- (61) Rajagopalan, S., Xu, Y., and Brenner, M. B. (1994) Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* 263, 387-90.
- (62) Kim, P. S., and Arvan, P. (1995) Calnexin and BiP act as sequential molecular chaperones during thyroglobulin folding in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 128, 29-38.
- (63) Arunachalam, B., and Cresswell, P. (1995) Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin. *J Biol Chem* 270, 2784-90.
- (64) Carreno, B. M., Schreiber, K. L., McKean, D. J., Stroynowski, I., and Hansen, T. H. (1995) Aglycosylated and phosphatidylinositol-anchored MHC class I molecules are associated with calnexin. Evidence implicating the class I-connecting peptide segment in calnexin association. *J Immunol* 154, 5173-80.
- (65) Loo, T. W., and Clarke, D. M. (1994) Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *J Biol Chem* 269, 28683-9.
- (66) [http://biochem17.med.utoronto.ca/~david\\_williams/lab/chaperone.html](http://biochem17.med.utoronto.ca/~david_williams/lab/chaperone.html).



- (67) Williams, D. B. (2006) Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 119, 615-23.
- (68) Hammond, C., Braakman, I., and Helenius, A. (1994) Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 913-7.
- (69) Keller, S. H., Lindstrom, J., and Taylor, P. (1998) Inhibition of glucose trimming with castanospermine reduces calnexin association and promotes proteasome degradation of the alpha-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 273, 17064-72.
- (70) Pipe, S. W., Morris, J. A., Shah, J., and Kaufman, R. J. (1998) Differential interaction of coagulation factor VIII and factor V with protein chaperones calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 273, 8537-44.
- (71) Denzel, A., Molinari, M., Trigueros, C., Martin, J. E., Velmurgan, S., Brown, S., Stamp, G., and Owen, M. J. (2002) Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression. *Mol Cell Biol* 22, 7398-404.
- (72) Mesaeli, N., Nakamura, K., Zvaritch, E., Dickie, P., Dziak, E., Krause, K. H., Opas, M., MacLennan, D. H., and Michalak, M. (1999) Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol* 144, 857-68.
- (73) Scott, J. E., and Dawson, J. R. (1995) MHC class I expression and transport in a calnexin-deficient cell line. *J Immunol* 155, 143-8.
- (74) Prasad, S. A., Yewdell, J. W., Porgador, A., Sadasivan, B., Cresswell, P., and Bennink, J. R. (1998) Calnexin expression does not enhance the generation of MHC class I-peptide complexes. *Eur J Immunol* 28, 907-13.
- (75) Zuppini, A., Groenendyk, J., Cormack, L. A., Shore, G., Opas, M., Bleackley, R. C., and Michalak, M. (2002) Calnexin deficiency and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Biochemistry* 41, 2850-8.
- (76) Pieren, M., Galli, C., Denzel, A., and Molinari, M. (2005) The use of calnexin and calreticulin by cellular and viral glycoproteins. *J Biol Chem* 280, 28265-71.
- (77) Knee, R., Ahsan, I., Mesaeli, N., Kaufman, R. J., and Michalak, M. (2003) Compromised calnexin function in calreticulin-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 661-6.
- (78) Xu, X., Kanbara, K., Azakami, H., and Kato, A. (2004) Expression and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cnelp, a calnexin homologue. *J Biochem (Tokyo)* 135, 615-8.
- (79) Xu, X., Azakami, H., and Kato, A. (2004) P-domain and lectin site are involved in the chaperone function of *Saccharomyces cerevisiae* calnexin homologue. *FEBS Lett* 570, 155-60.
- (80) Simons, J. F., Ebersold, M., and Helenius, A. (1998) Cell wall 1,6-beta-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* depends on ER glucosidases I and II, and the molecular chaperone BiP/Kar2p. *Embo J* 17, 396-405.
- (81) Arima, H., Kinoshita, T., Ibrahim, H. R., Azakami, H., and Kato, A. (1998) Enhanced secretion of hydrophobic peptide fused lysozyme by the introduction of N-glycosylation signal and the disruption of calnexin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440, 89-92.

