

2m11.2783.7

Université de Montréal

**Identification par complémentation d'un gène qui restaure la sécrétion
de l'invertase chez *Saccharomyces cerevisiae* W303-1b**

par

Sylvain Huard

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

Mars, 2000

©Sylvain Huard, 2000



W
4
U58
2000
v.030

2000
2000

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Identification par complémentation d'un gène qui restaure la sécrétion
de l'invertase chez *Saccharomyces cerevisiae* W303-1b**

présenté par

Sylvain Huard

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Luis A. Rokeach	Président du jury
Dr Guy Boileau	Directeur de recherche
Dr Nabil G. Seidah	Membre du jury

Mémoire accepté le: 12-06-00

SOMMAIRE

Chez les cellules eucaryotes, la biosynthèse des protéines est essentielle à la vie. Pour accomplir leurs fonctions biologiques, les protéines doivent être acheminées au bon endroit dans la cellule, notamment par la voie de sécrétion. Cette voie de transport est organisée en diverses structures membranaires distinctes.

La porte d'entrée des protéines sécrétées et des protéines membranaires dans la voie de sécrétion est le réticulum endoplasmique. À cet endroit, les protéines sont repliées correctement, glycosylées et forment des ponts disulfures. Par la suite, la plupart d'entre elles sont acheminées à l'appareil de Golgi par des vésicules de transport. Dans ce compartiment intracellulaire, les groupements glycosyls des glycoprotéines sont alors modifiés. Finalement, certaines protéines sont transportées à la vacuole ou à la membrane plasmique par une autre série de vésicules de transport.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la voie de sécrétion des protéines est très semblable à celle des cellules de mammifères dans sa capacité de replier les protéines, de les glycosyler et de les sécréter. Ces propriétés dépendent du bon fonctionnement de la voie de sécrétion.

Nos travaux ont consisté à étudier le transport de l'invertase vers l'espace périplasmique chez *Saccharomyces cerevisiae* W303-1b. Des études antérieures ont démontré que W303-1b manifeste à 37 °C un ralentissement de la sécrétion de l'invertase dans l'espace périplasmique comparativement à SEY6210. Notre hypothèse de travail vise sur l'identification, par complémentation génétique, d'un gène défectueux responsable du phénotype observé chez W303-1b. De plus, ce défaut de sécrétion est corrigé par la délétion du gène *SLA1* chez W303-1b. Slalp est une protéine liant l'actine qui semble importante dans le transport de certaines protéines entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi.

Nous avons montré qu'un fragment d'ADN génomique du chromosome IX restaure la sécrétion de l'invertase chez W303-1b. Ce fragment contient trois gènes (*ECM37*, *YIL145C* et *TID3*) où seul le gène *YIL145C* possède un cadre de lecture ouverte (ORF) entier. Finalement, plusieurs hypothèses ont été émises sur les effets possibles de ces gènes sur la sécrétion de l'invertase, ce qui permettra éventuellement d'élaborer de nouvelles hypothèses concernant l'organisation du système de sécrétion chez *Saccharomyces cerevisiae* et les liens moléculaires qui peuvent exister entre le cytosquelette et la machinerie protéique régulant le transport des protéines.

Mots clés: actine, cytosquelette, transport des protéines, voie de sécrétion.

TABLE DES MATIÈRES

	page
Sommaire.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xii
Dédicace.....	xiii

CHAPITRE I – INTRODUCTION

1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.2 Transport des protéines le long de la voie de sécrétion et de la voie d'endocytose chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.2.1 Translocation des protéines vers la lumière du RE.....	5
1.2.1.1 La séquence signal.....	5
1.2.1.2 Translocation co-traductionnelle.....	7
1.2.1.3 Translocation post-traductionnelle.....	7
1.2.1.4 Modifications post-traductionnelles des protéines.....	8
1.2.2 Transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi.....	11
1.2.2.1 Formation des vésicules de transport.....	11
1.2.2.2 Attache et fusion des vésicules de transport.....	13
1.2.2.3 Inclusion d'un cargo dans les vésicules de transport.....	14
1.2.2.3.1 Définition d'un cargo.....	14
1.2.2.3.2 Sélection d'un cargo.....	15
• Système de "contrôle de la qualité".....	15
• Escorte moléculaire.....	16
• Récepteurs de cargos.....	17

1.2.3	Transport intra-Golgi des protéines.....	19
1.2.3.1	Transport vésiculaire.....	19
1.2.3.2	Modèle du “saut vésiculaire” ou “maturation des saccules”.....	19
1.2.4	Transport post-Golgi des protéines.....	20
1.2.4.1	Transport vers la vacuole.....	21
1.2.4.2	Transport vers la membrane plasmique.....	22
1.3	Le cytosquelette.....	24
1.3.1	Le cytosquelette d’actine.....	24
1.3.1.1	L’actine.....	26
1.3.1.2	Protéines liant l’actine (ABP).....	26
1.3.1.2.1	Abp1p.....	26
1.3.1.2.2	Slp1p.....	27
1.3.1.2.3	Moteurs moléculaires.....	28
1.4	But de l’étude et stratégie utilisée.....	30

CHAPITRE II – MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1	Souches de levure et de bactérie.....	32
2.2	Milieux de culture et conditions de croissance.....	32
2.3	Plasmides et procédures de transformation.....	33
2.4	Méthode enzymatique de séquençage.....	34
2.5	Immunobuvardage.....	35
2.6	Pulse-chase.....	36
2.6.1	Sans préparation de sphéroplastes.....	36
2.6.2	Avec préparation de sphéroplastes.....	37

CHAPITRE III – RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

3.1	À 30 °C et à 37 °C, la formation des sphéroplastes n’est pas perturbée.....	40
3.2	Mise au point d’un test de détection rapide mettant en évidence l’inhibition partielle de la sécrétion de l’invertase à 37 °C chez GBY1.....	42

3.3	Identification par complémentation de deux clones qui restaurent la sécrétion de l'invertase à 37 °C.....	44
3.4	Mise en évidence par pulse-chase de la restauration de la sécrétion de l'invertase à 37 °C chez GBY3-1 et GBY3-2.....	45
3.5	Identification des gènes qui restaurent la sécrétion de l'invertase à 37 °C chez GBY3-1 et GBY3-2.....	46

CHAPITRE IV – DISCUSSION

4.1	Rappel de l'hypothèse de travail.....	56
4.2	Méthodologie utilisée: la complémentation génétique.....	59
4.3	Deux clones identiques (GBY3-1 et GBY3-2).....	61
4.4	Nature des gènes et leurs effets possibles sur la sécrétion de l'invertase.....	61
	4.4.1 <i>ECM37</i>	61
	4.4.2 <i>YIL145C</i>	62
	4.4.3 <i>TID3</i>	64
4.5	Conclusion et perspectives.....	66

CHAPITRE V – BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES TABLEAUX

	page
CHAPITRE II	
Tableau I Génotypes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	32
Tableau II Génotype de <i>Escherichia coli</i> .	32
Tableau III Oligonucléotides nécessaires au séquençage des fragments d'ADN d'intérêt.	34

LISTE DES FIGURES

	page
 CHAPITRE I	
Figure 1 Transport des protéines le long de la voie de sécrétion et de la voie d'endocytose chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	4
Figure 2 Translocation des protéines vers la lumière du réticulum endoplasmique chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	6
Figure 3 Transport antérograde et rétrograde des protéines le long de la voie de sécrétion chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	12
Figure 4 Mouvement des vésicules de transport à l'intérieur de la cellule.	25
 CHAPITRE III	
Figure 5 Analyse de la synthèse des protéines par pulse-chase.	47
Figure 6 Analyse de la sécrétion de l'invertase par immunobuvardage pour mettre au point un test de détection rapide.	48
Figure 7 Analyse de la sécrétion de l'invertase par immunobuvardage pour différencier GBY2 de GBY1 dans une culture mixte.	49
Figure 8 Carte de restriction des plasmides centromériques YCp50 et pRS316.	50
Figure 9 Analyse de la sécrétion de l'invertase par immunobuvardage chez les deux clones inconnus (GBY3-1 et GBY3-2).	52
Figure 10 Analyse de la synthèse et du transport de l'invertase par pulse-chase chez GBY3-1 et GBY3-2.	53
Figure 11 Fragment d'ADN génomique de levure (3681 pb) inséré dans le plasmide centromérique YCp50.	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABP	protéine liant l'actine
ADN	acide désoxyribonucléique
ALP	phosphatase alcaline
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP (dATP)	adénosine triphosphate (désoxyadénosine triphosphate)
COP	<i>coatomer protein</i>
CPY	carboxypeptidase Y
DAG	diacylglycérol
D.O.	densité optique
DPAPB	dipeptidylaminopeptidase B
GDP (GTP)	guanosine diphosphate (guanosine triphosphate)
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HRP	<i>horseradish peroxydase</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor</i>
PC	phosphatidylcholine
PDI	isomérase de ponts disulfures
PI	phosphatidylinositol
PITP	<i>phosphatidylinositol transfer protein</i>
PrA	protéinase A
PrB	protéinase B
RE	réticulum endoplasmique
RT-PCR	<i>reverse transcriptase – polymerase chain reaction</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodécyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SH3	<i>Src-homology-3</i>
<i>SLA1</i>	gène <i>SLA1</i> sauvage
<i>sla1</i>	gène <i>sla1</i> muté
Slp1p	protéine Slp1

SNAP	<i>soluble NSF-attachment protein</i>
SNARE	<i>SNAP receptor</i>
<i>t</i> -SNARE	<i>target</i> SNARE
<i>v</i> -SNARE	<i>vesicular</i> SNARE
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>

Symboles et abréviations d'unités courantes

b	base
Ci	curie
D	dalton
F	faraday
g	gramme
l	litre
m	mètre
M	molaire
V	volt
pb	paire de base
Ω	ohm
% m/v	pourcentage masse/volume
% v/v	pourcentage volume/volume

Préfixes utilisés devant certaines unités courantes

k	kilo
m	milli
n	nano
μ	micro

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherche, le Dr Guy Boileau, pour son accueil dans son laboratoire et son soutien tout au long de mes travaux de recherche. Je le remercie pour la patience dont il a su faire preuve et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués au cours des années que j'ai passées sous sa direction. Il a su me guider pour mener à bien mon travail.

Je remercie également le Dr Annik Prat pour le partage de sa vaste expérience de travail. Je désire remercier de façon spéciale le Dr Guillaume Lesage pour sa patience, son support moral, sa rigueur scientifique et son amitié, une personne que j'ai connue lors de mes débuts dans la recherche scientifique.

Je remercie aussi l'ensemble des membres du laboratoire, particulièrement Alexandre Benoit, pour sa bonne humeur, son enthousiasme et son ouverture d'esprit, ce qui a contribué à maintenir une ambiance de travail plus qu'agréable.

Merci à Jean Buteau et à François-Xavier Campbell-Valois pour leur lecture critique de ce manuscrit et pour bien plus encore... Encore merci à Jean pour son amitié, sa créativité, son audace, ses critiques, ses conseils, sa philosophie de la vie...

À tous les membres de ma famille, acceptez le témoignage de ma reconnaissance...

Finalement, merci au Dr Luis A. Rokeach et au Dr Nabil G. Seidah pour avoir accepté d'évaluer ce mémoire.

Beer,

bread

& genetics

– A yeast

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un eucaryote unicellulaire de forme sphérique ou ovoïde qui possède un seul noyau. Dans la nature, *Saccharomyces cerevisiae* existe soit à l'état haploïde, soit à l'état diploïde. Les cellules haploïdes peuvent être de type **a** ou α , de sorte que les cellules diploïdes **a**/ α naissent par la fusion de deux cellules haploïdes de types différents. Le type haploïde **a** ou α d'une cellule est déterminé par l'information génétique codée au locus *MAT* (*MAT a* ou *MAT α*). Cette information régule l'expression d'un groupe de gènes qui confèrent à la cellule son type haploïde **a** ou α (Herskowitz, 1988).

Saccharomyces cerevisiae prolifère selon deux modes. Les cellules haploïdes et diploïdes peuvent se reproduire de façon asexuée par bourgeonnement et division transversale (mitose). Chaque bourgeon qui se sépare d'une cellule se développe en une nouvelle levure. Les cellules diploïdes peuvent aussi proliférer de façon sexuée par la formation de spores (méiose). Ces dernières sont des cellules haploïdes qui se reproduiront éventuellement par mitose. L'utilisation en laboratoire de cellules haploïdes a pour avantage de faciliter l'étude des gènes, car chaque cellule n'a qu'un exemplaire de chaque chromosome. Jusqu'à tout récemment, près de 60% des gènes de *Saccharomyces cerevisiae* n'avaient pas encore de fonctions connues (Botstein *et al.*, 1997).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la fusion d'une cellule **a** et α est gouvernée par les phéromones **a** et α . La phéromone **a** est sécrétée par une cellule *MAT a* tandis que la phéromone α est sécrétée par une cellule *MAT α* . Chaque phéromone se lie à un récepteur transmembranaire situé à la membrane plasmique de la cellule de type haploïde différent. Cette liaison déclenche l'activation d'une cascade de transduction via une protéine G hétérotrimérique (Herskowitz, 1995). Cette cascade de transduction mène à l'activation transcriptionnelle de certains gènes qui facilitent la fusion des cellules conjugantes et celle des deux noyaux (Widmann *et al.*, 1999).

Au fil des ans, *Saccharomyces cerevisiae* est devenu un micro-organisme de prédilection pour l'étude de plusieurs processus cellulaires étant donné que le séquençage de son génome est maintenant complété, que sa croissance est rapide et qu'il est facile de manipuler son système génétique bien défini. Il possède, entre autre, un système de sécrétion des protéines très semblable à celui des cellules de mammifères. Ce système de sécrétion libère dans le milieu extracellulaire des protéines impliquées dans la régulation physiologique de la cellule. Actuellement, de plus en plus d'évidences expérimentales démontrent que les mécanismes moléculaires qui régulent le transport des protéines sont conservés chez les eucaryotes.

1.2 Transport des protéines le long de la voie de sécrétion et de la voie d'endocytose chez *Saccharomyces cerevisiae*

Lorsque l'on observe une cellule au microscope électronique, on peut discerner une multitude de petites structures de tailles diverses. À plus petite échelle, cela traduit l'extraordinaire dynamique des cellules vivantes et l'échange permanent de protéines et de lipides entre les différents compartiments intracellulaires (Palade, 1975).

Analysé depuis plusieurs années, ce transport protéique est aujourd'hui subdivisé en deux voies: la voie de sécrétion et la voie d'endocytose. La première comprend les systèmes intracellulaires qui acheminent les protéines vers la membrane plasmique ou vers un compartiment intracellulaire spécifique à partir du réticulum endoplasmique (Figure 1). La seconde est formée des vésicules qui acheminent les produits extracellulaires vers des organites chargés d'enzymes hydrolytiques (Figure 1). Or, notre laboratoire s'intéresse plus particulièrement à la voie de sécrétion chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Dans la cellule, la synthèse des protéines est amorcée dans le cytoplasme. Les protéines sécrétées et les protéines membranaires sont ensuite insérées dans le réticulum endoplasmique (RE). Elles sont alors dirigées vers les saccules de l'appareil de Golgi, puis vers la membrane plasmique ou distribuées à divers organites comme la vacuole (Figure 1). Dans les prochaines pages, je décrirai

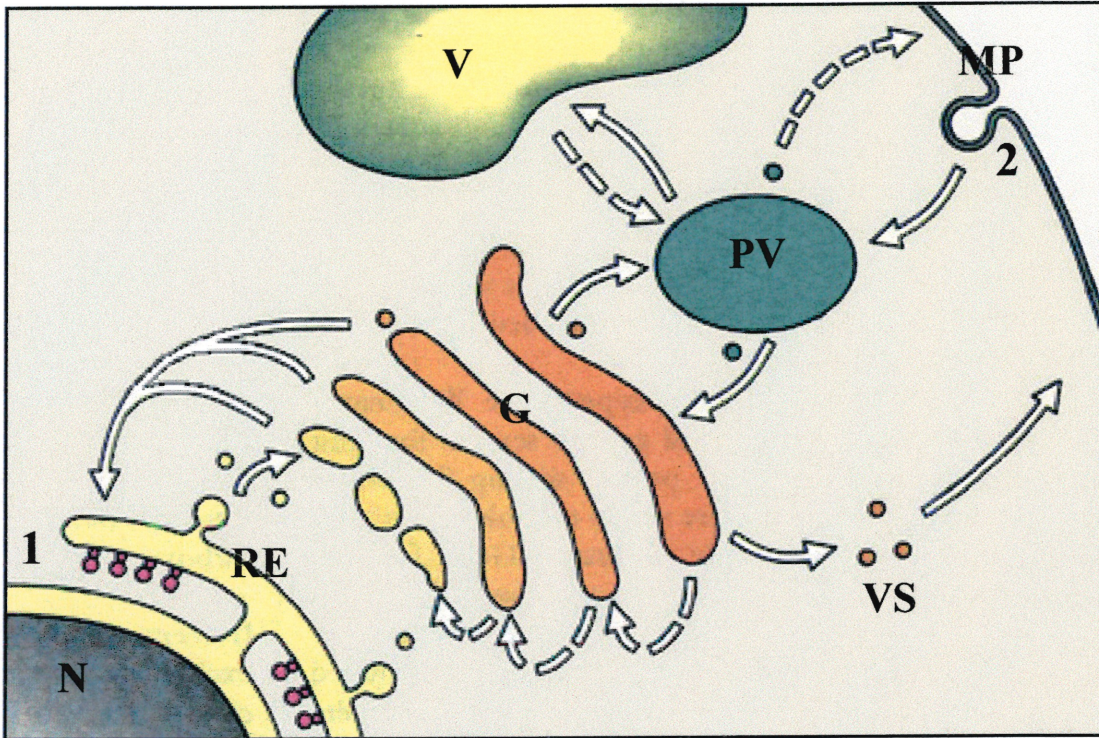


Figure 1 Transport des protéines le long de la voie de sécrétion (1) et de la voie d'endocytose (2) chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Abréviations: N, noyau; RE, réticulum endoplasmique; G, appareil de Golgi; PV, endosome/prévacuole; V, vacuole; VS, vésicules; MP, membrane plasmique.

Tirée de la page web du laboratoire du Dr Emr.
<http://cmm.ucsd.edu/emr/lab>

plus en détail les mécanismes moléculaires qui participent au bon fonctionnement du transport des protéines, depuis leur entrée dans le RE jusqu'à la membrane plasmique.

1.2.1 *Translocation des protéines vers la lumière du RE*

La membrane lipidique du RE, en continuité avec l'enveloppe nucléaire, isole le contenu de la lumière du cytoplasme. Cette membrane constitue une barrière que doivent traverser les protéines destinées à la vacuole, à la membrane plasmique ou sécrétées à l'extérieur de la cellule. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la translocation des protéines nouvellement synthétisées vers la lumière du RE est réalisée soit de manière co-translationnelle, soit de manière post-translationnelle (Figure 2). Un complexe protéique, le translocon, joue un rôle important dans ces deux processus (Matlack *et al.*, 1998).

Le translocon forme un canal hydrophile traversant la membrane lipidique du RE et laissant passer le polypeptide en cours de synthèse vers la lumière du RE (Crowley *et al.*, 1994). Ce canal est un oligomère composé de quatre complexes protéiques Sec61 (Stirling, 1999). Sec61 est lui-même un trimère composé de Sec61p, Sss1p et Sbh1p (Stirling *et al.*, 1992; Esnault *et al.*, 1993; Panzner *et al.*, 1995) qui sont tous des protéines membranaires.

1.2.1.1 *La séquence signal*

La première évidence expérimentale qui a permis d'élaborer un mécanisme moléculaire de translocation est l'identification d'une courte séquence en acides aminés hydrophobes située en position N-terminale de la protéine à être transloquée. Toutes les protéines empruntant la voie de sécrétion possèdent cette séquence signal.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'invertase est un bon exemple d'une protéine où la séquence signal joue un rôle important. Le gène de l'invertase (*SUC2*) a deux ARNm (1,8 kb et 1,9 kb) qui diffèrent à leur extrémité 5'. Le transcrit le plus court code pour une protéine hydrophile qui réside dans le cytoplasme tandis que le

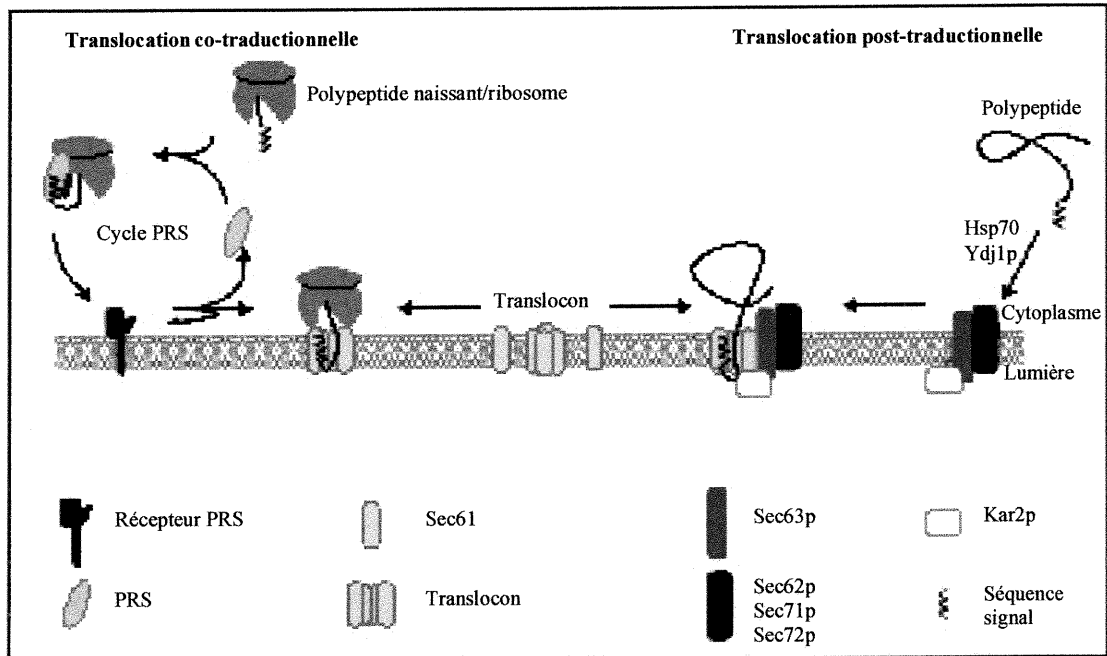


Figure 2 Translocation des protéines vers la lumière du réticulum endoplasmique chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Tirée de Stirling, (1999).

transcrit le plus long code pour une protéine sécrétée à la surface cellulaire. Cet ARNm de 1,9 kb code pour une séquence signal de 20 résidus d'acide aminé supplémentaires à l'extrémité N-terminale de l'invertase et responsable de sa translocation dans le RE (Carlson et Botstein, 1982).

1.2.1.2 *Translocation co-traductionnelle*

Lorsque le polypeptide émergent du ribosome traverse la membrane du RE avant même que sa synthèse ne soit complétée, on parle alors de translocation co-traductionnelle (Figure 2). Elle est initiée par la liaison d'une ribonucléoprotéine cytoplasmique, la particule de reconnaissance du signal (PRS), à la séquence signal du polypeptide naissant. Par la suite, PRS du complexe PRS/polypeptide naissant/ribosome se lie au récepteur PRS, un complexe protéique membranaire du RE. Suivant cette liaison, PRS se dissocie par un processus GTP dépendant et le complexe polypeptide naissant/ribosome est transféré sur le translocon. Le polypeptide peut donc être transloqué vers la lumière du RE simultanément à sa synthèse (Walter et Johnson, 1994).

Il semble donc que PRS et le récepteur PRS soient impliqués dans le ciblage efficace des protéines vers la membrane du RE. Il semble aussi que la dissociation de PRS permet au ribosome d'interagir directement avec le translocon. Ce dernier agirait comme récepteur de ribosome (Stirling, 1999).

1.2.1.3 *Translocation post-traductionnelle*

Des études antérieures ont démontré que la déplétion de PRS n'est pas létale pour *Saccharomyces cerevisiae*, malgré une croissance moins rapide de la cellule. La déplétion de PRS provoque des défauts de translocation qui sont variables d'une protéine à une autre. Par exemple, la translocation de la carboxypeptidase Y (CPY) n'est pas perturbée tandis que celle de la dipeptidylaminopeptidase B (DPAPB) est presque totalement abolie (Hann et Walter, 1991). Ceci a suggéré une autre alternative pour la translocation des protéines vers la lumière du RE (Hann et Walter, 1991).

Il semble que la sévérité du défaut de translocation d'une protéine donnée causée par la déplétion de PRS corrèle avec le degré d'hydrophobicité moyenne de la séquence signal (Ng *et al.*, 1996). Un polypeptide dont la séquence signal a un indice d'hydrophobicité bas s'engage préférentiellement dans la voie de la translocation post-traductionnelle. La déplétion de PRS cause aussi une augmentation de la synthèse de Kar2p et Ydj1p, des protéines connues pour être impliquées dans la translocation post-traductionnelle (Arnold et Wittrup, 1994).

Lorsque le polypeptide traverse la membrane du RE après que sa synthèse soit complétée dans le cytoplasme, on parle alors de translocation post-traductionnelle (Figure 2). Tout d'abord, des facteurs protéiques cytoplasmiques (Hsp70 et Ydj1p) sont requis pour maintenir le polypeptide dans un état non replié, une conformation nécessaire pour la translocation (Walter et Johnson, 1994; McClellan *et al.*, 1998). Par la suite, la séquence signal du polypeptide interagit avec le complexe protéique Sec63. Sec63 est un tétramère composé de Sec62p, Sec63p, Sec71p et Sec72p (Deshaies *et al.*, 1991; Brodsky et Schekman, 1993; Panzner *et al.*, 1995) qui sont tous des protéines membranaires du RE.

Le rôle de Sec63 est analogue à celui du récepteur PRS. Sec63 recrute aussi la protéine luminale Kar2p au site de translocation. Le polypeptide est alors transféré au translocon et tiré vers la lumière du RE par l'action de Kar2p dans un processus ATP dépendant (Lyman et Schekman, 1997). Des études démontrent que Kar2p semble lier le polypeptide au niveau du translocon. Une fois qu'une autre portion du polypeptide est en contact avec la lumière du RE, Kar2p se lie de nouveau à ce segment. La liaison de Kar2p avec le polypeptide empêche celui-ci de retourner vers le cytoplasme (Matlack *et al.*, 1999).

1.2.1.4 *Modifications post-traductionnelles des protéines*

Une fois transloquées dans la lumière du RE, les protéines sont soumises à de nombreuses modifications covalentes avant de se diriger vers l'appareil de Golgi (Hurtley et Helenius, 1989). Ces modifications post-traductionnelles sont de plusieurs types.

Ainsi, il y a l'élimination de la séquence signal par une coupure protéolytique à l'aide de la peptidase signal. Il y a aussi la formation de ponts disulfures par l'isomérase de ponts disulfures (PDI) et la glycosylation (*N*-glycosylation, *O*-glycosylation, ajout d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI)) des sites appropriés par les nombreuses oligosaccharyltransférases et glycosidases. Les chaperones aident aussi au repliement des protéines et à leur oligomérisation.

Lorsqu'une de ces modifications n'est pas réalisée correctement, la cellule possède un système de "contrôle de la qualité" (CQ) pour retenir dans le RE les protéines nouvellement synthétisées. Seules les protéines qui réussissent avec succès ce CQ sont acheminées vers le compartiment intracellulaire suivant (Ellgaard *et al.*, 1999).

Le mécanisme le plus souvent observé est l'association des protéines nouvellement synthétisées avec des chaperones. Ces dernières sont non seulement responsables d'aider au repliement des protéines et à leur oligomérisation, mais servent aussi d'ancre de rétention pour les protéines incorrectement repliées (Wickner *et al.*, 1999). En d'autres mots, CQ améliore l'efficacité du repliement en retenant les protéines dans le RE et empêche les effets nuisibles qui sont causés dans la cellule par le déploiement de protéines mal repliées.

Chez les cellules de mammifères et *Schizosaccharomyces pombe*, le CQ impliquant la calnexine (CNX) est le plus étudié (Williams, 1995; Elagöz *et al.*, 1999; Ellgaard *et al.*, 1999). CNX est une protéine membranaire intégrale qui lie de façon transitoire les chaînes oligosaccharidiques *N*-liées monoglucosylées (modèle "lectine"). Tout d'abord, deux des trois résidus de glucose présents sur la chaîne oligosaccharidique *N*-liée sont excisés par l'action concertée des glucosidases I et II (GI et GII). CNX, qui se comporte comme une lectine, peut alors lier cette glycoprotéine monoglucosylée.

Par la suite, le dernier résidu de glucose est éliminé par GII et le complexe CNX/glycoprotéine non glucosylée se dissocie. Si la protéine est correctement repliée, la protéine peut quitter le RE. Dans le cas contraire, elle est

reconnue par l'enzyme UDP-glucose: glycoprotéine glucosyltransférase (GT) qui la glucosyle de nouveau. Ceci permet la formation d'un nouveau complexe CNX/glycoprotéine monoglucosylée (Hammond et Helenius, 1995; Ellgaard *et al.*, 1999; Parodi, 1999). Ce cycle est répété jusqu'à ce que la protéine soit correctement repliée ou dégradée. Ce cycle retient dans le RE les glycoprotéines aussi longtemps que ces dernières n'ont pas atteint la conformation tertiaire ou quaternaire désirée, empêchant ainsi une dégradation prématurée (Sommer et Wolf, 1997).

Un modèle alternatif a aussi été proposé pour l'activité de la calnexine chez les mammifères. Dans ce modèle, CNX facilite le repliement et l'oligomérisation des protéines en agissant comme chaperone (Williams, 1995; Ihara *et al.*, 1999). Il incorpore les caractéristiques du modèle "lectine", mais propose que CNX est également capable de lier de façon transitoire les segments hydrophobes des glycoprotéines en cours de repliement. La dissociation du complexe CNX/glycoprotéine monoglucosylée, en conjonction avec l'action de GII, requiert un changement de conformation du site de liaison de CNX au polypeptide. Ces interactions stabiliseraient les états intermédiaires des glycoprotéines en cours de repliement.

Cependant, le CQ est encore mal compris chez *Saccharomyces cerevisiae*, car il n'y a pas de GT qui a été identifiée à ce jour. On ne sait pas pour le moment si le CQ présent chez les cellules de mammifères et *Schizosaccharomyces pombe* diffère de celui retrouvé chez *Saccharomyces cerevisiae*, car la calnexine de cette dernière diffère fortement de la calnexine des autres espèces.

Des évidences expérimentales suggèrent aussi que la dégradation des protéines ait lieu dans le cytoplasme par le protéasome plutôt que dans lumière du RE (Hiller *et al.*, 1996; Wiertz *et al.*, 1996). Cela requiert le transport rétrograde des protéines (de la lumière du RE vers le cytoplasme). S'il est impossible d'obtenir la conformation désirée d'une protéine donnée, il semble que les chaperones la dirigent vers un transporteur rétrograde (Sommer et Wolf, 1997).

Des résultats récents démontrent que le translocon est essentiel pour ce transport rétrograde (Pilon *et al.*, 1997). En effet, une protéine luminale mal repliée peut interagir de nouveau avec le translocon et être exportée vers le cytoplasme (Plempner *et al.*, 1999). Il semble ainsi exister dans la cellule un nouveau mécanisme moléculaire de reconnaissance entre la protéine et le translocon pour initier le transport rétrograde. Malgré le rôle des chaperones, il est difficile d'expliquer comment les protéines qui sont sur la voie d'être correctement repliées peuvent être différenciées de celles qui sont à être dégradées. Cela n'a pas encore été élucidé.

1.2.2 Transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi

Le mouvement des vésicules entre le RE et l'appareil de Golgi est bidirectionnel (Figure 3) (Schekman et Orci, 1996). Après leur synthèse et leur repliement au niveau du RE, les protéines sont transportées vers l'appareil de Golgi par des vésicules de transport formées à partir de la membrane du RE (transport antérograde). Des vésicules semblables acheminent aussi les protéines de l'appareil de Golgi vers le RE (transport rétrograde).

1.2.2.1 Formation des vésicules de transport

L'analyse de la formation des vésicules de transport a permis de démontrer la présence d'une enveloppe protéique sur la face cytoplasmique de la membrane du compartiment donneur. Deux enveloppes protéiques distinctes l'une de l'autre par leur composition protéique et leur site d'action ont été identifiées jusqu'à maintenant (COPI et COPII).

COPI participe à la formation des vésicules de transport à la membrane de l'appareil de Golgi (Schekman et Orci, 1996). Elle est composée d'une GTPase Arf1 (Arf1p) et du complexe protéique heptamérique α -COP/ β -COP/ β' -COP/ γ -COP/ δ -COP/ ϵ -COP/ ζ -COP (Letourneur *et al.*, 1994; Orci *et al.*, 1997). De son côté, COPII est nécessaire pour la formation des vésicules de transport à la membrane du RE (Schekman et Orci, 1996). Elle est composée de la GTPase Sar1 (Sar1p) et des complexes protéiques hétérodimériques Sec23p/Sec24p et Sec13p/Sec31p (Barlowe

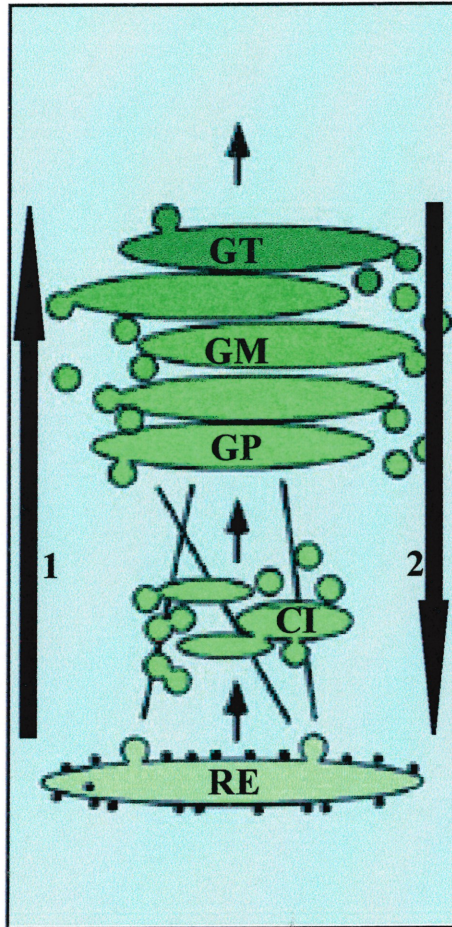


Figure 3 Transport antérograde (1) et rétrograde (2) des protéines le long de la voie de sécrétion chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Abréviations: **RE**, réticulum endoplasmique; **CI**, compartiment intermédiaire; **GP**, sacculle précoce de l'appareil de Golgi; **GM**, sacculle médiane de l'appareil de Golgi; **GT**, sacculle tardive de l'appareil de Golgi.

Tirée de Allan et Balch, (1999).

et al., 1994). Toutes les composantes protéiques de COPI et COPII sont cytoplasmiques.

La formation de la vésicule de transport au niveau du RE est initiée par la conversion de Sar1p-GDP en Sar1p-GTP par Sec12p, une protéine membranaire du RE. Sar1p-GTP se lie à la membrane du RE et recrute à la surface de celle-ci toutes les autres composantes protéiques de COPII, ce qui provoque le bourgeonnement d'une vésicule de transport. Une fois la vésicule détachée de la membrane, l'enveloppe protéique se dissocie par l'action de Sar1p qui hydrolyse le GTP en GDP. La fusion de la vésicule de transport avec la membrane de l'appareil de Golgi peut maintenant avoir lieu (Kaiser et Ferro-Novick, 1998).

De façon similaire à ce qui a été décrit précédemment, la formation des vésicules de transport au niveau de l'appareil de Golgi est amorcée par la conversion de Arf1p-GDP en Arf1p-GTP par Gea1p, une protéine cytoplasmique. De plus, Sar1p et Arf1p n'ont pas d'activité GTPase intrinsèque. L'hydrolyse du GTP en GDP par Sar1p et Arf1p est dépendante de Sec23p et Gcs1p respectivement (Kaiser et Ferro-Novick, 1998).

En définitive, l'enveloppe protéique agit comme un échafaud qui définit la forme, la taille et probablement tout le contenu des vésicules. Les composantes de l'enveloppe protéique, dispersées dans le cytoplasme, s'associent à la surface de la membrane du compartiment donneur, ce qui induit une courbure pour générer finalement une vésicule mantelée (Rothman et Orci, 1992). Le mécanisme par lequel la vésicule se sépare du compartiment donneur n'est pas connu actuellement.

1.2.2.2 Attache et fusion des vésicules de transport

Le processus de fusion d'une vésicule de transport avec la membrane du compartiment accepteur met en jeu les protéines SNARE. L'hypothèse SNARE propose qu'une v-SNARE localisée sur la vésicule de transport pourra interagir de façon spécifique avec une t-SNARE localisée sur la membrane du compartiment

accepteur (Söllner *et al.*, 1993). La formation du complexe v-SNARE/t-SNARE est régulée par plusieurs protéines, dont NSF et SNAP (Rothman, 1994).

Tout d'abord, l'enveloppe protéique qui recouvre la vésicule doit se dissocier par un processus GTP dépendant (voir section 1.2.2.1). Ensuite, la vésicule s'attache à la membrane du compartiment accepteur via les protéines SNARE. La liaison d'une v-SNARE et d'une t-SNARE est critique dans le processus de fusion, car la formation de ce complexe amène les bicouches lipidiques très près l'une de l'autre. Finalement, la vésicule fusionne avec la membrane par un processus ATP dépendant catalysé par NSF et SNAP.

De récents travaux suggèrent un mécanisme de fusion quelque peu différent. Les protéines SNARE seraient la machinerie minimale de fusion entre deux bicouches lipidiques. L'énergie nécessaire à la fusion ne serait pas fournie par NSF et SNAP. L'énergie disponible proviendrait du relâchement de la conformation "épingle-SNARE" (SNAREpin) adoptée par la liaison d'une v-SNARE à une t-SNARE lors de la fusion membranaire. Dans ce contexte, NSF et SNAP seraient nécessaires à la dissociation du complexe v-SNARE/t-SNARE (Weber *et al.*, 1998).

D'autres protéines sont aussi impliquées dans la régulation de la fusion membranaire. Les protéines Rab, qui constituent la plus grande famille de petites GTPases, ont été identifiées à l'origine comme des régulateurs de la liaison d'une v-SNARE à une t-SNARE (Chavrier et Goud, 1999). Avec leur localisation intracellulaire distincte, les protéines Rab sont des chefs d'orchestre qui dirigent un réseau d'interactions entre les protéines impliquées dans la fusion membranaire (Martinez et Goud, 1998). De cette façon, les protéines Rab s'assurent que les vésicules de transport quittant un compartiment membranaire déversent leur chargement au compartiment accepteur approprié.

1.2.2.3 Inclusion d'un cargo dans les vésicules de transport

1.2.2.3.1 Définition d'un cargo

Depuis que des approches génétiques et biochimiques ont identifié COPI et COPII comme étant nécessaires pour la formation d'une vésicule de transport, peu de choses sont connues sur la façon dont un cargo est incorporé dans ces vésicules. Un cargo est une molécule qui est transportée d'un compartiment intracellulaire à un autre via des vésicules de transport. De plus en plus d'évidences expérimentales corroborent le modèle d'une incorporation sélective des cargos dans les vésicules mantelées par COPI et COPII.

Dans la cellule, il y a trois catégories de cargos (Barlowe, 1998). La première catégorie de cargos regroupe toutes les protéines solubles et membranaires qui sont incorporées dans des vésicules de transport. Elles seront exportées vers un autre compartiment intracellulaire pour y résider. Par exemple, CPY et DPAPB sont des protéines de la vacuole tandis que l'invertase et la phéromone α sont sécrétées à la surface cellulaire. La deuxième catégorie de cargos est celle des récepteurs de cargos. Par hypothèse, ces récepteurs font un lien moléculaire entre certaines composantes des enveloppes protéiques et les cargos de la catégorie précédente. La troisième catégorie de cargos regroupe les protéines responsables du bourgeonnement, de l'attache et de la fusion des vésicules de transport à un compartiment intracellulaire donné, notamment les protéines SNARE. Toutefois, les cargos de la deuxième et troisième catégorie retournent à leur site d'origine pour réaliser de nouveau la fonction qui leur est attribuée.