- (82) Song, Y., Azakami, H., Shamima, B., He, J., and Kato, A. (2002) Different effects of calnexin deletion in *Saccharomyces cerevisiae* on the secretion of two glycosylated amyloidogenic lysozymes. *FEBS Lett* 512, 213-7.
- (83) Marechal, A., Tanguay, P. L., Callejo, M., Guerin, R., Boileau, G., and Rokeach, L. A. (2004) Cell viability and secretion of active proteins in *Schizosaccharomyces pombe* do not require the chaperone function of calnexin. *Biochem J* 380, 441-8.
- (84) Zapun, A., Darby, N. J., Tessier, D. C., Michalak, M., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (1998) Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem* 273, 6009-12.
- (85) Oliver, J. D., Roderick, H. L., Llewellyn, D. H., and High, S. (1999) ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* 10, 2573-82.
- (86) Daniels, R., Kurowski, B., Johnson, A. E., and Hebert, D. N. (2003) N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol Cell* 11, 79-90.
- (87) Corbett, E. F., Oikawa, K., Francois, P., Tessier, D. C., Kay, C., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y., Krause, K. H., and Michalak, M. (1999) Ca<sup>2+</sup> regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem* 274, 6203-11.
- (88) Frickel, E. M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wuthrich, K., and Ellgaard, L. (2002) TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1954-9.
- (89) Pollock, S., Kozlov, G., Pelletier, M. F., Trempe, J. F., Jansen, G., Sitnikov, D., Bergeron, J. J., Gehring, K., Ekiel, I., and Thomas, D. Y. (2004) Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system. *Embo J* 23, 1020-9.
- (90) Silvennoinen, L., Myllyharju, J., Ruoppolo, M., Orru, S., Caterino, M., Kivirikko, K. I., and Koivunen, P. (2004) Identification and characterization of structural domains of human ERp57: association with calreticulin requires several domains. *J Biol Chem* 279, 13607-15.
- (91) Kimura, T., Hosoda, Y., Sato, Y., Kitamura, Y., Ikeda, T., Horibe, T., and Kikuchi, M. (2005) Interactions among yeast protein-disulfide isomerase proteins and endoplasmic reticulum chaperone proteins influence their activities. *J Biol Chem* 280, 31438-41.
- (92) Camacho, P., and Lechleiter, J. D. (1995) Calreticulin inhibits repetitive intracellular Ca<sup>2+</sup> waves. *Cell* 82, 765-71.
- (93) Roderick, H. L., Lechleiter, J. D., and Camacho, P. (2000) Cytosolic phosphorylation of calnexin controls intracellular Ca(2+) oscillations via an interaction with SERCA2b. *J Cell Biol* 149, 1235-48.
- (94) Li, Y., and Camacho, P. (2004) Ca<sup>2+</sup>-dependent redox modulation of SERCA 2b by ERp57. *J Cell Biol* 164, 35-46.
- (95) Trombetta, E. S., and Parodi, A. J. (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 649-76.
- (96) Taylor, S. C., Thibault, P., Tessier, D. C., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (2003) Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein:glucosyltransferase. *EMBO Rep* 4, 405-11.

- (97) Taylor, S. C., Ferguson, A. D., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (2004) The ER protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein-glucosyltransferase modifies substrates distant to local changes in glycoprotein conformation. *Nat Struct Mol Biol* 11, 128-34.
- (98) Caramelo, J. J., Castro, O. A., Alonso, L. G., De Prat-Gay, G., and Parodi, A. J. (2003) UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase recognizes structured and solvent accessible hydrophobic patches in molten globule-like folding intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 86-91.
- (99) Fanchiotti, S., Fernandez, F., D'Alessio, C., and Parodi, A. J. (1998) The UDP-Glc:Glycoprotein glucosyltransferase is essential for *Schizosaccharomyces pombe* viability under conditions of extreme endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biol* 143, 625-35.
- (100) Jakob, C. A., Burda, P., Roth, J., and Aebi, M. (1998) Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* 142, 1223-33.