1.2.2.3.2 *Sélection d'un cargo*

Les résultats expérimentaux des dernières années suggèrent que l'incorporation sélective (triage) des cargos dans les vésicules mantelées par COPI et COPII peut être réalisée par trois mécanismes moléculaires différents (Pagano *et al.*, 1999). Dans la cellule, le triage entre les protéines destinées à l'exportation de celles désignées pour résider au même endroit est réalisé au moment du bourgeonnement des vésicules à la membrane du compartiment donneur (Bremser *et al.*, 1999).

- ***Système de "contrôle de la qualité"***

Le premier mécanisme met en jeu un système de “contrôle de la qualité” (voir section 1.2.1.4) qui retient dans le RE les protéines incorrectement repliées. Dans la cellule, les propriétés fonctionnelles des protéines dépendent en grande partie de leur structure tridimensionnelle. La voie par laquelle ces protéines atteignent leur conformation finale est encore indéfinie. Cependant, le repliement des protéines nouvellement synthétisées nécessite la présence de chaperones (Gething et Sambrook, 1992). Différentes familles de chaperones ont été identifiées. Leur localisation intracellulaire et leur mécanisme de liaison à leurs substrats respectifs ont aussi été déterminés (Martin et Hartl, 1997).

- *Escorte moléculaire*

Le second mécanisme exige l'utilisation d'une escorte moléculaire qui permet à certaines protéines d'entrer dans la vésicule de transport. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le gène *SHR3* code pour une protéine membranaire intégrale du RE qui semble jouer ce rôle d'escorte. Shr3p est requise pour la localisation des perméases d'acides aminés à la membrane plasmique (Ljungdahl *et al.*, 1992). Chez une souche de levure $\Delta shr3$, le transport de ces perméases vers la membrane plasmique est interrompu au niveau du RE tandis que le transport de CPY, de la phéromone α , de l'invertase et de Pma1p vers leur emplacement cellulaire respectif n'est pas perturbé (Kuehn *et al.*, 1996).

Il a aussi été montré que Shr3p n'est pas incorporée dans les vésicules mantelées par COPII (Kuehn *et al.*, 1996). Ce même groupe de chercheurs a également démontré que Shr3p interagit de façon transitoire avec les perméases et le complexe protéique Sec23p/Sec24p. Shr3p agirait probablement comme une chaperone pouvant induire un repliement particulier des perméases, ce qui permet leur entrée dans la vésicule. Cette entrée étant conditionnelle à une interaction entre Shr3p et le complexe Sec23p/Sec24p (Kuehn *et al.*, 1998).

De façon similaire à Shr3p, Lst1p est nécessaire pour localiser Pma1p à la membrane plasmique (Roberg *et al.*, 1999). Pma1p est une H⁺-ATPase qui couple l'hydrolyse de l'ATP à la translocation des protons à travers la membrane

plasmique pour maintenir le cytoplasme à un pH neutre. Lorsqu'une cellule croît sur un milieu de culture ayant un faible pH, sa vitesse de croissance est limitée par la quantité de Pma1p à la surface cellulaire.

Le gène *LST1* code pour une protéine membranaire périphérique homologue à Sec24p qui peut se lier également à Sec23p. Chez une souche de levure Δ *lst1*, le transport de Pma1p vers la membrane plasmique est interrompu au RE, ce qui cause une faible croissance de la cellule sur un milieu de culture ayant un pH acide. Le défaut de transport causé par la délétion de *LST1* semble être spécifique à Pma1p. Le transport de CPY, de l'invertase et de Gas1p vers leur emplacement cellulaire respectif n'est pas perturbé (Roberg *et al.*, 1999). L'homologie de Lst1p avec Sec24p suppose qu'il existe dans la cellule des composantes protéiques spécialisées dans le recrutement et l'incorporation sélective de cargos dans la vésicule. Comme Lst1p semble avoir un rôle plutôt direct dans la sélection de Pma1p, cela suppose des vésicules mantelées ayant des capacités différentes de lier certains cargos.

- **Récepteurs de cargos**

Le troisième mécanisme met en jeu les composantes des enveloppes protéiques. Ces dernières interagissent avec un récepteur de cargos pour trier et incorporer les cargos à l'intérieur de la vésicule. Ce récepteur consiste en une protéine transmembranaire qui possède un domaine luminal interagissant avec un cargo spécifique et un domaine cytoplasmique interagissant avec certaines composantes de COPI ou COPII. Ce modèle suppose l'existence de signaux moléculaires qui permettent des interactions protéine-protéine entre le cargo, le récepteur de cargo et les composantes de COPI ou COPII.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, de possibles récepteurs de cargos ont été identifiés. Emp24p, une protéine transmembranaire de la famille p24, semble être impliquée dans l'incorporation sélective de certains cargos dans la vésicule de transport mantelée par COPII. Chez une souche de levure Δ *emp24*, le transport de l'invertase et de Gas1p vers la membrane plasmique est retardé. Par contre, la

cinétique de transport de CPY, de la phéromone α et de la phosphatase acide n'est pas perturbée (Schimmöller *et al.*, 1995). Finalement, le retour de Emp24p au RE est réalisé par des vésicules mantelées par COPI (Fiedler *et al.*, 1996).

Une approche expérimentale indépendante a également démontré que la délétion de *EMP24* restaure le mécanisme de la formation des vésicules chez une souche de levure $\Delta sec13$ (Elrod-Erickson et Kaiser, 1996). Le gène *SEC13* code pour la protéine Sec13p, une composante protéique de COPII. La délétion de *EMP24* active aussi la sécrétion de Kar2p. Emp24p serait impliquée non seulement dans l'exportation de certains cargos, mais aussi dans la rétention de certaines protéines résidentes du RE (Elrod-Erickson et Kaiser, 1996). L'observation de tous ces phénotypes permet d'émettre l'hypothèse que la formation des vésicules semble être vraisemblablement couplée à l'incorporation des cargos dans ces mêmes vésicules (Elrod-Erickson et Kaiser, 1996; Bremser *et al.*, 1999).

Récemment, il a été montré que la délétion de *ERP1* ou *ERP2* cause des phénotypes très similaires à ceux retrouvés chez une souche de levure $\Delta emp24$. Erp1p et Erp2p sont des nouveaux membres de la famille de récepteurs p24 (Marzioch *et al.*, 1999).

Il a été également démontré que Lag1p et Dgt1p facilitent le transport des protéines à ancrage GPI entre le RE et l'appareil de Golgi. Lag1p et Dgt1p agiraient comme un récepteur GPI pour incorporer de façon sélective les protéines à ancrage GPI dans une vésicule mantelée par COPII (Barz et Walter, 1999). Comme Emp24p, Lag1p et Dgt1p retournent au RE par des vésicules mantelées par COPI.

En résumé, les cargos de la voie de sécrétion regroupent toutes les protéines nouvellement synthétisées qui sont acheminées vers des compartiments intracellulaires distincts à partir du RE. Ils incluent aussi les protéines qui sont continuellement recyclées entre le RE et l'appareil de Golgi. Ces protéines sont responsables de la sélection des cargos, de la formation des vésicules de transport et de la fusion des vésicules avec une membrane lipidique. Tous ces cargos sont

incorporés de façon sélective dans la vésicule de transport en interagissant directement ou indirectement avec COPI ou COPII.

1.2.3 Transport intra-Golgi des protéines

L'appareil de Golgi est composé de plusieurs saccules les unes à la suite des autres qui sont responsables de la glycosylation finale des protéines, processus amorcé au RE. Les protéines sont progressivement modifiées par une série de glycosyltransférases et de glycosidases qui résident dans les différentes saccules. Chaque saccule de l'appareil de Golgi contient des enzymes de modification spécifiques (Dean, 1999).

1.2.3.1 Transport vésiculaire

Le transport vésiculaire entre les saccules de l'appareil de Golgi a été mis en évidence *in vitro* par des expériences de reconstitution (Rothman, 1994). Dans cette approche expérimentale, on utilise une population "donneur" de membrane de Golgi contenant la protéine G de VSV et une population "accepteur" de membrane de Golgi contenant une enzyme (*N*-acétylglucosamine transférase I) qui ajoute la *N*-acétylglucosamine.

Lorsque l'on incube ensemble ces deux populations de membrane, on peut mesurer le transfert de la protéine G de la membrane "donneur" à la membrane "accepteur" par l'ajout de *N*-acétylglucosamine radioactive sur la protéine G. La protéine G ayant des oligosaccharides complexes radioactifs est séquestrée à la membrane "accepteur". D'après ces résultats, on a conclu que ce transfert impliquait des intermédiaires vésiculaires qui pouvaient diffuser dans le cytoplasme.

1.2.3.2 Modèle du "saut vésiculaire" ou "maturation des saccules"

Selon les résultats expérimentaux précédents, le modèle admis pour le transport intra-Golgi est celui du "saut vésiculaire" (Rothman, 1994). Les protéines sont véhiculées de façon antérograde d'une saccule à l'autre par des vésicules mantelées par COPI. La caractéristique essentielle des vésicules de transport est leur

faculté de se détacher de leur saccule, de reconnaître correctement la saccule suivante et de fusionner avec cette dernière (modèle v-SNARE/t-SNARE).

Toutefois, certains travaux ont remis en question le modèle précédent. On a remarqué que le transport de certains oligomères de glycoprotéines ne pouvait être réalisé via des vésicules de transport, celles-ci étant de taille trop petite pour contenir un seul de ces oligomères. Ces observations ont mené au modèle de la "maturation des saccules" pour expliquer le transport intra-Golgi des protéines (Pelham, 1998).

D'après ce modèle, le transport vésiculaire n'a lieu que dans le sens rétrograde (en présence de COPI). Le transport antérograde des protéines est réalisé par la formation permanente d'une nouvelle saccule précoce à partir de vésicules provenant du RE (Figure 3). Au fur et à mesure que d'autres saccules précoces se forment derrière elle, la saccule initiale progresse à travers l'empilement pour devenir une saccule médiane, puis une saccule tardive. Au cours de sa progression, sa structure évolue et son contenu enzymatique change (Pelham, 1998). Encore aujourd'hui, le débat est loin d'être clos (Allan et Balch, 1999).

1.2.4 *Transport post-Golgi des protéines*

Chez les cellules eucaryotes, une séquence signal est nécessaire pour la translocation des protéines vers la lumière du RE. Cette séquence signal représente la première d'une série d'adresses moléculaires qui dirigent les protéines empruntant la voie de sécrétion vers un compartiment intracellulaire donné. Ces adresses moléculaires sont reconnues par plusieurs facteurs protéiques (voir section 1.2.1.1 et 1.2.2.3.2).

L'appareil de Golgi a pour fonction de trier des milliers de protéines synthétisées dans la cellule, puis de les acheminer vers d'autres compartiments intracellulaires ou à l'extérieur de la cellule. Des vésicules de transport, concentrées au voisinage de l'appareil de Golgi, véhiculent ces protéines. Dans la saccule tardive

de l'appareil de Golgi, les protéines vacuolaires sont séparées des protéines destinées à la membrane plasmique.

1.2.4.1 *Transport vers la vacuole*

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la vacuole est homologue au lysosome de la cellule de mammifères. Ce compartiment acide contient un ensemble d'enzymes hydrolytiques impliquées dans la dégradation des macromolécules. La plupart de ces enzymes sont synthétisées sous la forme d'un précurseur inactif. Leur localisation à la vacuole implique un grand nombre de composantes cellulaires très semblables à celles retrouvées dans le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi (Bryant et Stevens, 1998; Conibear et Stevens, 1998). CPY et la phosphatase alcaline (ALP) sont les enzymes vacuolaires les plus étudiées.

Lors de son transport vers la vacuole, CPY transite par un compartiment intermédiaire, la prévacuole (PV) (Vida *et al.*, 1993). Tout d'abord, Vps10p se lie au précurseur inactif de CPY, p2CPY, dans la saccule tardive de l'appareil de Golgi. Vps10p est une protéine transmembranaire qui joue le rôle de récepteur de cargos (Marcusson *et al.*, 1994). Par la suite, le complexe p2CPY/Vps10p quitte l'appareil de Golgi dans une vésicule de transport qui fusionne avec PV. À cet endroit, p2CPY se dissocie de Vps10p. Vps10p retourne à la saccule tardive tandis que p2CPY est acheminée à la vacuole (Cereghino *et al.*, 1995; Cooper et Stevens, 1996). Finalement, p2CPY subit une coupure protéolytique par la protéinase A (PrA) et la protéinase B (PrB) pour devenir CPY active.

À ce jour, il n'y a rien qui indique que le transport de ALP vers la vacuole transite aussi par un compartiment intermédiaire (Conibear et Stevens, 1998). Le précurseur inactif de ALP (proALP) se lie, par l'intermédiaire de son segment cytoplasmique, au complexe protéique cytoplasmique AP-3 (Cowles *et al.*, 1997). Par la suite, le complexe proALP/AP-3 est acheminé à la vacuole où proALP subit une coupure protéolytique par PrA ou PrB pour devenir ALP active.

Dans un effort pour identifier les composantes cellulaires responsables de la localisation des protéines à la vacuole, on a misé sur la conservation des principes qui régulent le transport des protéines à diverses étapes de la voie de sécrétion. Cela a permis, entre autre, de corroborer l'hypothèse SNARE. En effet, un grand nombre de gènes *VPS* (*Vacuolar Protein Sorting*) codent pour des protéines qui participent de près à la formation du complexe v-SNARE/t-SNARE (Bryant et Stevens, 1998).

Les vésicules de transport bourgeonnant à la saccule tardive de l'appareil de Golgi et se dirigeant vers la vacuole sont recouvertes de clathrine (Seeger et Payne, 1992). Cette enveloppe protéique est composée de clathrine et d'un adaptateur hétérotétramérique appelé adaptine (AP-1) (Chu *et al.*, 1996). AP-1 est requis pour lier le manteau de clathrine à la membrane de la saccule et incorporer divers cargos dans la vésicule via une interaction avec des récepteurs de cargos (Teuchert *et al.*, 1999). Comme COPI et COPII, le manteau de clathrine induit une courbure de la membrane pour générer une vésicule. De plus, Vps1p, une protéine cytoplasmique homologue à la dynamine, serait responsable de séparer la vésicule naissante de la membrane (Conibear et Stevens, 1995; Nothwehr *et al.*, 1995).

Cependant, la plupart des phénotypes associés à des mutations dans les gènes codant pour les composantes protéiques de la clathrine et d'AP-1 démontrent des défauts de transport de CPY et PrA entre la saccule tardive et PV (Seeger et Payne, 1992; Nothwehr *et al.*, 1995). Ces mutations ne perturbent pas le transport de ALP vers la vacuole. ALP semble donc être incorporée dans des vésicules de transport ayant une enveloppe protéique distincte. Cette enveloppe protéique n'a pas été identifiée jusqu'à maintenant. Toutefois, AP-3, une protéine homologue à AP-1 ne liant pas la clathrine, semble participer au transport de ALP (Simpson *et al.*, 1997; Stepp *et al.*, 1997).

1.2.4.2 Transport vers la membrane plasmique

Les protéines qui sont acheminées à la membrane plasmique ont plusieurs fonctions. Par exemple, l'invertase est nécessaire pour la croissance de la

cellule sur un milieu de culture contenant du sucrose comme seule source de carbone. Elle hydrolyse le sucrose extracellulaire en fructose et glucose, des sucres que la levure peut importer à l'intérieur du cytoplasme. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la forme sécrétée de l'invertase réside dans l'espace périplasmique de la cellule.

Les vésicules de transport contenant les protéines destinées à la membrane plasmique sont des vésicules de sécrétion. Elles migrent vers la membrane plasmique (vers le site de bourgeonnement), puis déchargent leur contenu à l'extérieur de la cellule par exocytose. La fusion de ces vésicules avec la membrane plasmique requiert la présence de deux complexes protéiques distincts: le complexe v-SNARE/t-SNARE (Snc1p,Snc2p/Sso1p,Sso2p) et le complexe heptamérique cytoplasmique Sec3p/Sec5p/Sec6p/Sec8p/Sec10p/Sec15p/Exo70p (Waters et Pfeffer, 1999). Ce dernier est localisé à la membrane plasmique près du bourgeon en développement (TerBush *et al.*, 1996). De plus, Sec4p, une protéine Rab présente sur la face cytoplasmique de la vésicule de sécrétion, interagit avec Sec15p (Guo *et al.*, 1999). Il est alors possible que ce réseau d'interactions protéine-protéine soit responsable du ciblage des vésicules de sécrétion vers des domaines spécifiques de la membrane plasmique.

Cependant, peu de choses sont connues sur les mécanismes par lesquels les protéines destinées à la membrane plasmique sont incorporées dans des vésicules de sécrétion. Par analogie aux vésicules de transport qui bourgeonnent au RE ou à l'appareil de Golgi, on suppose qu'elles sont recouvertes d'une enveloppe protéique, mais l'existence ainsi que la composition de cette enveloppe protéique demeurent à confirmer.

En résumé, trois principes essentiels émergent lors de l'étude du transport des protéines le long de la voie de sécrétion chez les levures et les cellules de mammifères:

- La localisation des protéines à un compartiment cellulaire donné est définie par de courtes séquences peptidiques à l'intérieur de la séquence primaire de la protéine. Ces adresses moléculaires interagissent avec

une ou plusieurs composantes protéiques présentes le long de la voie de sécrétion.

- Les protéines sont transportées d'un organite à un autre par des vésicules de transport. Ces vésicules bourgeonnent à partir d'un compartiment donneur à l'aide d'une enveloppe protéique. Elles fusionnent à un compartiment accepteur par l'action de protéines situées sur la vésicule et sur la membrane du compartiment accepteur.
- Les différents mécanismes moléculaires rencontrés le long de la voie de sécrétion sont couplés à l'hydrolyse de nucléotides par l'action de GTPases ou d'ATPases.

1.3 *Le cytosquelette*

Comme on peut le voir, les vésicules de transport sont associées à différentes familles de protéines tout au long de la voie de sécrétion. Ces protéines sont désignées pour prendre en charge le transport des cargos. Il est facile de supposer que les vésicules de transport en mouvement entre deux compartiments membranaires peuvent utiliser un moyen de locomotion pour se déplacer d'un site à un autre. Des évidences expérimentales démontrent que ces vésicules peuvent interagir avec certains éléments du cytosquelette. Leurs mouvements sont facilités par des moteurs moléculaires qui utilisent les microtubules ou les filaments d'actine comme rail (Figure 4) (Schliwa, 1999).

1.3.1 *Le cytosquelette d'actine*

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le cytosquelette d'actine est un réseau de polymères constitué d'actine, une protéine codée par le gène *ACT1*. Les premières évidences expérimentales qui ont démontré le rôle du cytosquelette d'actine dans la croissance polarisée des cellules et la sécrétion des protéines dérivent des phénotypes observés chez une souche de levure mutée dans le gène *ACT1*. On a pu observer une accumulation de vésicules de sécrétion à l'intérieur de la cellule et une diminution de la sécrétion d'invertase dans l'espace périplasmique (Novick et Botstein, 1985).

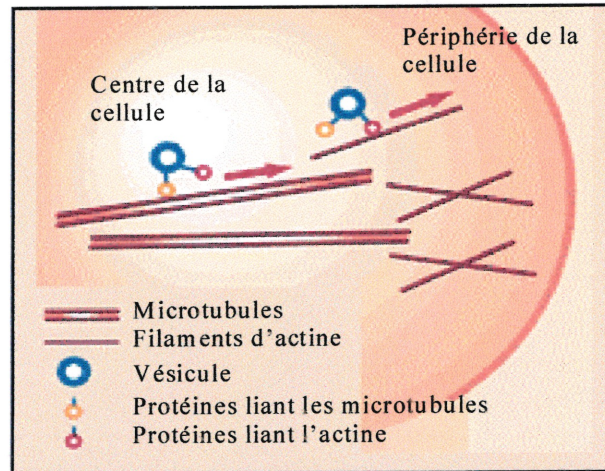


Figure 4 Mouvement des vésicules de transport à l'intérieur de la cellule.

Tirée de Schliwa, (1999).

1.3.1.1 *L'actine*

Dans la cellule, les filaments d'actine se trouvent sous forme corticale ou filamenteuse (Mulholland *et al.*, 1994). L'actine corticale, sous forme de points, est à la périphérie de la cellule en association avec la membrane plasmique. L'actine filamenteuse, sous forme de câbles cytoplasmiques, est alignée selon l'axe de bourgeonnement de la cellule (Doyle et Botstein, 1996).

L'actine est impliquée dans plusieurs processus cellulaires dont l'endocytose, la sporulation, la morphologie cellulaire, la croissance polarisée et la sécrétion des protéines via la réorganisation spatiale de son réseau. La polymérisation et la dépolymérisation de l'actine sont très rapides. Ces changements sont régulés par des protéines liant l'actine (ABP) en réponse à un stimulus extérieur qui déclenche l'activation d'une cascade de transduction. L'édification du cytosquelette d'actine est régulée à plusieurs niveaux structuraux dont l'organisation des monomères d'actine en polymères d'actine et la superorganisation des polymères d'actine en réseau d'actine (Li *et al.*, 1995).

1.3.1.2 *Protéines liant l'actine (ABP)*

Les ABP sont classées en plusieurs catégories. Une grande multitude de protéines se lient de diverses façons sur les filaments d'actine. Elles leur imposent diverses configurations structurales selon les stimulus extérieurs (Ayscough, 1998). Plusieurs ABP empêchent l'actine-G (forme monomérique de l'actine) de se polymériser en actine-F (forme polymérique de l'actine). Il y a aussi les facteurs de réticulation qui forment des ponts permettant aux filaments d'actine d'être parallèles les uns par rapport aux autres. Certaines ABP protègent les filaments d'actine contre la fragmentation par d'autres ABP. Un grand nombre de gènes qui codent pour des ABP ont été caractérisés (Winsor et Schiebel, 1997).

1.3.1.2.1 *Abp1p*

Abp1p a été l'une des premières ABP à être identifiées (Drubin *et al.*, 1988). Abp1p lie l'actine corticale. En position N-terminale, Abp1p possède un

domaine homologue à Cof1p, une autre ABP qui stimule la dépolymérisation des filaments d'actine en séquestrant l'actine-G. En position C-terminale, Abp1p possède un motif SH3 similaire à ceux que l'on retrouve dans diverses protéines qui interagissent avec le cytosquelette cortical (Drubin *et al.*, 1990).

Les motifs SH3 établissent des interactions protéine-protéine avec des domaines riches en proline. Ces interactions sont généralement des intermédiaires pour la transmission d'un signal intracellulaire déclenché par une cascade de transduction (Pawson, 1995). Il a été démontré que Abp1p interagit avec Srv2p via ses motifs SH3. Srv2p est une protéine qui lie aussi bien l'actine-G que l'adénylate cyclase. Cette dernière régule le taux de AMPc dans la cellule (Lila et Drubin, 1997). Abp1p serait responsable de la bonne localisation intracellulaire de Srv2p alors que Srv2p stimulerait la polymérisation de l'actine.

Le gène *ABP1* n'est pas essentiel à la cellule. La délétion de ce gène n'est pas létale et aucun phénotype particulier est observé (Drubin *et al.*, 1990). Ces résultats ont suggéré que le produit d'un autre gène peut compenser la déplétion de Abp1p. Un criblage génétique (la sélection synthétique létale) a permis d'identifier un gène indispensable à la survie de la cellule lors de la délétion de *ABP1*. Le gène *SLA1* est nécessaire pour assurer la survie de la cellule en absence de *ABP1* (Holtzman *et al.*, 1993).

1.3.1.2.2 *Sla1p*

Le gène *SLA1* de *Saccharomyces cerevisiae*, initialement identifié comme étant un cadre de lecture ouverte sur le chromosome II, code pour une protéine de 1244 résidus d'acide aminé ou de 136 kD (Delaveau *et al.*, 1992). *Sla1p* peut être divisée en trois domaines distincts (Holtzman *et al.*, 1993).

En position N-terminale, *Sla1p* possède un domaine qui contient trois motifs SH3, le domaine SH3 (acides aminés 1 à 401). De plus, *Sla1p* possède un domaine central riche en acides aminés hautement chargés, le domaine chargé (acides aminés 402 à 621). Enfin, en position C-terminale, *Sla1p* possède un domaine qui est

constitué en majeure partie d'acides aminés non chargés, le domaine bindin (acides aminés 622 à 1244). Ce dernier domaine est composé de 16 motifs présentant des homologies de séquence. Ces motifs (TGGAMMPQ) ont aussi été retrouvés chez Pan1p, une protéine impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine lors de la cytokinèse (Tang et Cai, 1996), et chez la protéine bindin du sperme de l'oursin. La protéine bindin semble impliquée dans la fusion de vésicules de phospholipides (Glabe, 1985; Ulrich *et al.*, 1998).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Sla1p est localisée au niveau de l'actine corticale et est essentielle à sa bonne organisation. La délétion de *SLA1* provoque différents phénotypes. La croissance de la cellule est sensible à la température. À 37 °C, il n'y a aucune croissance. La cellule présente aussi des défauts morphologiques en dépit du fait qu'elle ait une copie intacte du gène *ABP1*. Les cellules sont alors plus circulaires (Holtzman *et al.*, 1993).

Une souche de levure Δ *sla1* montre aussi une résistance accrue à la latrunculine-A, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine (Ayscough *et al.*, 1997). Cela suggère que Sla1p semble stimuler la dépolymérisation de l'actine. Cette hypothèse corrèle avec la mauvaise organisation de l'actine corticale chez cette souche mutante. Les points d'actine sont beaucoup plus larges que ceux d'une souche non mutée (Holtzman *et al.*, 1993). De plus, Sla1p est requise pour la localisation de Sla2p et Rho1p (Ayscough *et al.*, 1999).

1.3.1.2.3 Moteurs moléculaires

Le transport des protéines vers la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi nécessite des vésicules de transport. Chaque population de vésicules est associée à différents groupes de protéines (SNARE, COPI, COPII, Rab, etc.) et doit, en apparence, interagir avec les différentes structures du cytosquelette via des moteurs moléculaires (Schliwa, 1999).

Chez les cellules de mammifères, plusieurs éléments du cytosquelette d'actine sont impliqués dans le transport vésiculaire. La protéine p200/myosine II lie

de façon spécifique les vésicules qui bourgeonnent à partir de la saccule *trans* de l'appareil de Golgi (équivalent à la saccule tardive chez *Saccharomyces cerevisiae*) (Müsch *et al.*, 1997; Karki et Holzbaaur, 1999).

De plus, la protéine myosine Va interagissant aussi bien avec le cytosquelette d'actine qu'avec les microtubules (Huang *et al.*, 1999) est impliquée entre autre dans le transport des vésicules synaptiques (Mermall *et al.*, 1998). Des études récentes ont aussi démontré que certaines protéines liant le cytosquelette d'actine sont associées de près avec la membrane de l'appareil de Golgi et ses vésicules de transport. Les protéines Rab-kinésine, spectrine et ankyrine ont été identifiées (Beck et Nelson, 1998; De Matteis et Morrow, 1998; Echard *et al.*, 1998).

Le rôle potentiel des filaments d'actine et des ABP dans le transport vésiculaire n'est pas encore bien compris. L'interaction entre le cytosquelette d'actine et les vésicules de transport semble être très dynamique étant donné que cette interaction n'est pas facile à démontrer. Néanmoins, l'utilisation d'agents qui inhibent ou activent la polymérisation des filaments d'actine a servi généralement à démontrer le rôle du cytosquelette d'actine dans le transport vésiculaire. L'utilisation de la latrunculine-A a montré que la localisation des vésicules de sécrétion à la membrane plasmique est accomplie par un mécanisme actine dépendant (Ayscough *et al.*, 1997).

De plus, des études génétiques et biochimiques ont montré que des mutations dans le gène *ACT1* interrompent la sécrétion de l'invertase chez *Saccharomyces cerevisiae* (voir section 1.3.1). Myo2p semble aussi impliquée dans le transport des vésicules de sécrétion le long des filaments d'actine. Une souche de levure mutée dans le gène *MYO2* montre un défaut dans le transport post-Golgi de certaines protéines par une accumulation des vésicules destinées à la vacuole et pour l'exocytose (Govindan *et al.*, 1995).

Ces études démontrent bien que le cytosquelette d'actine participe au transport vésiculaire. Le rôle spécifique de l'actine et des ABP à divers stades de ce transport reste à être élucidé.

1.4 But de l'étude et stratégie utilisée

Récemment, notre laboratoire a démontré par pulse-chase que la souche de levure W303-1b manifeste une perturbation de la sécrétion de l'invertase comparativement à celle retrouvée chez W303-1b Δ slal (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). À 37 °C, W303-1b manifeste effectivement une inhibition partielle de la sécrétion de l'invertase. Par contre, chez les souches de levure W303-1b Δ slal, SEY6210 et SEY6210 Δ slal, la sécrétion de l'invertase dans l'espace périplasmique n'est pas perturbée.

Ces évidences expérimentales suggèrent que la perte de *SLA1* chez W303-1b corrige le défaut de sécrétion de l'invertase, ce qui semble indiquer que Slalp est importante dans le transport de certaines protéines entre le RE et l'appareil de Golgi (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). Le même résultat expérimental est obtenu lorsque W303-1b et W303-1b Δ slal expriment l'invertase de façon constitutive dans les cellules. Il semble alors que W303-1b contienne un gène défectueux responsable du phénotype observé chez cette souche de levure contrairement à SEY6210.

Les phénotypes que l'on observe chez une cellule après la délétion d'un gène ont contribué de façon significative à définir la fonction des protéines *in vivo*. Une méthode très utilisée pour identifier de nouveaux gènes est le clonage par complémentation. Cette méthode consiste à restaurer le phénotype d'une cellule qui a été perdu par une mutation inconnue dans son génome. Ainsi, notre travail consiste à identifier par complémentation un gène qui restaure la sécrétion de l'invertase chez la souche de levure GBY1. GBY1 sera transformée avec une banque d'ADN génomique de levure et l'identification de clones potentiels sera réalisée par immunobuvardage.

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Souches de levure et de bactérie

Le génotype des souches de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) utilisées au cours de cette étude est décrit dans le tableau I et celui de la souche bactérienne (*Escherichia coli*) est décrit dans le tableau II.

Tableau I Génotypes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Souche de levure	Génotype	Source
W303-1b	<i>MAT α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	D.Y. Thomas*
W303-1bΔ <i>sla1</i>	W303-1b <i>sla1::HIS3</i>	G. Boileau [§]
GBY1	W303-1b transformée avec pGL15- <i>SUC2F</i>	G. Boileau
GBY2	W303-1bΔ <i>sla1</i> transformée avec pGL15- <i>SUC2F</i>	G. Boileau
GBY3	GBY1 transformée avec YCp50-génome	Cette étude
GBY4	GBY1 transformée avec pRS316-génome	Cette étude

*Institut de recherche en biotechnologie, Montréal, Canada.

[§]Université de Montréal, Montréal, Canada.

Tableau II Génotype de *Escherichia coli*.

Souche de bactérie	Génotype
XL1-Blue [†]	<i>endA1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) lac recA1 relA1 supE44 thi-1 F'[proA⁺B⁺ lacI^qΔM15 Tn10(Tet^r)]</i>

[†]Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, Californie, États-Unis.

2.2 Milieux de culture et conditions de croissance

Saccharomyces cerevisiae croît à 30 °C dans le milieu complexe YPD (extrait de levure 1%, bacto-peptone 2%, glucose 2%) ou dans le milieu synthétique complet SC (sources d'azote dépourvues d'acides aminés 0,67%, glucose 2%, acides aminés et bases azotées cycliques appropriés selon les marqueurs d'auxotrophie de la souche de levure utilisée) tels que décrits par Sherman *et al.*, (1986). Pour ce qui est d'*Escherichia coli*, elle croît à 37 °C dans le milieu complexe 2YT (extrait de levure

1%, bacto-tryptone 1,6%, NaCl 0,5%, antibiotique approprié comme agent de sélection de l'hôte bactérien) tel que décrit par Sambrook *et al.*, (1989). À l'occasion, un agent solidifiant est ajouté à chacun des milieux de culture précédents (bacto-agar 2% pour YPD et SC; bacto-agar 1,5% pour 2YT), ce qui permet à *Saccharomyces cerevisiae* et à *Escherichia coli* de croître sur un milieu de culture solide dans des boîtes de Petri.

De plus, la densité cellulaire d'une culture en milieu liquide est mesurée à une longueur d'onde de 600 nm sur un spectrophotomètre Ultrospec 2000 UV/Visible (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède).

2.3 Plasmides et procédures de transformation

pGL15 (2 μ *ori*, *TRP1*) est un vecteur d'expression génique qui dérive du plasmide pVT103-U (Vernet *et al.*, 1987) dans lequel le gène *URA3* a été remplacé par le gène *TRP1* (Lesage *et al.*, manuscrit en préparation). Le gène *SUC2F*, composé d'une séquence qui code pour l'épitope FLAG (Brizzard *et al.*, 1994) à l'extrémité 3' du gène *SUC2*, a aussi été inséré dans le site de clonage *SacI-PstI* de pGL15 (pGL15-*SUC2F*: Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). De cette façon, *SUC2F* est exprimé de façon constitutive dans la levure sous la dépendance du promoteur *ADHI*.

YCp50-génome et pRS316-génome sont, quant à eux, des banques d'ADN génomique de *Saccharomyces cerevisiae* (Rose *et al.*, 1987; Sikorski et Hieter, 1989) introduites dans la souche de levure GBY1 rendue compétente à la transformation par l'acétate de lithium (Gietz *et al.*, 1992). Les cellules ainsi transformées croissent à 30 °C et sont sélectionnées sur un milieu de culture SC solide sans tryptophane et sans uracile. Ces banques consistent en de l'ADN génomique de levure digéré partiellement par *Sau3A* et, par la suite, inséré dans le site de clonage *BamHI* des plasmides centromériques YCp50 (*CEN4*, *ARS1*, *URA3*) et pRS316 (*CEN6*, *ARSH4*, *URA3*).

L'extraction de l'ADN plasmidique à partir de GBY3 et GBY4 est réalisée à l'aide de billes de verre (diamètre: 500 μm) (Hoffman et Winston, 1987). Cet ADN est ensuite purifié à l'aide de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) et précipité à l'éthanol 95% (Ausubel *et al.*, 1994). Finalement, l'ADN plasmidique est précipité de nouveau au *n*-butanol (Ausubel *et al.*, 1994) avant d'être utilisé pour la transformation de XL1-Blue.

La transformation de XL1-Blue est réalisée par électroporation (Dower *et al.*, 1988). Les cellules ainsi transformées croissent à 37 °C et sont sélectionnées sur un milieu de culture 2YT solide en présence d'ampicilline à une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$. L'électroporateur utilisé est le Gene Pulser™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Californie, États-Unis) dont les paramètres d'électroporation sont réglés à 2,5 kV, 25 μF et 200 Ω . L'extraction et la purification de l'ADN plasmidique à partir de XL1-Blue sont réalisées par lyse alcaline. Cet ADN est ensuite précipité à l'éthanol 95% (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4 Méthode enzymatique de séquençage

Le séquençage est réalisé selon la méthode didéoxy décrite par Sanger *et al.*, (1977). Les plasmides YCp50 et pRS316 (obtenus par lyse alcaline) ayant les fragments d'ADN d'intérêt sont tout d'abord dénaturés au NaOH 2N pour permettre ensuite l'hybridation de leurs amorces (oligonucléotides) respectives.

Tableau III Oligonucléotides nécessaires au séquençage des fragments d'ADN d'intérêt.

YCp50	
<i>Oligo sens:</i>	5'- GGA GCC ACT ATC GAC TAC G -3'
<i>Oligo antisens:</i>	5'- CAT CGG TGA TGT CGG CGA TAT AG -3'
pRS316	
<i>Oligo sens:</i>	5'- CGA CTC ACT ATA GGG CGA ATT G -3'
<i>Oligo antisens:</i>	5'- CCT CAC TAA AGG GAA CAA AAG C -3'

L'élongation des amorces est réalisée par l'ADN polymérase T7 Sequenase (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, Illinois, États-Unis) et le [α - 35 S]dATP (Amersham Pharmacia Biotech Ltd., Buckinghamshire, Angleterre) est utilisé pour le marquage radioactif des chaînes naissantes d'ADN. Finalement, l'élongation se termine par l'incorporation d'un didéoxyribonucléoside triphosphate (ddNTP).

Les réactions de séquençage sont chauffées pendant 2 minutes à 95 °C et chargées sur un gel dénaturant de polyacrylamide (Tris base 89 mM, acide borique 89 mM, EDTA 2 mM pH 8, urée 1,4 M, solution d'acrylamide/bis 19:1 6%). Après l'électrophorèse, le gel est séché sur un papier Whatman 3MM. Finalement, le gel est autoradiographié sur un film (Fuji medical X-ray film: Fuji Photo Film Company Ltd., Tokyo, Japon) pendant 24 heures à 25 °C.

2.5 Immunobuvardage

W303-1b, W303-1b Δ *slal*, GBY1, GBY2, GBY3 et GBY4 en phase exponentielle de croissance ($A_{600 \text{ nm}} = 0,8-1,0$ D.O./ml) dans un milieu de culture YPD liquide ou SC liquide (selon la souche de levure utilisée) sont déposées sur un milieu YPD solide. Cette boîte de Petri est incubée 72 heures à 30 °C pour permettre l'apparition de colonies de levure. Une membrane de nitrocellulose (Millipore, Corporation, Bedford, Massachusetts, États-Unis) immergée préalablement dans une solution à 40 μ g/ml de zymolyase-100T (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japon) est déposée sur la boîte de Petri pendant 4 heures à 37 °C.

La membrane de nitrocellulose est enlevée, puis rincée avec un tampon TBS (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 150 mM). Elle est immergée dans un tampon TBSL (tampon TBS, lait en poudre 5%) pendant 60 minutes à 25 °C. Par la suite, la membrane est incubée 60 minutes à 25 °C avec un anticorps monoclonal de souris anti-M2 (Sigma Chemical Company, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) à une concentration finale de 1 μ g/ml dans un tampon TBS et lavée 3 x 20 minutes avec un tampon TBST (tampon TBS, tween 20 0,5%).

La membrane est incubée 60 minutes à 25 °C avec un anticorps polyclonal HRP-anti-IgG de souris (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Californie, États-Unis) dilué 1:5000 dans un tampon TBSTL et lavée 3 x 20 minutes avec un tampon TBST. Finalement, l'activité enzymatique de HRP est révélée par chimioluminescence (NEN™ Life Science Products Inc., Boston, Massachusetts, États-Unis) et détectée sur un film (Fuji medical X-ray film: Fuji Photo Film Company Ltd., Tokyo, Japon).

2.6 Pulse-chase

Le marquage métabolique de GBY1, GBY2, GBY3 et GBY4 est réalisé sur des cellules en phase exponentielle de croissance ($A_{600\text{ nm}} = 0,8-1,0$ D.O./ml) dans un milieu de culture SC liquide sans cystéine, sans méthionine, sans tryptophane et sans/avec uracile (selon le cas).

2.6.1 Sans préparation de sphéroplastes

12 D.O._{600 nm} de cellules sont alors prélevées, concentrées à 3 D.O._{600 nm}/ml dans un milieu SC liquide sans cystéine et sans méthionine et incubées 90 minutes à 30 °C. Ces mêmes cellules sont aussi incubées 90 minutes à 37 °C. Par la suite, elles subissent un marquage métabolique de 4 minutes à 37 °C utilisant 75 µCi/ml de [³⁵S]méthionine/cystéine (Trans³⁵S-label: ICN Pharmaceuticals Inc., Costa Mesa, Californie, États-Unis). La chasse métabolique est initiée par l'ajout de méthionine/cystéine et de (NH₄)₂SO₄ à une concentration finale de 5 mM et 10 mM respectivement. 1 ml de cellules est prélevé (ce qui correspond à 3 D.O._{600 nm}) et la chasse métabolique est terminée par l'ajout de NaN₃ froid à une concentration finale de 10 mM. Les cellules sont ensuite lysées et préparées pour l'immunoprécipitation des protéines (IPP) telle que décrite par Wilcox et Fuller, (1991).