- (101) Jakob, C. A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y., and Aebi, M. (2001) Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* 2, 423-30.
- (102) Movsichoff, F., Castro, O. A., and Parodi, A. J. (2005) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* ER alpha-mannosidase: a reevaluation of the role of the enzyme on ER-associated degradation. *Mol Biol Cell* 16, 4714-24.
- (103) Kabani, M., Kelley, S. S., Morrow, M. W., Montgomery, D. L., Sivendran, R., Rose, M. D., Gierasch, L. M., and Brodsky, J. L. (2003) Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol Biol Cell* 14, 3437-48.
- (104) Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A., and Herzog, V. (2000) Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol* 148, 1203-12.
- (105) Chen, Y., Le Caherec, F., and Chuck, S. L. (1998) Calnexin and other factors that alter translocation affect the rapid binding of ubiquitin to apoB in the Sec61 complex. *J Biol Chem* 273, 11887-94.
- (106) Bebok, Z., Mazzochi, C., King, S. A., Hong, J. S., and Sorscher, E. J. (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, 29873-8.
- (107) Fiebigler, E., Story, C., Ploegh, H. L., and Tortorella, D. (2002) Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein. *Embo J* 21, 1041-53.
- (108) Tirosch, B., Furman, M. H., Tortorella, D., and Ploegh, H. L. (2003) Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J Biol Chem* 278, 6664-72.
- (109) Lilley, B. N., and Ploegh, H. L. (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834-40.
- (110) Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., and Rapoport, T. A. (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429, 841-7.

- (111) Pickart, C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-33.
- (112) Voges, D., Zwickl, P., and Baumeister, W. (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem* 68, 1015-68.
- (113) Romisch, K. (2005) Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 435-56.
- (114) Shen, X., Zhang, K., and Kaufman, R. J. (2004) The unfolded protein response--a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat* 28, 79-92.
- (115) Mori, K., Sant, A., Kohno, K., Normington, K., Gething, M. J., and Sambrook, J. F. (1992) A 22 bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of the yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *Embo J* 11, 2583-93.
- (116) Welihinda, A. A., and Kaufman, R. J. (1996) The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation. *J Biol Chem* 271, 18181-7.
- (117) Kawahara, T., Yanagi, H., Yura, T., and Mori, K. (1998) Unconventional splicing of HAC1/ERN4 mRNA required for the unfolded protein response. Sequence-specific and non-sequential cleavage of the splice sites. *J Biol Chem* 273, 1802-7.
- (118) Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J. (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14, 20-8.
- (119) Kuznetsov, G., and Nigam, S. K. (1998) Folding of secretory and membrane proteins. *N Engl J Med* 339, 1688-95.
- (120) Dobson, C. M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* 15, 3-16.
- (121) Barral, J. M., Broadley, S. A., Schaffar, G., and Hartl, F. U. (2004) Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol* 15, 17-29.
- (122) Selkoe, D. J. (2004) Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol* 6, 1054-61.
- (123) Kretzschmar, H. A. (1999) Molecular pathogenesis of prion diseases. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249 Suppl 3, 56-63.
- (124) Glatzel, M., Stoeck, K., Seeger, H., Luhrs, T., and Aguzzi, A. (2005) Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol* 62, 545-52.
- (125) Chien, P., Weissman, J. S., and DePace, A. H. (2004) Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem* 73, 617-56.
- (126) Prusiner, S. B. (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13363-83.
- (127) Sakudo, A., Onodera, T., Suganuma, Y., Kobayashi, T., Saeki, K., and Ikuta, K. (2006) Recent advances in clarifying prion protein functions using knockout mice and derived cell lines. *Mini Rev Med Chem* 6, 589-601.
- (128) Uptain, S. M., and Lindquist, S. (2002) Prions as protein-based genetic elements. *Annu Rev Microbiol* 56, 703-41.
- (129) Wickner, R. B., Edskes, H. K., Ross, E. D., Pierce, M. M., Baxa, U., Brachmann, A., and Shewmaker, F. (2004) Prion genetics: new rules for a new kind of gene. *Annu Rev Genet* 38, 681-707.