L'IPP de l'invertase-flag est réalisée pendant 12 heures à 4 °C dans 500 µl de tampon IPP (Tris-HCl 50mM pH 8, NaCl 150mM, triton X-100 1,5%) contenant 3 µl d'un anticorps monoclonal de souris anti-M2 (Sigma Chemical Company, Saint-Louis, Missouri, États-Unis). Par la suite, 0,5 µl d'un anticorps

polyclonal de lapin anti-IgG de souris (DAKO Corporation, Carpinteria, Californie, États-Unis) est ajouté à cette IPP et elle est incubée de nouveau 60 minutes à 4 °C. 30 µl de billes (protéine G-agarose: Sigma Chemical Company), préalablement lavées avec 500 µl de tampon IPP (2 x 30 minutes), sont encore ajoutées à cette IPP et elle est incubée de nouveau 60 minutes à 4 °C. Les protéines immunoprécipitées sont alors lavées successivement avec 500 µl de tampon de lavage (tampon IPP, SDS 0,1%) et 500 µl de tampon invertase (tampon IPP, NaCl 150 mM, SDS 0,1%), solubilisées pendant 3 minutes à 100 °C dans 50 µl de tampon de chargement (Tris-HCl 0,35 M pH 6,8, SDS 10,28%, glycérol 36%, DTT 0,6 M, β-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,012%) et chargées sur un gel SDS-PAGE 8% (Laemmli, 1970).

Après l'électrophorèse, le gel est immergé successivement dans un tampon de fixation (méthanol 40%, acide acétique 10%) et dans un tampon enlightning™ (NEN™ Life Science Products Inc., Boston, Massachusetts, États-Unis) pendant 30 minutes chacun. Le gel est ensuite séché sur un papier Whatman 3MM. Finalement, le gel est autoradiographié sur un film BioMax MS utilisant un écran BioMax TranScreen LE (Eastman Kodak Company, Rochester, New-York, États-Unis) pendant 4 heures à -80 °C.

2.6.2 Avec préparation de sphéroplastes

20 D.O._{600 nm} de cellules sont prélevées et converties en sphéroplastes par l'action de la zymolyase-100T (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japon) pendant 90 minutes à 30 °C (Govindan *et al.*, 1995). Les sphéroplastes sont ensuite incubés 90 minutes à 30 °C et 90 minutes à 37 °C dans un tampon de marquage (milieu SC liquide sans cystéine et sans méthionine, glucose 2%, sorbitol 1 M, pipes 20 mM pH 6,5). Les sphéroplastes sont centrifugés (5 minutes, 500 g), resuspendus dans 1 ml de tampon de marquage et incubés 15 minutes à 37 °C. Par la suite, ils subissent un marquage métabolique de 4 minutes à 37 °C utilisant 300 µCi/ml de [³⁵S]méthionine/cystéine (Trans³⁵S-label).

La chasse métabolique est initiée par l'ajout de méthionine/cystéine à une concentration finale de 5 mM. 250 μ l de sphéroplastes est prélevé (ce qui correspond à 5 D.O._{600 nm}) et la chasse métabolique est terminée par l'ajout de NaN₃ froid à une concentration finale de 10 mM. Les sphéroplastes sont ensuite lysés et préparés pour l'immunoprécipitation des protéines (IPP) telle que décrite par Govindan *et al.*, (1995). L'IPP de l'invertase-flag et l'électrophorèse des protéines immunoprécipitées sont réalisées de la même façon qu'elles sont décrites à la section 2.6.1.

CHAPITRE III

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Récemment, notre laboratoire a démontré par pulse-chase que la souche de levure W303-1b manifeste une perturbation de la sécrétion de l'invertase comparativement à celle retrouvée chez W303-1b Δ *sla1*. W303-1b montre effectivement à 37 °C un ralentissement de la sécrétion de l'invertase dans l'espace périplasmique (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). Le but de ce travail est donc d'identifier le gène défectueux responsable du phénotype observé chez W303-1b par une approche de complémentation génétique (voir section 1.4).

Dans cette étude, nous utiliserons les souches de levure GBY1 et GBY2. Elles dérivent respectivement de W303-1b et W303-1b Δ *sla1* et expriment de façon constitutive le gène *SUC2* codant pour l'invertase, car elles ont été transformées avec le plasmide pGL15-*SUC2F* (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). La sécrétion de l'invertase chez GBY1 et GBY2 est tout à fait comparable à celle observée chez les souches parentales (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). De plus, GBY1 et GBY2 présentent l'avantage de ne pas nécessiter de période d'induction de l'expression de *SUC2* avant la réalisation des expériences.

Au cours de notre étude, nous suivrons la sécrétion de l'invertase à 37 °C par immunobuvardage. L'invertase sera détectée par un anticorps contre l'épitope FLAG (anticorps anti-M2) puisque le vecteur d'expression génique pGL15-*SUC2F* possède le gène *SUC2* fusionné à une séquence nucléotidique codant pour l'épitope FLAG (voir section 2.3).

3.1 À 30 °C et à 37 °C, la formation des sphéropastes n'est pas perturbée

Pour faciliter la détection de l'invertase, les immunobuvardages seront réalisés sur des sphéropastes qui seront obtenus lors de la digestion de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* par la zymolyase. Cette paroi cellulaire est une structure rigide constituée de mannoprotéines, de β -1,3-glucanes, de β -1,6-glucanes et de chitines. Ces éléments sont tous interconnectés par des liens covalents. Cette paroi dicte la forme de la cellule et protège la levure de la lyse par un stress osmotique. Sans cette barrière, la cellule est sensible aux changements de pression

osmotique entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire (Cid *et al.*, 1995; Kapteyn *et al.*, 1999).

Cependant, des études antérieures démontrent qu'une souche de levure *Δslal* possède une paroi cellulaire plus épaisse comparativement à celle retrouvée chez une souche de levure ayant une copie intacte du gène *SLA1*. Ce résultat expérimental est cohérent avec la mauvaise localisation de Rho1p dans la cellule (Ayscough *et al.*, 1999). Rho1p est une petite GTPase qui régule l'activité enzymatique de la β -1,3-glucane synthase. Cette dernière est impliquée dans la biosynthèse de la paroi cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* (Qadota *et al.*, 1996). Nous avons donc jugé essentiel de vérifier si la formation des sphéroplastes chez GBY2 est perturbée par l'épaisseur inhabituelle de sa paroi cellulaire, suite à l'utilisation de la zymolyase. Cette dernière s'avérera un outil essentiel pour réaliser le clonage par complémentation.

À l'aide d'un microscope optique, nous pouvons facilement déterminer le pourcentage de cellules converties en sphéroplastes par la lyse de ces derniers dans une solution hypotonique. Pendant 90 minutes, 20 D.O._{600 nm} de cellules prélevées d'une culture de GBY1 et GBY2 en phase exponentielle de croissance ont été converties en sphéroplastes par l'action de la zymolyase à différentes températures (30 °C et 37 °C). 20 μ l de cette suspension de sphéroplastes ont été déposés sur une lame de microscope et recouverts d'une lamelle. Par la suite, une goutte d'H₂O a été déposée sur le côté de la lamelle. Au fur et à mesure que l'H₂O pénètre sous la lamelle, nous pouvons observer la lyse des sphéroplastes. Peu de temps avant leur lyse, ils gonflent. Après la lyse, des fragments de membranes plasmiques dispersés dans le champ optique du microscope sont visibles.

Nous avons observé que le taux de cellules converties en sphéroplastes est de 100% tant à 30 °C qu'à 37 °C, car le taux de lyse des sphéroplastes est également de 100% (résultats non montrés). Chez GBY1 et GBY2, la formation des sphéroplastes n'est donc pas perturbée, malgré l'épaisseur différente de la paroi cellulaire chez ces deux souches de levure. À ces températures, le pouvoir d'action

de la zymolyase est aussi identique à des concentrations différentes (40 µg/ml et 120 µg/ml) (résultats non montrés).

Pour vérifier l'état métabolique des sphéroplastes obtenus précédemment, nous avons réalisé dans un second temps un pulse-chase. Les sphéroplastes ont ensuite été lysés après une chasse métabolique de 0 et 30 minutes terminée par l'ajout de NaN₃ froid. Les protéines obtenues ont alors été chargées sur un gel SDS-PAGE 8%, mais sans réaliser d'immunoprécipitation. L'autoradiographie montre que la [³⁵S]méthionine/cystéine est bien incorporée par les mécanismes de biosynthèse des protéines chez les sphéroplastes (Figure 5). Il y a un grand nombre de protéines marquées de façon radioactive aux différentes masses moléculaires et aucune différence n'est observée entre les deux souches.

3.2 Mise au point d'un test de détection rapide mettant en évidence l'inhibition partielle de la sécrétion de l'invertase à 37 °C chez GBY1

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la forme sécrétée de l'invertase réside dans l'espace périplasmique de la cellule. Cette enzyme, trop volumineuse pour traverser la paroi cellulaire, reste emprisonnée dans cet espace. Par contre, une portion de l'invertase est libérée dans le milieu extracellulaire suivant la digestion enzymatique de la paroi cellulaire par la zymolyase (Esmon *et al.*, 1987; Reddy *et al.*, 1988).

Nous avons donc voulu mettre au point un test de détection rapide utilisant le traitement de la zymolyase et l'immunobuvardage pour mettre en évidence l'inhibition partielle de la sécrétion de l'invertase à 37 °C chez GBY1. Ceci permettra éventuellement de cribler des levures transformées avec une banque d'ADN génomique. GBY1 et GBY2 ont été utilisées pour cette mise au point, car des résultats de pulse-chase avaient déjà permis de montrer une sécrétion différente de l'invertase dans ces deux souches de levure (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation).

Nous avons donc tenté de démontrer si, effectivement, le transport de l'invertase vers la membrane plasmique est perturbé à 37 °C chez GBY1. Une boîte de Petri sur laquelle ont crû des colonies de levure de type W303-1b, GBY1 et GBY2 a été recouverte pendant 4 heures à 37 °C d'une membrane de nitrocellulose. Cette membrane avait été immergée préalablement dans une solution de zymolyase à 40 µg/ml. Par la suite, la présence de l'invertase sur cette membrane a été détectée par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps anti-M2.

L'autoradiographie révèle fortement la présence d'invertase libérée par l'action de la zymolyase et liée sur la membrane de nitrocellulose chez GBY2 (Figure 6). L'intensité des signaux de GBY1 correspond à celui de W303-1b, une souche de levure n'exprimant pas l'invertase suivie de l'épitope FLAG. Ceci met donc en évidence la perturbation du transport de l'invertase vers l'espace périplasmique chez GBY1 à 37 °C.

De plus, l'intensité des signaux est significative quant à la quantité d'invertase liée sur la membrane de nitrocellulose. Chaque colonie de levure dans la boîte de Petri correspond à 1 µl prélevé d'une culture en phase exponentielle de croissance concentrée à un 1,0 D.O._{600 nm}/ml ou 2,0 D.O._{600 nm}/ml (Figure 6). Le signal est beaucoup plus intense où il y a une concentration plus élevée de cellules sécrétant l'invertase.

Pour vérifier la possibilité d'utiliser ce test de détection rapide pour identifier par complémentation un gène qui restaure la sécrétion de l'invertase chez GBY1, nous avons tenté de différencier GBY2 de GBY1 dans une culture mixte. Selon l'intensité des signaux obtenus sur les autoradiographies (Figure 7A et B), 58 (13 + 45) colonies de levure ont été repiquées en milieu SC liquide sans tryptophane et sans histidine. Ce milieu de culture permet de sélectionner les levures ayant les gènes *HIS3* et *TRP1* fonctionnels. Il s'est avéré que toutes les colonies de levure repiquées étaient de type GBY2, car cette souche de levure possède *HIS3* remplaçant le gène *SLA1* dans son génome (voir section 2.1) et *TRP1* situé dans le plasmide pGL15-*SUC2F* (voir section 2.3).

3.3 Identification par complémentation de deux clones qui restaurent la sécrétion de l'invertase à 37 °C

Nous avons donc utilisé le test de détection rapide pour cribler des levures transformées avec une banque d'ADN génomique (YCp50-génome et pRS316-génome). Il faut aussi préciser que l'ADN qui a servi à construire les deux banques d'ADN génomique ne provient pas de W303-1b, car notre hypothèse stipule que le génome de cette souche de levure contient un gène défectueux responsable de l'inhibition partielle de la sécrétion de l'invertase.

De plus, les deux plasmides centromériques utilisés (YCp50 et pRS316) sont des vecteurs de clonage qui peuvent se répliquer aussi bien chez la levure que chez la bactérie (Figure 8A et B). Dans la cellule, le nombre de copies d'un plasmide centromérique est égal à un. L'élément *CEN* de ces plasmides a pour rôle d'augmenter leur stabilité pendant la mitose et la méiose de la levure (moins de 1% de perte du plasmide par cellule par génération). (Rose *et al.*, 1987; Sikorski et Hieter, 1989).

YCp50-génome et pRS316-génome ont donc été utilisés pour transformer GBY1 donnant respectivement GBY3 et GBY4. Nous avons criblé 5000 colonies de levure de GBY3 et de GBY4 afin d'identifier des clones où la sécrétion de l'invertase dans l'espace périplasmique est rétablie. 2500 colonies de levure correspondent approximativement au nombre de colonies nécessaires pour mettre à l'épreuve tous les gènes possibles du génome de *Saccharomyces cerevisiae*. Deux clones ont été identifiés (Figure 9).

L'autoradiographie révèle la présence d'invertase liée à la membrane de nitrocellulose chez GBY2 et chez les deux clones inconnus. Ces inconnus semblent donc restaurer la sécrétion de l'invertase à 37°C. Le transport de l'invertase vers l'espace périplasmique n'est plus perturbé. W303-1b est présent à titre de contrôle négatif. L'intensité du signal de GBY1 correspond encore une fois à celui de W303-1b. Les deux inconnus proviennent de la souche de levure GBY3 (GBY3-1 et GBY3-2).

3.4 Mise en évidence par pulse-chase de la restauration de la sécrétion de l'invertase à 37 °C chez GBY3-1 et GBY3-2

Pour étudier la biosynthèse et le transport de l'invertase, un pulse-chase a été réalisé sur des cellules intactes de type GBY1, GBY2, GBY3-1 et GBY3-2. Nous avons tenté de démontrer que le transport de l'invertase vers l'espace périplasmique est bel et bien rétabli à 37 °C chez GBY3-1 et GBY3-2. Les cellules ont été lysées après une chasse métabolique de 0, 2, 5 et 30 minutes terminée par l'ajout de NaN_3 froid. L'invertase a été immunoprécipitée par l'anticorps anti-M2. Les protéines immunoprécipitées ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 8%.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, nous pouvons immunoprécipiter deux formes de l'invertase: la forme RE et la forme sécrétée (Orlean *et al.*, 1991). Dans notre étude, la forme RE a une masse moléculaire entre 80 et 86 kDa résultant de l'acquisition des chaînes oligosaccharidiques *N*-liées dans le RE. L'invertase a des sites de glycosylation qui sont toujours glycosylés, d'autres qui ne le sont que quelquefois et certains qui ne le sont jamais (Reddy *et al.*, 1988). La forme sécrétée, quant à elle, a une masse moléculaire entre 130 et 150 kDa résultant de cette glycosylation hétérogène dans le RE. Elle possède entre 10 et 13 chaînes oligosaccharidiques *N*-liées qui sont progressivement modifiées par les glycosyltransférases et les glycosidases résidant dans les différentes saccules de l'appareil de Golgi.

Chez GBY2, GBY3-1 et GBY3-2, les autoradiographies montrent que presque tout l'invertase se trouve sous la forme sécrétée après 5 minutes de chasse métabolique à 37 °C (Figure 10B, C et D). Par contre, l'invertase apparaît à une masse correspondant à la forme RE après 30 minutes de chasse métabolique à 37 °C chez GBY1 (Figure 10A). Nous pouvons même distinguer deux bandes distinctes qui résultent possiblement de l'acquisition des chaînes oligosaccharidiques *N*-liées dans le RE (Figure 10A). À la lumière de ces résultats, il semble que la sécrétion de l'invertase est rétablie à 37 °C chez GBY3-1 et GBY3-2 (Figure 10C et D).

3.5 Identification des gènes qui restaurent la sécrétion de l'invertase à 37 °C chez *GBY3-1* et *GBY3-2*

Pour chaque clone inconnu, le fragment d'ADN génomique de levure est inséré dans le plasmide centromérique YCp50. Nous avons réalisé leur séquençage selon la méthode didéoxy décrite par Sanger *et al.*, (1977) afin de connaître le(s) gène(s) qui semble(nt) rétablir la sécrétion de l'invertase chez *GBY3-1* et *GBY3-2*.

Maintenant, tout le génome de *Saccharomyces cerevisiae* est séquencé et nous pouvons le retrouver sur la base de données "Saccharomyces Genome Database" (SGD) disponible sur internet (Figure 11 pour connaître le site WEB). Une cinquantaine de nucléotides situés à chaque extrémité des fragments d'intérêt ont suffi pour connaître entièrement leur séquence lors de notre recherche sur SGD. Nous avons constaté que les deux fragments d'ADN génomique sont identiques (Figure 11). Une cartographie des séquences d'ADN à l'aide d'endonucléases de restriction a aussi confirmé cette évidence (résultats non montrés).

À l'aide de SGD, l'unique fragment d'ADN génomique identifié est un morceau du chromosome IX de 3681 pb (Figure 11). Il contient trois gènes: *ECM37*, *YIL145C* et *TID3*. Seul le gène *YIL145C* possède un cadre de lecture ouverte (ORF) entier dans ce fragment d'ADN génomique. Il code pour une protéine de 345 résidus d'acide aminé. Les ORFs des gènes *ECM37* et *TID3* codent pour des fragments de protéines de 275/529 et 185/691 résidus d'acide aminé respectivement.

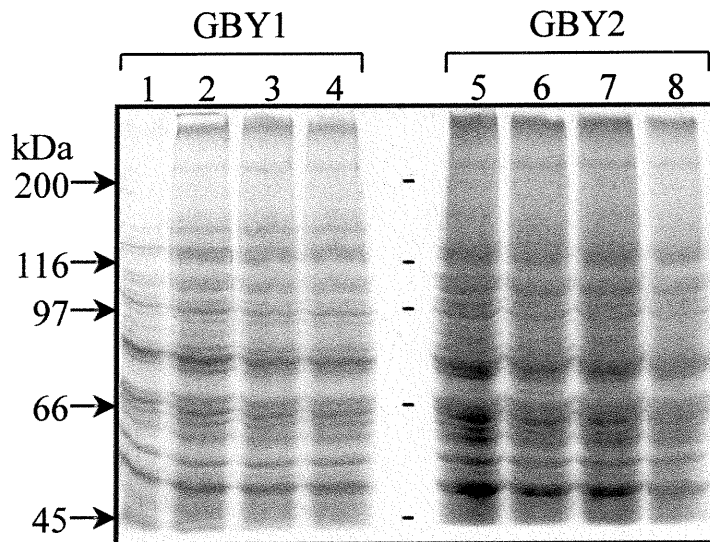


Figure 5 Analyse de la synthèse des protéines par pulse-chase.

GBY1 et GBY2 ont été converties en sphéroplastes par l'action de la zymolyase à une concentration de 40 $\mu\text{g/ml}$ à 30 °C ou à 37 °C pendant 90 minutes. Par la suite, ces sphéroplastes ont subi un marquage métabolique de 4 minutes avec du Trans^{35} -label et une chasse métabolique de 0 et 30 minutes. Ils ont alors été lysés et les protéines obtenues ont été chargées sur un gel SDS-PAGE 8%.

(1 et 5) Pulse-chase à 30 °C et chasse métabolique de 0 minute.

(2 et 6) Pulse-chase à 30 °C et chasse métabolique de 30 minutes.

(3 et 7) Pulse-chase à 37 °C et chasse métabolique de 0 minute.

(4 et 8) Pulse-chase à 37 °C et chasse métabolique de 30 minutes.