- (130) Liebman, S. W. (2002) Progress toward an ultimate proof of the prion hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9098-100.
- (131) Wickner, R. B. (1994) [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 264, 566-9.
- (132) Aigle, M., and Lacroute, F. (1975) Genetical aspects of [URE3], a non-mitochondrial, cytoplasmically inherited mutation in yeast. *Mol Gen Genet* 136, 327-35.
- (133) Sondheimer, N., Lopez, N., Craig, E. A., and Lindquist, S. (2001) The role of Sis1 in the maintenance of the [RNQ+] prion. *Embo J* 20, 2435-42.
- (134) Coustou, V., Deleu, C., Saupe, S., and Begueret, J. (1997) The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospora anserina* behaves as a prion analog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9773-8.
- (135) Ross, E. D., Edskes, H. K., Terry, M. J., and Wickner, R. B. (2005) Primary sequence independence for prion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12825-30.
- (136) Balguerie, A., Dos Reis, S., Ritter, C., Chaignepain, S., Couлары-Salin, B., Forge, V., Bathany, K., Lascu, I., Schmitter, J. M., Riek, R., and Saupe, S. J. (2003) Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina*. *Embo J* 22, 2071-81.
- (137) Balguerie, A., Dos Reis, S., Couлары-Salin, B., Chaignepain, S., Sabourin, M., Schmitter, J. M., and Saupe, S. J. (2004) The sequences appended to the amyloid core region of the HET-s prion protein determine higher-order aggregate organization in vivo. *J Cell Sci* 117, 2599-610.
- (138) Sparrer, H. E., Santoso, A., Szoka, F. C., Jr., and Weissman, J. S. (2000) Evidence for the prion hypothesis: induction of the yeast [PSI+] factor by in vitro- converted Sup35 protein. *Science* 289, 595-9.
- (139) Maddelein, M. L., Dos Reis, S., Duvezin-Caubet, S., Couлары-Salin, B., and Saupe, S. J. (2002) Amyloid aggregates of the HET-s prion protein are infectious. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7402-7.
- (140) Collin, P., Beauregard, P. B., Elagoz, A., and Rokeach, L. A. (2004) A non-chromosomal factor allows viability of *Schizosaccharomyces pombe* lacking the essential chaperone calnexin. *J Cell Sci* 117, 907-18.
- (141) Si, K., Lindquist, S., and Kandel, E. R. (2003) A neuronal isoform of the aplasia CPEB has prion-like properties. *Cell* 115, 879-91.
- (142) Hampsey, M. (1997) A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1099-133.
- (143) Dean, N. (1995) Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1287-91.
- (144) Parsell, D. A., and Lindquist, S. (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27, 437-96.
- (145) Zhang, Q., Chieu, H. K., Low, C. P., Zhang, S., Heng, C. K., and Yang, H. (2003) *Schizosaccharomyces pombe* cells deficient in triacylglycerols synthesis undergo apoptosis upon entry into the stationary phase. *J Biol Chem* 278, 47145-55.

- (146) Burhans, W. C., Weinberger, M., Marchetti, M. A., Ramachandran, L., D'Urso, G., and Huberman, J. A. (2003) Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat Res* 532, 227-43.
- (147) Herker, E., Jungwirth, H., Lehmann, K. A., Maldener, C., Frohlich, K. U., Wissing, S., Buttner, S., Fehr, M., Sigrist, S., and Madeo, F. (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 164, 501-7.
- (148) Forsburg, S. L. (2001) The art and design of genetic screens: yeast. *Nat Rev Genet* 2, 659-68.
- (149) Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., et al. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-80.
- (150) Parodi, A. J. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 69, 69-93.
- (151) Leach, M. R., Cohen-Doyle, M. F., Thomas, D. Y., and Williams, D. B. (2002) Localization of the lectin, ERp57 binding, and polypeptide binding sites of calnexin and calreticulin. *J Biol Chem* 277, 29686-97.