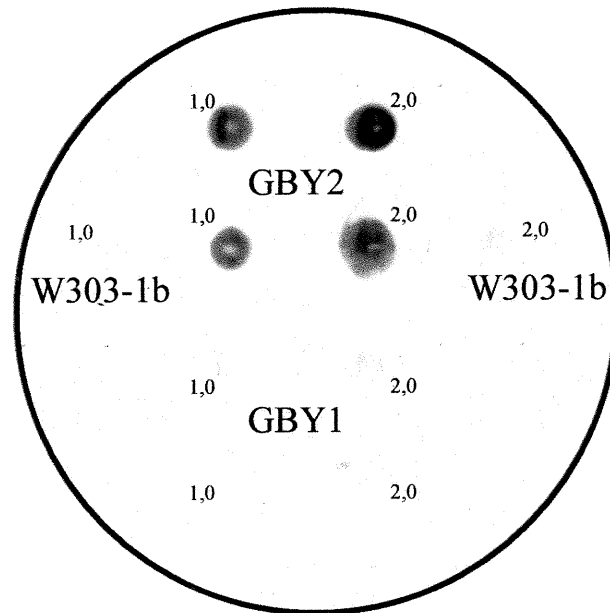


Figure 6 Analyse de la sécrétion de l'invertase par immunobuvardage pour mettre au point un test de détection rapide.

Chaque colonie de levure correspond à 1 μ l prélevé d'une culture en phase exponentielle de croissance concentrée à 1,0 D.O._{600 nm}/ml ou à 2,0 D.O._{600 nm}/ml. Ce 1 μ l a été déposé sur le milieu de culture YPD solide. L'invertase a été détectée par un anticorps contre l'épitope FLAG (anticorps monoclonal anti-M2) sur une membrane de nitrocellulose qui avait été déposée sur les colonies de levure pendant 4 heures à 37 °C.

Cette analyse a été réalisée trois fois avec succès.

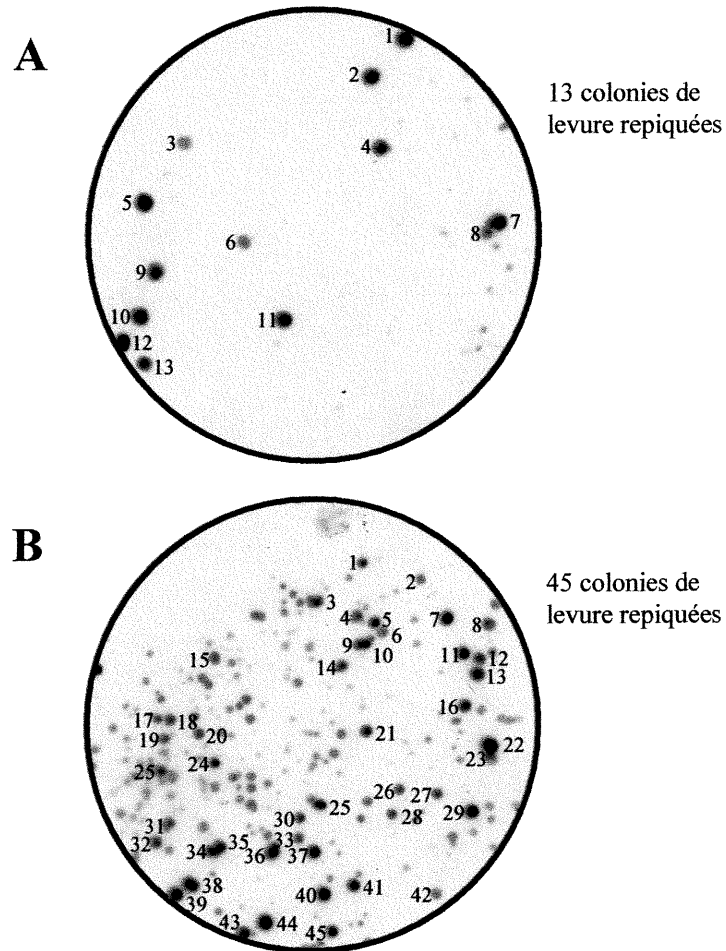


Figure 7A et B Analyse de la sécrétion de l'invertase par immunobuvardage pour différencier GBY2 de GBY1 dans une culture mixte.

Un nombre égal de cellules ont été prélevées d'une culture en milieu liquide de GBY1 et de GBY2, puis déposées sur le même milieu de culture YPD solide. Par rapport à A, 4 fois plus de cellules ont été déposées sur la boîte de Petri B. L'invertase a été détectée par un anticorps contre l'épitope FLAG (anticorps monoclonal anti-M2) sur une membrane de nitrocellulose qui avait été déposée sur les colonies de levure pendant 4 heures à 37 °C. Chaque numéro désigne la colonie de levure qui a été repiquée en milieu de culture SC liquide sans tryptophane et sans histidine.

Cette analyse a été réalisée trois fois avec succès.

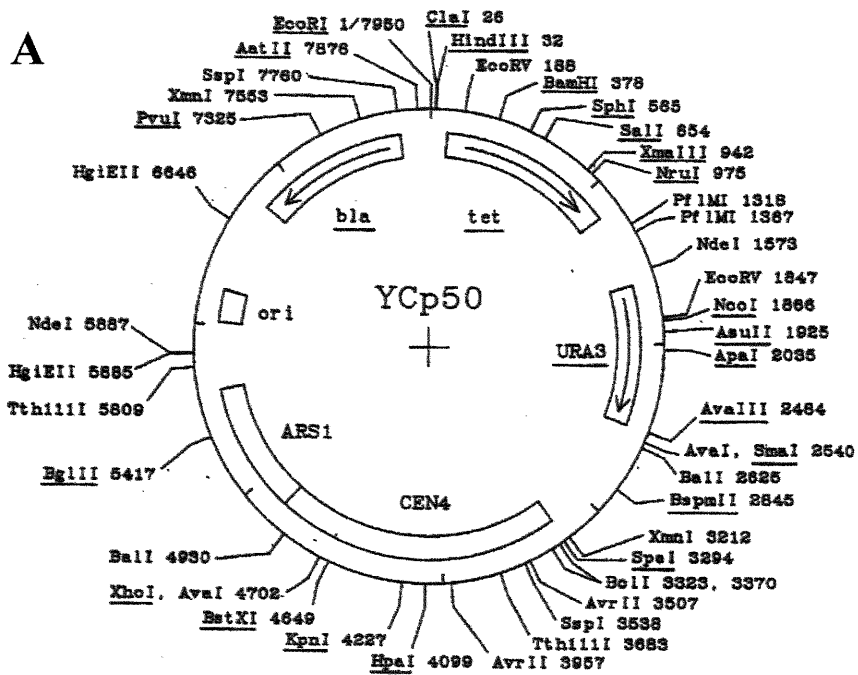


Figure 8A Carte de restriction du plasmide centromérique YCp50.

YCp50 est de 7950 pb et les sites de restriction uniques sont soulignés. Les nombres correspondent à la première pb du site de restriction reconnu par l'endonucléase.

Tirée de Rose *et al.*, (1987).

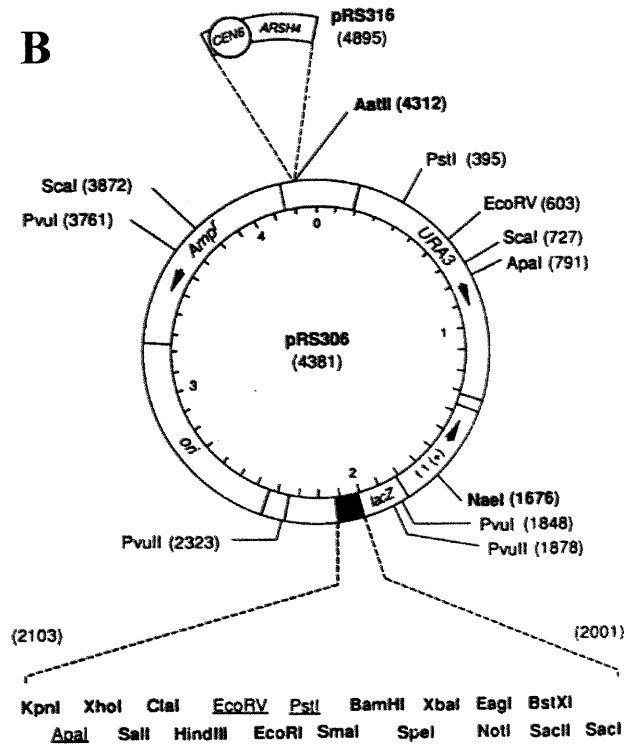


Figure 8B Carte de restriction du plasmide centromérique pRS316.

pRS316 est de 4895 pb et les sites de restriction uniques sont en caractère gras. Les nombres correspondent à la première pb du site de restriction reconnu par l'endonucléase.

Tirée de Sikorski et Hieter, (1989).

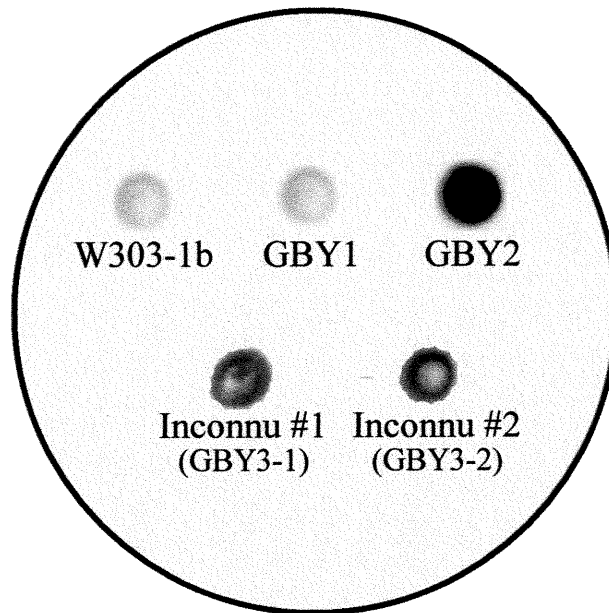


Figure 9 Analyse de la sécrétion de l'invertase par immunobuvardage chez les deux clones inconnus (GBY3-1 et GBY3-2).

Chaque colonie de levure correspond à 1 μ l prélevé d'une culture en phase exponentielle de croissance concentrée à 2,0 D.O._{600 nm}/ml. Ce 1 μ l a été déposé sur le milieu de culture YPD solide. L'invertase a été détectée par un anticorps contre l'épitope FLAG (anticorps monoclonal anti-M2) sur une membrane de nitrocellulose qui avait été déposée sur les colonies de levure pendant 4 heures à 37 °C.

Cette analyse a été réalisée trois fois avec succès.

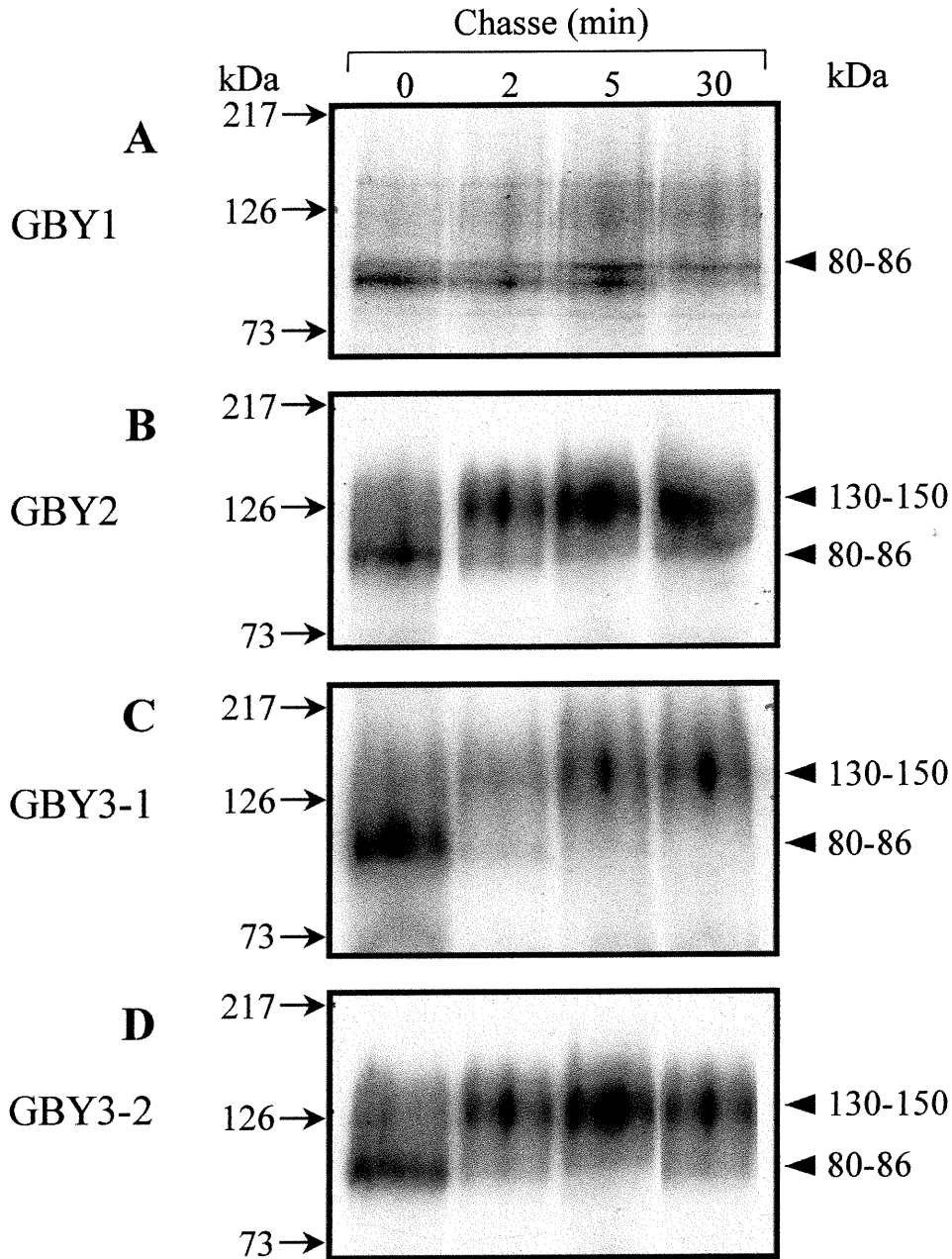


Figure 10A, B, C et D Analyse de la synthèse et du transport de l'invertase par pulse-chase chez GBY3-1 et GBY3-2.

Les cellules ont subi un marquage métabolique de 4 minutes à 37 °C avec du Trans³⁵-label et une chasse métabolique selon les temps indiqués. Par la suite, les cellules ont été lysées et les protéines obtenues ont été soumises à une immunoprécipitation. L'invertase a été immunoprécipitée par un anticorps contre l'épitope FLAG (anticorps monoclonal anti-M2). Les protéines immunoprécipitées ont alors été chargées sur un gel SDS-PAGE 8%. Les différentes formes de l'invertase sont indiquées par ►.

Cette analyse a été réalisée trois fois avec succès.

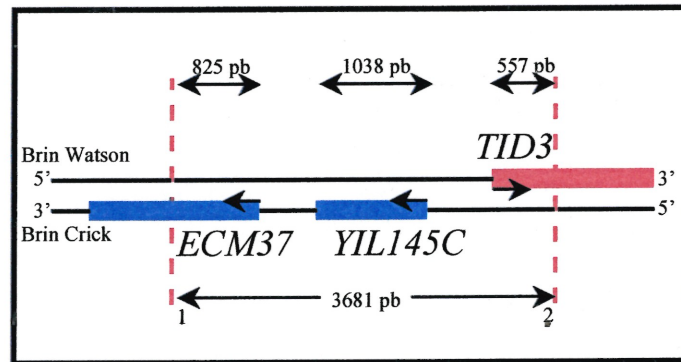


Figure 11 Fragment d'ADN génomique de levure (3681 pb) inséré dans le plasmide centromérique YCp50.

Le séquençage a été réalisé selon la méthode didéoxy à l'aide des oligonucléotides sens et antisens de YCp50. La direction du cadre de lecture ouverte (ORF) de chaque gène est indiquée par \rightarrow . Cette figure est inspirée de celle tirée de "Saccharomyces Genome Database" (SGD).

- (1) Site de clonage *Bam*H1.
- (2) Site de clonage *Sau*3A.

Site WEB de SGD: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Les cellules eucaryotes sont fortement compartimentées et le transport vectoriel (antérograde ou rétrograde) des macromolécules entre deux compartiments membranaires est réalisé par des vésicules de transport (Palade, 1975). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le système de sécrétion des protéines est très semblable à celui des cellules de mammifères dans sa capacité de replier les protéines, de les glycosyler et de les sécréter. Ces propriétés dépendent de la bonne organisation de la voie de sécrétion.

En effet, les protéines empruntant la voie de sécrétion ont pour caractéristique de posséder une séquence signal en position N-terminale responsable de leur translocation vers la lumière du RE. Le RE possède alors plusieurs protéines auxiliaires comme la peptidase signal, les chaperones (exemple: calnexine) et autres protéines spécialisées (exemple: PDI) qui régulent le repliement et la glycosylation. Par la suite, les protéines sont incluses dans des vésicules de transport et acheminées à la vacuole ou à la membrane plasmique via l'appareil de Golgi, un organite hautement glycolytique.

Depuis plusieurs années, les mécanismes moléculaires participant à la formation des vésicules de transport et au processus de fusion de ces vésicules avec la membrane du compartiment intracellulaire approprié sont de plus en plus connus (Rothman, 1994; Schekman et Orci, 1996; Pelham, 1999). De plus, les mouvements des vésicules de transport entre les différents compartiments membranaires sont facilités par des interactions protéine-protéine avec le cytosquelette. Ce dernier, utilisé comme rail, doit interagir avec certains groupes de protéines (SNARE, COPI, COPII, Rab, etc.) associées aux différentes populations de vésicules le long de la voie de sécrétion (Schliwa, 1999).

4.1 Rappel de l'hypothèse de travail

Ainsi, notre projet de recherche mise sur l'évidence expérimentale d'une relation possible entre Sla1p, une protéine liant l'actine (ABP), et la sécrétion de l'invertase (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). Ce travail est la suite d'une étude amorcée dans notre laboratoire pour caractériser un nouveau phénotype observé

chez W303-1b. Par pulse-chase, il a été démontré que W303-1b manifeste à 37 °C un ralentissement de la sécrétion de l'invertase dans l'espace périplasmique comparativement à SEY6210 (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). Des évidences expérimentales démontrent aussi que cette inhibition partielle de la sécrétion de l'invertase est corrigée par la délétion de *SLA1* chez W303-1b, ce qui semble indiquer que Sla1p est importante dans le transport de certaines protéines entre le RE et l'appareil de Golgi (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation).

Dans la littérature scientifique, une grande collection de souches de levure ayant leur système de sécrétion des protéines interrompu ou perturbé entre le RE et l'appareil de Golgi est disponible chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kaiser et Ferro-Novick, 1998). Ces souches ont la caractéristique particulière d'être mutées dans des gènes impliqués surtout lors de la formation des vésicules de transport au niveau du RE ou lors de la fusion des vésicules de transport avec la membrane de l'appareil de Golgi. Le phénotype observé chez W303-1b est très similaire à celui décrit par Schimmöller et ses collaborateurs concernant une souche de levure $\Delta emp24$ (Schimmöller *et al.*, 1995).

Ce groupe de recherche a montré que des cellules dépourvues de la protéine Emp24p manifeste aussi à 37 °C une diminution de la sécrétion de l'invertase dans l'espace périplasmique dû au ralentissement de son transport vers l'appareil de Golgi. L'effet de la délétion de *EMP24* sur la glycosylation de l'invertase est aussi très similaire à celle retrouvée chez W303-1b.

Les travaux de Schimmöller démontrent bien que l'invertase apparaît à une masse moléculaire correspondant à la forme RE chez une souche de levure $\Delta emp24$ après 30 minutes de chasse métabolique à 37 °C (Schimmöller *et al.*, 1995). De notre côté, le même modèle de glycosylation est observé chez W303-1b après l'immunoprécipitation de l'invertase (Figure 10A). De plus, la forme RE disparaît presque totalement chez W303-1b $\Delta sla1$ après 5 minutes de chasse métabolique à 37 °C, ce qui est causé par les modifications post-traductionnelles réalisées dans les différentes saccules de l'appareil de Golgi (Figure 10B). Ce dernier résultat

expérimental est identique à celui obtenu chez la souche de levure de type sauvage utilisée par Schimmöller. Dans les faits, il s'avère que Emp24p est une protéine transmembranaire qui joue le rôle d'un récepteur de cargos impliqué dans la sélection et l'entrée de l'invertase dans les vésicules de transport mantelées par COPII (Elrod-Erickson et Kaiser, 1996; Nakamura *et al.*, 1998).