- (152) Turcotte, C., Roux, A., Beauregard, P.B., Guérin, R., Sénéchal, P., Hajjar, F. and Rokeach, L.A. (2006) The calnexin independent state does not compensate for all calnexin functions in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMSYR in press*.
- (153) Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194, 795-823.
- (154) Elbe, R. (1992) A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques* 13, 18-19.
- (155) Forsburg, S. L. (1993) Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* 21, 2955-6.
- (156) Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- (157) Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A., and Tsien, R. Y. (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 7877-82.

- (158) Liebman, S. W., Bagriantsev, S. N., and Derkatch, I. L. (2006) Biochemical and genetic methods for characterization of [PIN+] prions in yeast. *Methods* 39, 23-34.
- (159) Burke, J. D., and Gould, K. L. (1994) Molecular cloning and characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* his3 gene for use as a selectable marker. *Mol Gen Genet* 242, 169-76.
- (160) Nairn, J., Duncan, D., Gray, L. M., Urquhart, G., Binnie, M., Byron, O., Fothergill-Gilmore, L. A., and Price, N. C. (1998) Purification and characterization of pyruvate kinase from *Schizosaccharomyces pombe*: evidence for an unusual quaternary structure. *Protein Expr Purif* 14, 247-53.
- (161) Jeffery, C. J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 8-11.
- (162) Ronai, Z. (1993) Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int J Biochem* 25, 1073-6.
- (163) Bock-Taferner, P., and Wank, H. (2004) GAPDH enhances group II intron splicing in vitro. *Biol Chem* 385, 615-21.
- (164) Popanda, O., Fox, G., and Thielmann, H. W. (1998) Modulation of DNA polymerases alpha, delta and epsilon by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Biochim Biophys Acta* 1397, 102-17.
- (165) Meyer-Siegler, K., Mauro, D. J., Seal, G., Wurzer, J., deRiel, J. K., and Sirover, M. A. (1991) A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 8460-4.
- (166) Voet, D. J. G. V. (1998) *Biochimie*, 2e édition ed., De Boeck Université, Turin, Italie.
- (167) Wang, Q., Woltjer, R. L., Cimino, P. J., Pan, C., Montine, K. S., Zhang, J., and Montine, T. J. (2005) Proteomic analysis of neurofibrillary tangles in Alzheimer disease identifies GAPDH as a detergent-insoluble paired helical filament tau binding protein. *Faseb J* 19, 869-71.
- (168) Barnett, J. A., Payne, R.W. & Yarrow, D. (1990) *Yeast. Characteristics and identification*, 2nd edition ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- (169) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland Publishing, Inc., New York, NY.
- (170) Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (2006) ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 24, 841-7.
- (171) Chen, D., Toone, W. M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and Bahler, J. (2003) Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* 14, 214-29.
- (172) Nakamichi, N., Yamamoto, E., Yamada, H., Aiba, H., and Mizuno, T. (2000) Identification and characterization of a novel gene, *hos2+*, the function of which is necessary for growth under high osmotic stress in fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 2493-6.
- (173) Ma, Y., and Hendershot, L. M. (2004) ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat* 28, 51-65.
- (174) Lindquist, S. (1992) Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. *Curr Opin Genet Dev* 2, 748-55.

- (175) Morano, K. A., Liu, P. C., and Thiele, D. J. (1998) Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* 1, 197-203.
- (176) Jurgensmeier, J. M., Krajewski, S., Armstrong, R. C., Wilson, G. M., Oltersdorf, T., Fritz, L. C., Reed, J. C., and Otilie, S. (1997) Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 8, 325-39.
- (177) Torgler, C. N., Tiani, M., Raven, T., Aubry, J., Brown, R., and Meldrum, E. (1997) Expression of bak in *S. pombe* results in a lethality mediated through interaction with the calnexin homologue Cnx1. *Cell Death and Differentiation* 4, 263-271.
- (178) Low, C. P., Liew, L. P., Pervaiz, S., and Yang, H. (2005) Apoptosis and lipopoptosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Yeast Res* 5, 1199-206.
- (179) Pearce, A. K., Crimmins, K., Groussac, E., Hewlins, M. J., Dickinson, J. R., Francois, J., Booth, I. R., and Brown, A. J. (2001) Pyruvate kinase (Pyk1) levels influence both the rate and direction of carbon flux in yeast under fermentative conditions. *Microbiology* 147, 391-401.
- (180) Schaaff, I., Heinisch, J., and Zimmermann, F. K. (1989) Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. *Yeast* 5, 285-90.
- (181) Lu, M., Sautin, Y. Y., Holliday, L. S., and Gluck, S. L. (2004) The glycolytic enzyme aldolase mediates assembly, expression, and activity of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 279, 8732-9.
- (182) Laschet, J. J., Minier, F., Kurcewicz, I., Bureau, M. H., Trottier, S., Jeanneteau, F., Griffon, N., Samyn, B., Van Beeumen, J., Louvel, J., Sokoloff, P., and Pumain, R. (2004) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a GABAA receptor kinase linking glycolysis to neuronal inhibition. *J Neurosci* 24, 7614-22.
- (183) Kawamoto, R. M., and Caswell, A. H. (1986) Autophosphorylation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. *Biochemistry* 25, 657-61.
- (184) Jovanovic, S., Du, Q., Crawford, R. M., Budas, G. R., Stagljar, I., and Jovanovic, A. (2005) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase serves as an accessory protein of the cardiac sarcolemmal K(ATP) channel. *EMBO Rep* 6, 848-52.
- (185) Tisdale, E. J. (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 276, 2480-6.
- (186) Robbins, A. R., Ward, R. D., and Oliver, C. (1995) A mutation in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase alters endocytosis in CHO cells. *J Cell Biol* 130, 1093-104.
- (187) Jindal, H. K., and Vishwanatha, J. K. (1990) Functional identity of a primer recognition protein as phosphoglycerate kinase. *J Biol Chem* 265, 6540-3.
- (188) Kumble, K. D., Iversen, P. L., and Vishwanatha, J. K. (1992) The role of primer recognition proteins in DNA replication: inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxyribonucleotides. *J Cell Sci* 101 ( Pt 1), 35-41.
- (189) Duan, Z., Lamendola, D. E., Yusuf, R. Z., Penson, R. T., Preffer, F. I., and Seiden, M. V. (2002) Overexpression of human phosphoglycerate kinase 1 (PGK1) induces a multidrug resistance phenotype. *Anticancer Res* 22, 1933-41.
- (190) Krishnan, P., Gullen, E. A., Lam, W., Dutschman, G. E., Grill, S. P., and Cheng, Y. C. (2003) Novel role of 3-phosphoglycerate kinase, a glycolytic enzyme, in the



- activation of L-nucleoside analogs, a new class of anticancer and antiviral agents. *J Biol Chem* 278, 36726-32.
- (191) Sharma, P., Walsh, K. T., Kerr-Knott, K. A., Karaian, J. E., and Mongan, P. D. (2005) Pyruvate modulates hepatic mitochondrial functions and reduces apoptosis indicators during hemorrhagic shock in rats. *Anesthesiology* 103, 65-73.
- (192) Hegde, K. R., and Varma, S. D. (2004) Morphogenetic and apoptotic changes in diabetic cataract: prevention by pyruvate. *Mol Cell Biochem* 262, 233-7.
- (193) Van Leeuwen, J. E., and Kears, K. P. (1997) Reglucosylation of N-linked glycans is critical for calnexin assembly with T cell receptor (TCR) alpha proteins but not TCRbeta proteins. *J Biol Chem* 272, 4179-86.
- (194) Chung, S. J., Lee, S. H., Lee, Y. J., Park, H. S., Bunker, R., and Kang, Y. H. (2004) Pyruvate protection against endothelial cytotoxicity induced by blockade of glucose uptake. *J Biochem Mol Biol* 37, 239-45.
- (195) Shimizu, T., Uehara, T., and Nomura, Y. (2004) Possible involvement of pyruvate kinase in acquisition of tolerance to hypoxic stress in glial cells. *J Neurochem* 91, 167-75.