De façon analogue aux travaux de Schimmöller et de ses collaborateurs, nos résultats expérimentaux suggèrent donc que la sécrétion de l'invertase est perturbée à un moment précédent son arrivée à l'appareil de Golgi. D'une part, le transport de l'invertase vers l'appareil de Golgi peut être retardé, c'est-à-dire que sa cinétique de transport n'est pas la même chez W303-1b et W303-1b Δ slal. D'autre part, il est possible que l'invertase ne soit que retenue dans le RE, sa sortie étant perturbée. De plus, la glycosylation incomplète de l'invertase observée chez W303-1b n'est pas causée par une défectuosité des mécanismes moléculaires de modifications post-traductionnelles. Les différentes enzymes de glycosylation du RE et de l'appareil de Golgi glycosylent CPY avec une cinétique normale (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation).

De plus, l'analyse réalisée par pulse-chase du transport intracellulaire de CPY, de la phéromone α et de Kex2p chez W303-1b et W303 Δ slal est cohérente avec ce qui est décrit sur ce sujet dans la littérature scientifique (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). La perturbation du transport intracellulaire chez W303-1b n'est donc pas généralisée, mais spécifique à certaines protéines.

W303-1b peut aussi croître dans un milieu de culture contenant du raffinose comme seule source de carbone (résultats non montrés). L'invertase hydrolyse le raffinose extracellulaire en fructose, galactose et glucose, des sucres que la levure peut importer à l'intérieur du cytoplasme. Ceci suggère donc qu'une infime quantité d'invertase active est toujours sécrétée chez W303-1b. Il faut donc considérer qu'il peut aussi exister chez la levure plusieurs voies possibles de transport des protéines entre les divers compartiments membranaires. Si le transport protéique est interrompu ou perturbé à un endroit précis le long de la voie de sécrétion, les

protéines ont possiblement accès aux compartiments membranaires suivants par une voie de contournement. Cette possibilité confirme l'hypothèse que le transport séquentiel des cargos le long de la voie de sécrétion peut être régulé par des récepteurs de cargos spécifiques (Pagano *et al.*, 1999), mais soulève l'hypothèse que la perte de la fonctionnalité de l'un d'eux peut être partiellement compensée par un autre, affectant la cinétique de transport de certaines protéines.

Pour mieux comprendre l'implication de Sla1p dans le transport des protéines au niveau de la voie de sécrétion, ce qui permettra d'élaborer de nouvelles hypothèses concernant l'organisation du système de sécrétion chez *Saccharomyces cerevisiae*, notre hypothèse de travail mise sur l'identification d'un gène défectueux responsable du défaut de sécrétion observé chez W303-1b, probablement à la suite d'une mutation non étudiée à ce jour dans son génome. Comme la délétion de *SLA1* chez W303-1b supprime l'inhibition partielle de la sécrétion de l'invertase (Figure 10B), les liens moléculaires qui peuvent exister entre le cytosquelette et la machinerie protéique régulant le transport des protéines restent à être élucidés.

4.2 Méthodologie utilisée: la complémentation génétique

Chez la levure, le clonage par complémentation consiste à restaurer le phénotype d'une cellule qui a été perdu par une mutation inconnue dans son génome en transformant cette cellule avec une banque d'ADN génomique. Au cours de notre étude, nous avons utilisé les souches de levure GBY1 et GBY2 exprimant de façon constitutive l'invertase (voir section 2.3), car elles dérivent respectivement de W303-1b et de W303-1b Δ *sla1* transformées avec le plasmide pGL15-*SUC2F* (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation). GBY1 et GBY2 ne requièrent donc pas l'induction de la copie chromosomique du gène *SUC2* avant la réalisation des expériences.

Misant sur cet avantage, nous avons mis au point un test de détection rapide utilisant le traitement de la zymolyase et l'immunobuvardage pour mettre en évidence l'inhibition partielle de la sécrétion de l'invertase à 37 °C (Figure 6), étant donné que la sécrétion de l'invertase chez GBY2 et GBY1 est tout à fait comparable à celle observée chez les souches parentales (Bellan *et al.*, manuscrit en préparation;

Figure 10A et B). En réalisant le test de détection rapide, très peu d'invertase est libérée dans le milieu extracellulaire par GBY1 comparativement à GBY2 (Figure 6).

De plus, notre test de détection rapide nous permet de différencier une colonie de levure de type GBY1 parmi des colonies de levure de type de GBY2 dans une culture mixte (Figure 7A et B). Il est donc facile de pouvoir identifier de façon qualitative une colonie de levure qui restaure la sécrétion de l'invertase à un taux comparable à GBY2 en transformant GBY1 avec YCp50-génome et pRS316-génome pour donner respectivement GBY3 et GBY4 (voir section 2.3).

YCp50-génome et pRS316-génome sont des banques d'ADN génomique de levure construites avec les plasmides centromériques YCp50 et pRS316 (Figure 8A et B). Ces banques d'ADN génomique ont été construites de façon à avoir des fragments d'ADN d'une taille moyenne de 5600 pb obtenus à partir d'une digestion partielle du génome de *Saccharomyces cerevisiae* (ayant 14×10^6 pb à l'état haploïde) par *Sau3A*. Il faut aussi préciser que cet ADN génomique ne provient pas de W303-1b, mais de la souche de levure MC1061 qui dérive de la souche parentale S288C (ATCC: <http://www.atcc.org>). Ce choix a été nécessaire, car notre hypothèse de travail stipule que le génome de W303-1b contient un gène défectueux responsable du défaut de sécrétion observé chez cette souche de levure.

Donc, le génome entier sera représenté par 2500 fragments d'ADN insérés dans les plasmides centromériques YCp50 et pRS316. Par conséquent, il faut 2500 colonies de levure pour mettre à l'épreuve tous les gènes possibles du génome de *Saccharomyces cerevisiae* lors de notre criblage par complémentation génétique en utilisant le test de détection rapide. En d'autres mots, il faut 2500 recombinants individuels pour que la chance de trouver un segment d'ADN qui restaure la sécrétion soit de plus de 99%. Finalement, 5000 colonies de levure ont été criblées par complémentation génétique pour chacune des souches de levure de type GBY3 et GBY4.

4.3 Deux clones identiques (*GBY3-1* et *GBY3-2*)

En utilisant le test de détection rapide, nous avons clairement identifié deux clones (*GBY3-1* et *GBY3-2*) qui sécrètent de l'invertase dans le milieu extracellulaire (Figure 9). Par la suite, *GBY3-1* et *GBY3-2* ont été soumises à une analyse par pulse-chase. Effectivement, ces analyses démontrent que presque tout l'invertase se trouve sous la forme sécrétée après 5 minutes de chasse métabolique à 37 °C (Figure 10C et D).

À la lumière de ces résultats expérimentaux, il semble bien que la sécrétion de l'invertase soit rétablie à 37 °C chez *GBY3-1* et *GBY3-2*. Le modèle de glycosylation de l'invertase est très similaire à celui retrouvé chez *GBY2* (Figure 10B, C et D). Finalement, nous avons identifié les fragments d'ADN génomique qui restaurent la sécrétion de l'invertase chez *GBY3-1* et *GBY3-2* par séquençage selon la méthode didéoxy décrite par Sanger *et al.*, (1977) (Figure 11). À notre grande surprise, les deux fragments d'ADN génomique de 3681 pb sont identiques. Ces deux morceaux du chromosome IX contiennent trois gènes (*ECM37*, *YIL145C* et *TID3*) où seul le gène *YIL145C* possède un cadre de lecture ouverte (ORF) entier (Figure 11). Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a décrite l'existence de mutations potentielles dans ces gènes chez *W303-1b* et chez d'autres souches de levure.

4.4 Nature des gènes et leurs effets possibles sur la sécrétion de l'invertase

4.4.1 *ECM37*

Le gène *ECM37* code pour une protéine dont la fonction est inconnue, malgré qu'elle semble maintenir la bonne organisation de la paroi cellulaire (Lussier *et al.*, 1997). Dans notre étude, le fragment d'ADN génomique code pour 275 des 529 résidus d'acide aminé de *Ecm37p* (Figure 11). *Ecm37p* ne possède aucune similarité de séquence avec d'autres protéines. Toutefois, une souche de levure dans laquelle l'expression du gène *ECM37* est perturbée par l'insertion du transposon *Tn3::LEU2::lacZ* dans sa séquence codante démontre une hypersensibilité à la zymolyase (Lussier *et al.*, 1997).

Pour mesurer de façon quantitative cette sensibilité à la zymolyase, Lussier et ses collaborateurs ont déterminé le taux de lyse des sphéroplastes dans un temps donné par des mesures de densités cellulaires à une longueur d'onde de 600 nm. La diminution de $A_{600 \text{ nm}}$ reflète la proportion de sphéroplastes qui sont lysés dans une solution hypotonique. Dans notre étude, aucune différence significative a été observée entre GBY1 et GBY2 (résultats non montrés), ce qui nous porte à croire que *ECM37* n'est pas le gène défectueux recherché malgré l'expression d'une parcelle de la protéine.

4.4.2 *YIL145C*

L'ORF du gène *YIL145C* code pour une protéine de 345 résidus d'acide aminé (Figure 11). Cette protéine possède 38% de similarité (BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) au niveau de la séquence primaire en acides aminés avec la pantothénate synthétase (E.C. 6.3.2.1) de *Escherichia coli*. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la fonction de YIL145Cp n'est pas connue pour le moment. De plus, YIL145Cp ainsi que la pantothénate synthétase n'ont pas de structure tridimensionnelle (3D) connue. Ces protéines ne montrent aucune similarité de séquence significative avec des protéines ayant une structure 3D connue (PredictProtein: <http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>), ne pouvant, par exemple, déterminer leur site actif potentiel.

Chez *Escherichia coli*, la pantothénate est une vitamine essentielle pour la biosynthèse du cofacteur coenzyme A (CoA). Ce dernier est le transporteur universel des groupes acyles. Chez la bactérie, la pantothénate est synthétisée *de novo*. La pantothénate synthétase catalyse la synthèse du pantothénate à partir de la pantoate et de la β -alanine par un processus ATP dépendant (Cronan Jr *et al.*, 1982). Cependant, *Saccharomyces cerevisiae* et les cellules de mammifères sont incapables de synthétiser la pantothénate. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, elle est importée dans la cellule par un transporteur localisé à la membrane plasmique et codé par le gène *FEN2* (Stolz et Sauer, 1999).

Par homologie de fonctions avec la pantothénate synthétase, YIL145Cp pourrait être aussi impliquée dans la biosynthèse d'un transporteur de groupes acyles (notamment les lipides) au niveau de la voie de sécrétion. Jusqu'à maintenant, peu de choses sont connues sur le rôle des lipides dans le transport des protéines. Néanmoins, la distribution asymétrique des lipides au niveau des bicouches lipidiques soulève la possibilité que l'environnement lipidique joue un rôle critique dans le transport vésiculaire (De Camilli *et al.*, 1996). La meilleure évidence d'une relation entre la composition lipidique membranaire et la sécrétion des protéines est basée sur l'étude du gène *SEC14* (Bankaitis *et al.*, 1989; Bankaitis *et al.*, 1990; Fang *et al.*, 1998).

Chez les cellules eucaryotes, la composition lipidique membranaire est continuellement modifiée lors de la fusion d'une vésicule de transport avec un compartiment membranaire donné ou lors d'un échange, d'une bicouche à une autre, d'une molécule lipidique par un transporteur approprié. *SEC14* code pour une protéine faisant partie de la famille des PITP (Bankaitis *et al.*, 1989). Les PITP sont une classe de protéines cytoplasmiques et ubiquitaires chez les cellules eucaryotes. Elles catalysent l'échange de phospholipides entre deux membranes lipidiques *in vitro* (Cockcroft, 1998). En dépit d'une activité biochimique conservée, les PITP de levure et celles retrouvées chez les mammifères ne présentent aucune similarité de séquence (Cockcroft, 1998).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Sec14p est essentielle à la viabilité de la cellule. Elle agit comme un senseur de la composition en phospholipides des membranes de l'appareil de Golgi. Elle maintient un ratio phosphatidylinositol/phosphatidylcholine (PI/PC) suffisamment élevé et un haut niveau de diacylglycérol (DAG) pour que le transport vésiculaire à partir de l'appareil de Golgi ait lieu (McGee *et al.*, 1994; Kearns *et al.*, 1997). De plus, une souche de levure *sec14^Δ* est incapable de sécréter l'invertase (Bankaitis *et al.*, 1989). Pendant la formation des vésicules mantelées par COPI, Sec14p servirait simplement à échanger des molécules de PI ou de PC à partir de régions membranaires riches en PI ou PC vers le site de bourgeonnement des vésicules (Simon *et al.*, 1998). Cependant, il

n'est pas clair si PC ou DAG module le bourgeonnement (Siddhanta et Shields, 1998).

Ce réarrangement lipidique semble important pour que la vésicule de transport puisse se former et se détacher. L'environnement lipidique pourrait jouer un rôle structural en rendant la membrane lipidique plus souple, ce qui permettrait de faciliter la courbure induite par l'enveloppe protéique COPI lors des événements de vésiculation (Roth et Sternweis, 1997; Weigert *et al.*, 1999).

Ces environnements lipidiques constituent aussi une sorte de gradient lipidique local à l'intérieur de la membrane. Ce gradient pourrait aussi être reconnu par certaines protéines permettant leur entrée dans la vésicule ainsi que faciliter le recrutement de la machinerie protéique impliquée dans la formation des vésicules de transport par des interactions protéine-lipide (Roth et Sternweis, 1997). Il a déjà été suggéré que des micro-domaines de glycosphingolipide/cholestérol pourraient servir de plate-forme pour ancrer certaines protéines et les acheminer vers la surface apicale des cellules épithéliales (Simons et Ikonen, 1997).

Dans notre étude, il serait possible que la perte de fonctionnalité d'un présumé transporteur de groupes acyles soit responsable de la perturbation de la sécrétion de l'invertase, suite à une composition membranaire lipidique inadéquate au niveau du RE affectant ainsi la cinétique de sortie de l'invertase. De plus, il est intéressant de noter que PI est aussi impliqué dans plusieurs cascades de transduction qui stimulent le réarrangement du cytosquelette via la famille des GTPases Rho (Tapon et Hall, 1997). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la localisation de Rho1p est également dépendante de Sla1p (Ayscough *et al.*, 1999). La perturbation d'une cascade de transduction pourrait aussi expliquer que la sécrétion de l'invertase est restaurée par la perte de Sla1p chez W303-1b.

4.4.3 *TID3*

Le gène *TID3* code pour une protéine localisée près du kinétochore dont la fonction est inconnue (Wigge *et al.*, 1998). À l'aide des microtubules, le

kinétochore est une région spécialisée du chromosome impliquée dans leur déplacement (Winsor et Schiebel, 1997). Dans notre étude, le fragment d'ADN génomique code pour 185 des 691 résidus d'acide aminé de Tid3p (Figure 11). Tid3p possède aussi des domaines d'interactions protéine-protéine similaires à ceux retrouvés chez Hec1p (Dresser *et al.*, 1997). Cette dernière est une protéine nucléaire qui semble avoir un rôle dans la ségrégation des chromosomes pendant la mitose, une activité essentielle à la viabilité de la cellule (Zheng *et al.*, 1999). Comme W303-1b n'a pas de problème de croissance cellulaire, cela nous porte à croire que *TID3* n'est pas le gène défectueux recherché dans notre étude.

Dans la cellule, la ségrégation des chromosomes nécessite la présence des microtubules, un réseau de filaments constitué de tubuline (Winsor et Schiebel, 1997). Plusieurs laboratoires ont aussi démontré le rôle des microtubules dans le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi par l'utilisation du nocodazole, un agent qui inhibe la polymérisation des microtubules en liant la tubuline (Cole *et al.*, 1996; Presley *et al.*, 1997). De façon générale, le transport le long des microtubules est gouverné par un complexe protéique composé d'un moteur moléculaire liant les microtubules et d'une protéine intermédiaire ancrant le moteur moléculaire aux divers cargos (Hirokawa, 1998).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, deux classes de moteurs moléculaires ont été identifiées et caractérisées selon le sens de leur déplacement sur les microtubules: la kinésine et la dynéine. Les microtubules étant polarisés, l'extrémité (+) croît 2 à 3 fois plus rapidement que l'extrémité (-). La kinésine lie le cargo via le récepteur kinectine (Vallee et Sheetz, 1996) et se déplace de (-) vers (+). La dynéine, quant à elle, lie le cargo via le complexe protéique dynactine (Burkhardt *et al.*, 1997) et se déplace de (+) vers (-). Dans la cellule, les microtubules orientent le transport tandis que les moteurs moléculaires fournissent la force motrice.

Dans la littérature scientifique, plusieurs indices suggèrent une synergie d'action entre les microtubules et les filaments d'actine. Cependant, peu d'évidences expérimentales démontrent une interaction entre eux. Récemment, il a

été montré que la myosine Va interagit avec la kinésine KhcU, deux protéines impliquées dans le transport des vésicules synaptiques (Huang *et al.*, 1999). Cela amène de nouvelles informations sur la façon dont une vésicule de transport est acheminée au compartiment membranaire approprié par des moteurs moléculaires liant les microtubules ou les filaments d'actine. Actuellement, le mode d'action de l'interaction entre la myosine Va et KhcU sur l'activité de chacune est inconnue.

Il est possible que l'activité de l'un soit altérée ou prenne le contrôle selon le contexte cellulaire donné. Une vésicule de transport, rendue à l'extrémité d'un microtubule, peut être acheminée à sa destination finale ou au prochain microtubule par la liaison de la myosine aux filaments d'actine. Il est possible aussi que l'un des moteurs moléculaires ne soit que le cargo de l'autre.

Il a déjà été proposé que Tid3p pourrait être un présumé moteur moléculaire liant les microtubules (Chu *et al.*, 1998). Dans notre étude, il est peu probable que Tid3p soit impliquée dans le transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi étant donné sa localisation cellulaire. De plus, les différents domaines d'interactions protéine-protéine des moteurs moléculaires sont sujets à démontrer un phénotype "dominant négatif" lorsqu'ils sont surexprimés dans la cellule (Hirokawa, 1998). Dans notre cas, il est possible que l'expression d'une portion de Tid3p démontre un tel effet.

4.5 Conclusion et perspectives

Le gène *SLA1* a été identifié initialement par la sélection synthétique létale (Holtzman *et al.*, 1993). Il code pour une protéine cytoplasmique nécessaire, entre autre, à la bonne organisation de l'actine corticale. La délétion du gène *SLA1* rend la croissance de la cellule sensible à la température (Holtzman *et al.*, 1993). En dépit du fait que plusieurs ABPs ont été identifiées chez *Saccharomyces cerevisiae* et que leur importance a été démontrée de façon génétique, peu de choses sont connues sur la façon dont elles interagissent entre elles *in vivo* pour réguler l'organisation des filaments d'actine.

Il est bien documenté que plusieurs moteurs moléculaires tels que les kinésines et les dynéines lient les microtubules et qu'elles sont impliquées dans la sécrétion des protéines (Allan et Schroer, 1999; Karki et Holzbaur, 1999). Lorsque la cellule est en période de croissance active, la surface cellulaire est en expansion et la sécrétion des protéines est dirigée principalement vers le bourgeon en développement. Dans la littérature scientifique, plusieurs études ont aussi impliquées l'actine dans le transport des protéines, l'exocytose et l'endocytose (Bretscher *et al.*, 1994). Les premières évidences expérimentales liant de façon concrète l'actine et la sécrétion des protéines dérivent des phénotypes observés chez une souche de levure mutée dans le gène *ACT1* (voir section 1.3.1). Toutefois, peu de choses sont connues sur les moteurs moléculaires liant l'actine.

Par la suite, le rôle de l'actine dans le transport des protéines a davantage été exploré. Les conséquences phénotypiques de la délétion de plusieurs gènes codant pour des ABP ont déjà été évaluées. Ces gènes sont notamment *MYO1*, *MYO2*, *TPM1*, *PFY1*, *CAP1*, *SAC6*, *ABP1*. La délétion de ces gènes n'est pas létale pour la cellule, mais provoque à des degrés différents de sévérité des phénotypes au niveau de la distribution de l'actine corticale lors de la croissance polarisée de la cellule, la localisation de certaines protéines, la sécrétion de l'invertase, l'accumulation de vésicules de sécrétion et la morphologie de la cellule (Ayscough, 1998).

Dans notre étude, il est bien entendu que pour établir quel gène parmi *ECM37*, *YIL145C* et *TID3* rétabli la sécrétion de l'invertase, nous devrions répéter les expériences de pulse-chase et d'immunobuvardage avec chacun des gènes pris individuellement (études présentement en cours). Par la suite, il sera bénéfique de vérifier si, effectivement, il existe une mutation au niveau du gène en question chez W303-1b. L'amplification de l'ARN chez W303-1b par RT-PCR pourrait être la technique utilisée.

Un nombre croissant de protéines ont déjà été identifiées comme étant important dans la formation et le ciblage des vésicules à un compartiment

membranaire donné (Pfeffer, 1996). Cela inclus notamment: la protéine p115 (Nakamura *et al.*, 1997), la giantine (Sönnichsen *et al.*, 1998), Uso1p (Cao *et al.*, 1998; Sapperstein *et al.*, 1996), le complexe protéique TRAPP (Sacher *et al.*, 1998), la rabatine 5 (Stenmark *et al.*, 1995) et le complexe protéique RING (Rieder et Emr, 1997). La séquence primaire de ces composantes protéiques est souvent conservée parmi les eucaryotes. Cependant, les protéines ayant des fonctions similaires, mais à des étapes différentes de la voie de sécrétion ne partagent pas de grande similarité, suggérant que leur activité fonctionnelle est spécifique et dépendante de leur bonne localisation intracellulaire.

Finalement, il n'est pas clair comment le métabolisme de PI peut réguler le trafic vésiculaire et encore moins quel rôle YIL145Cp joue dans la cellule. Cependant, certaines études rapportent que les lipides perturbent de façon indirecte l'activité de Rho1p, une protéine qui stimule le réarrangement du cytosquelette et qui a des effets sur le transport vésiculaire en général (Roth et Sternweis, 1997; Tanaka et Takai, 1998). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la localisation de Rho1p est également dépendante de Sla1p (Ayscough *et al.*, 1999). Malgré un degré élevé de similarité entre la pantothénate synthétase et YIL145Cp, rien n'indique qu'elles ont nécessairement une fonction apparentée. Pour ce qui est de Tid3p, aucune étude la relie au transport des protéines dans la voie de sécrétion malgré qu'elle semble faire partie de la famille des kinésines.

Considérant les multiples domaines de Sla1p, nous proposons un modèle où Sla1p agit comme un lien protéique entre les membranes/vésicules de phospholipides et le cytosquelette d'actine. Nous pouvons donc élaborer un modèle où Sla1p pourrait interagir avec plusieurs protéines de la levure pour expliquer son rôle dans la voie de sécrétion. Les domaines SH3 de Sla1p pourraient lier à la fois des GTPases et des protéines du cytosquelette, conférant une spécificité et une directionnalité au transport vésiculaire antérograde. Par exemple, les protéines Rab pourraient servir de lien entre les vésicules, la membrane et le cytosquelette (Chavrier et Goud, 1999). Ainsi, il serait intéressant d'identifier des ligands potentiels pour ces domaines SH3. Or, il est connu que ces domaines lient des régions riches en proline.

Quant au domaine bindin, il pourrait favoriser la fusion des vésicules de transport avec la membrane de l'appareil de Golgi, une fois que ces vésicules ont atteint leur cible. Il est intéressant de noter que le domaine C-terminal de Sla1p contient 16 motifs ayant des homologies de séquence qui semblent interagir directement avec des vésicules de phospholipides *in vitro* (Glabe, 1985; Ulrich *et al.*, 1998). La liaison aux membranes serait réalisée entre le domaine bindin et le domaine cytoplasmique de certaines protéines membranaires. Un rôle semblable a déjà été proposé pour la comitine (Jung *et al.*, 1996).

CHAPITRE V

BIBLIOGRAPHIE

- Allan, B.B. et Balch, W.E. (1999). Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments. *Science* **285**, 63-66.
- Allan, V.J. et Schroer, T.A. (1999). Membrane motors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 476-482.
- Arnold, C.E. et Wittrup, K.D. (1994). The stress response to loss of signal recognition particle function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 30412-30418.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1994). Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, Inc., New-York.
- Ayscough, K.R. (1998). *In vivo* functions of actin-binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 102-111.
- Ayscough, K.R., Eby, J.J., Lila, T., Dewar, H., Kozminski, K.G., Drubin, D.G. (1999). Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1061-1075.
- Ayscough, K.R., Stryker, J., Pokala, N., Sanders, M., Crews, P., Drubin, D.G. (1997). High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A. *J. Cell Biol.* **137**, 339-416.
- Bankaitis, V.A., Aitken, J.R., Cleves, A.E., Dowhan, W. (1990). An essential role for a phospholipid transfer protein in yeast Golgi function. *Nature* **347**, 561-562.
- Bankaitis, V.A., Malehorn, D.E., Emr, S.D., Greene, R. (1989). The *Saccharomyces cerevisiae* *SEC14* gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J. Cell Biol.* **108**, 1271-1281.
- Barlowe, C. (1998). COPII and selective export from the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 67-76.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R. (1994). COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895-907.
- Barz, W.P. et Walter, P. (1999). Two endoplasmic reticulum (ER) membrane proteins that facilitate ER-to-Golgi transport of a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1043-1059.
- Beck, K.A. et Nelson, W.J. (1998). A spectrin membrane skeleton of the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 153-160.

- Botstein, D., Chervitz, S.A., Cherry, J.M. (1997). Yeast as a model organism. *Science* **277**, 1259-1260.
- Bremser, M., Nickel, W., Schweikert, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Hughes, C.A., Söllner, T.H., Rothman, J.E., Wieland, F.T. (1999). Coupling of coat assembly and vesicle budding to packaging of putative cargo receptors. *Cell* **96**, 495-506.
- Bretscher, A., Drees, B., Harsay, E., Schott, D., Wang, T. (1994). What are the basic functions of microfilaments? Insights from studies in budding yeast. *J. Cell Biol.* **126**, 821-825.
- Brizzard, B.L., Chubet, R.G., Vizard, D.L. (1994). Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. *Biotechniques* **16**, 730-735.
- Brodsky, J.L. et Schekman, R. (1993). A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J. Cell Biol.* **123**, 1355-1363.
- Bryant, N.J. et Stevens, T.H. (1998). Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 230-247.
- Burkhardt, J.K., Echeverri, C.J., Nilsson, T., Vallee, R.B. (1997). Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* **139**, 469-484.
- Cao, X., Ballew, N., Barlowe, C. (1998). Initial docking of ER-derived vesicles requires Usolp and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *EMBO J.* **17**, 2156-2165.
- Carlson, M. et Botstein, D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**, 145-154.
- Cereghino, J.L., Marcusson, E.G., Emr, S.D. (1995). The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of *VPS* gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol. Biol. Cell* **6**, 1089-1102.
- Chavrier, P. et Goud, B. (1999). The role of ARF and Rab GTPases in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 466-475.
- Chu, D.S., Pishvaee, B., Payne, G.S. (1996). The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**, 33123-33130.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O., Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.

- Cid, V.J., Durán, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C., Sánchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**, 345-386.
- Cockcroft, S. (1998). Phosphatidylinositol transfer proteins: a requirement in signal transduction and vesicle traffic. *Bioessays* **20**, 423-432.
- Cole, N.B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J., Lippincott-Schwartz, J. (1996). Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell* **7**, 631-650.
- Conibear, E. et Stevens, T.H. (1995). Vacuolar biogenesis in yeast: sorting out the sorting proteins. *Cell* **83**, 513-516.
- Conibear, E. et Stevens, T.H. (1998). Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 211-230.
- Cooper, A.A. et Stevens, T.H. (1996). Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *J. Cell Biol.* **133**, 529-541.
- Cowles, C.R., Odorizzi, G., Payne, G.S., Emr, S.D. (1997). The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* **91**, 109-118.
- Cronan Jr, J.E., Littel, K.J., Jackowski, S. (1982). Genetic and biochemical analyses of pantothenate biosynthesis in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **149**, 916-922.
- Crowley, K.S., Liao, S., Worrell, V.E., Reinhart, G.D., Johnson, A.E. (1994). Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* **78**, 461-471.
- De Camilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S., Novick, P. (1996). Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* **271**, 1533-1539.
- De Matteis, M.A. et Morrow, J.S. (1998). The role of ankyrin and spectrin in membrane transport and domain formation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 542-549.
- Dean, N. (1999). Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 309-322.
- Delaveau, T.H., Jacq, C., Perea, J. (1992). Sequence of a 12,7 kb segment of yeast chromosome II identifies a PDR-like gene and several new open reading frames. *Yeast* **8**, 761-768.

- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., Schekman, R. (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* **349**, 806-808.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Doyle, T. et Botstein, D. (1996). Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3886-3891.
- Dresser, M.E., Ewing, D.J., Conrad, M.N., Dominguez, A.M., Barstead, R., Jiang, H., Kodadek, T. (1997). *DMC1* functions in a *Saccharomyces cerevisiae* meiotic pathway that is largely independent of the *RAD51* pathway. *Genetics* **147**, 533-544.
- Drubin, D.G., Miller, K.G., Botstein, D. (1988). Yeast actin-binding proteins: evidence for a role in morphogenesis. *J. Cell Biol.* **107**, 2551-2561.
- Drubin, D.G., Mulholland, J., Zhu, Z., Botstein, D. (1990). Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature* **343**, 288-290.
- Echard, A., Jollivet, F., Martinez, O., Lacapère, J.-J., Rousset, A., Janoueix-Lerosey, I., Goud, B. (1998). Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6. *Science* **279**, 580-585.
- Elagöz, A., Callejo, M., Armstrong, J., Rokeach, L.A. (1999). Although calnexin is essential in *S. pombe*, its highly conserved central domain is dispensable for viability. *J. Cell Sci.* **112**, 4449-4460.
- Ellgaard, D., Molinari, M., Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-1888.
- Elrod-Erickson, M.J. et Kaiser, C.A. (1996). Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol. Biol. Cell* **7**, 1043-1058.
- Esmon, P.C., Esmon, B.E., Schauer, I.E., Taylor, A., Schekman, R. (1987). Structure, assembly, and secretion of octameric invertase. *J. Biol. Chem.* **262**, 4387-4394.
- Esnault, Y., Blondel, M.-O., Deshaies, R.J., Schekman, R., Képès, F. (1993). The yeast *SSS1* gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **12**, 4083-4093.
- Fang, M., Rivas, M.P., Bankaitis, V.A. (1998). The contribution of lipids and lipid metabolism to cellular functions of the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 85-100.

- Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M.A., Rothman, J.E. (1996). Bimodal interaction of coatamer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* **273**, 1396-1399.
- Gething, M.-J. et Sambrook, J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., Schiestl, R.H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1425-1425.
- Glabe, C.G. (1985). Interaction of the sperm adhesive protein, bindin, with phospholipid vesicles. II. Bindin induces the fusion of mixed-phase vesicles that contain phosphatidylcholine and phosphatidylserine in vitro. *J. Cell Biol.* **100**, 800-806.
- Govindan, B., Bowser, R., Novick, P. (1995). The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J. Cell Biol.* **128**, 1055-1068.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., Novick, P. (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* **18**, 1071-1080.
- Hammond, C. et Helenius, A. (1995). Quality control in the secretory pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 523-529.
- Hann, B.C. et Walter, P. (1991). The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* **67**, 131-144.
- Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **52**, 536-553.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**, 187-197.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M., Wolf, D.H. (1996). ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **273**, 1725-1728.
- Hirokawa, N. (1998). Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-526.
- Hoffman, C.S. et Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**, 267-272.
- Holtzman, D.A., Yang, S., Drubin, D.G. (1993). Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, *SLA1* and *SLA2*, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **122**, 635-644.

- Huang, J.-D., Brady, S.T., Richards, B.W., Stenoien, D., Resau, J.H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A. (1999). Direct interaction of microtubule- and actin-based transport motors. *Nature* **397**, 267-270.
- Hurtley, S.M. et Helenius, A. (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **5**, 277-307.
- Ihara, Y., Cohen-Doyle, M.F., Saito, Y., Williams, D.B. (1999). Calnexin discriminates between protein conformational states and functions as a molecular chaperone in vitro. *Mol. Cell* **4**, 331-341.
- Jung, E., Fucini, P., Stewart, M., Noegel, A.A., Schleicher, M. (1996). Linking microfilaments to intracellular membranes: the actin-binding and vesicle-associated protein comitin exhibits a mannose-specific lectin activity. *EMBO J.* **15**, 1238-1246.
- Kaiser, C. et Ferro-Novick, S. (1998). Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 477-482.
- Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H., Klis, F.M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 373-383.
- Karki, S. et Holzbaur, E.L.F. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 45-53.
- Kearns, B.G., McGee, T.P., Mayinger, P., Gedvilaite, A., Phillips, S.E., Kagiwada, S., Bankaitis, V.A. (1997). Essential role for diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex. *Nature* **387**, 101-105.
- Kuehn, M.J., Herrmann, J.M., Schekman, R. (1998). COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature* **391**, 187-190.
- Kuehn, M.J., Schekman, R., Ljungdahl, P.O. (1996). Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles in vitro. *J. Cell Biol.* **135**, 585-595.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Démollière, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H., Cosson, P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* **79**, 1199-1207.
- Li, R., Zheng, Y., Drubin, D.G. (1995). Regulation of cortical actin cytoskeleton assembly during polarized cell growth in budding yeast. *J. Cell Biol.* **128**, 599-615.

- Lila, T. et Drubin, D.G. (1997). Evidence for physical and functional interactions among two *Saccharomyces cerevisiae* SH3 domain proteins, an adenylyl cyclase-associated protein and the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **8**, 367-385.
- Ljungdahl, P.O., Gimeno, C.J., Styles, C.A., Fink, G.R. (1992). SHR3: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* **71**, 463-478.
- Lussier, M., White, A.-M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., Chen-Weiner, J., Ram, A.F.J., Kapteyn, J.C., Roemer, T.W., Vo, D.H., Bondoc, D.C., Hall, J., Zhong, W.W., Sdicu, A.-M., Davies, J., Klis, F.M., Robbins, P.W., Bussey, H. (1997). Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435-450.
- Lyman, S.K. et Schekman, R. (1997). Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* **88**, 85-96.
- Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., Emr, S.D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the *VPS10* gene. *Cell* **77**, 579-586.
- Martin, J. et Hartl, F.U. (1997). Chaperone-assisted protein folding. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **7**, 41-52.
- Martinez, O. et Goud, B. (1998). Rab proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 101-112.
- Marzioch, M., Henthorn, D.C., Herrmann, J.M., Wilson, R., Thomas, D.Y., Bergeron, J.J.M., Solari, R.C.E., Rowley, A. (1999). Erp1p et Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol. Biol. Cell* **10**, 1923-1938.
- Matlack, K.E.S., Misselwitz, B., Plath, K., Rapoport, T.A. (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- α factor across the ER membrane. *Cell* **97**, 553-564.
- Matlack, K.E.S., Mothes, W., Rapoport, T.A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**, 381-390.
- McClellan, A.J., Endres, J.B., Vogel, J.P., Palazzi, D., Rose, M.D., Brodsky, J.L. (1998). Specific molecular chaperone interactions and an ATP-dependent conformational change are required during posttranslational protein translocation into the yeast ER. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3533-3545.
- McGee, T.P., Skinner, H.B., Whitters, E.A., Henry, S.A., Bankaitis, V.A. (1994). A phosphatidylinositol transfer protein controls the phosphatidylcholine content of yeast Golgi membranes. *J. Cell Biol.* **124**, 273-287.

Mermall, V., Post, P.L., Mooseker, M.S. (1998). Unconventional myosins in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**, 527-533.

Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D., Botstein, D. (1994). Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **125**, 381-391.

Müsch, A., Cohen, D., Rodriguez-Boulan, E. (1997). Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J. Cell Biol.* **138**, 291-306.

Nakamura, N., Lowe, M., Levine, T.P., Rabouille, C., Warren, G. (1997). The vesicle docking protein p115 binds GM130, a *cis*-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner. *Cell* **89**, 445-455.

Nakamura, N., Yamazaki, S., Sato, K., Nakano, A., Sakaguchi, M., Mihara, K. (1998). Identification of potential regulatory elements for the transport of Emp24p. *Mol. Biol. Cell* **9**, 3493-3503.

Ng, D.T.W., Brown, J.D., Walter, P. (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J. Cell Biol.* **134**, 269-278.

Nothwehr, S.F., Conibear, E., Stevens, T.H. (1995). Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in *vps1* mutant yeast cells via the plasma membrane. *J. Cell Biol.* **129**, 35-46.

Novick, P. et Botstein, D. (1985). Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* **40**, 405-416.

Orci, L., Starnes, M., Ravazzola, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Söllner, T.H., Rothman, J.E. (1997). Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles. *Cell* **90**, 335-349.

Orlean, P., Kuranda, M.J., Albright, C.F. (1991). Analysis of glycoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**, 682-697.

Pagano, A., Letourneur, F., Garcia-Estefania, D., Carpentier, J.-L., Orci, L., Paccaud, J.-P. (1999). Sec24 proteins and sorting at the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **274**, 7833-7840.

Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-358.

Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., Rapoport, T.A. (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**, 561-570.

- Parodi, A.J. (1999). Reglucosylation of glycoproteins and quality control of glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum of yeast cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 287-295.
- Pawson, T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-580.
- Pelham, H.R.B. (1998). Getting through the Golgi complex. *Trends Cell Biol.* **8**, 45-49.
- Pelham, H.R.B. (1999). SNAREs and the secretory pathway - lessons from yeast. *Exp. Cell Res.* **247**, 1-8.
- Pfeffer, S.R. (1996). Transport vesicle docking: SNAREs and associates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 441-461.
- Pilon, M., Schekman, R., Römisch, K. (1997). Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.* **16**, 4540-4548.
- Plempner, R.K., Deak, P.M., Otto, R.T., Wolf, D.H. (1999). Re-entering the translocon from the luminal side of the endoplasmic reticulum. Studies on mutated carboxypeptidase yscY species. *FEBS lett.* **443**, 241-245.
- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J.M., Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* **389**, 81-85.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- β -glucan synthase. *Science* **272**, 279-281.
- Reddy, V.A., Johnson, R.S., Biemann, K., Williams, R.S., Ziegler, F.D., Trimble, R.B., Maley, F. (1988). Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase: N-linked oligosaccharide content of the individual sequons. *J. Biol. Chem.* **263**, 6978-6985.
- Rieder, S.E. et Emr, S.D. (1997). A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol. Biol. Cell* **8**, 2307-2327.
- Roberg, K.J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., Kaiser, C.A. (1999). *LST1* is a *SEC24* homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **145**, 659-672.
- Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D., Fink, G.R. (1987). A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* **60**, 237-243.

- Roth, M.G. et Sternweis, P.C. (1997). The role of lipid signaling in constitutive membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 519-526.
- Rothman, J.E. (1994). Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**, 55-63.
- Rothman, J.E. et Orci, L. (1992). Molecular dissection of the secretory pathway. *Nature* **355**, 409-415.
- Sacher, M., Jiang, Y., Barrowman, J., Scarpa, A., Burston, J., Zhang, L., Schieltz, D., Yates III, J.R., Abeliovich, H., Ferro-Novick, S. (1998). TRAPP, a highly conserved novel complex on the *cis*-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *EMBO J.* **17**, 2494-2503.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.-Y.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sapperstein, S.K., Lupashin, V.V., Schmitt, H.D., Waters, M.G. (1996). Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Uso1p. *J. Cell Biol.* **132**, 755-767.
- Schekman, R. et Orci, L. (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* **271**, 1526-1533.
- Schimmöller, F., Singer-Krüger, B., Schröder, S., Krüger, U., Barlowe, C., Riezman, H. (1995). The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J.* **14**, 1329-1339.
- Schliwa, M. (1999). Molecular motors join forces. *Nature* **397**, 204-205.
- Seeger, M. et Payne, G.S. (1992). A role for clathrin in the sorting of vacuolar proteins in the Golgi complex of yeast. *EMBO J.* **11**, 2811-2818.
- Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J. (1986). Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.-Y.
- Siddhanta, A. et Shields, D. (1998). Secretory vesicle budding from the trans-Golgi network is mediated by phosphatidic acid levels. *J. Biol. Chem.* **273**, 17995-17998.
- Sikorski, R.S. et Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.

- Simon, J.-P., Morimoto, T., Bankaitis, V.A., Gottlieb, T.A., Ivanov, I.E., Adesnik, M., Sabatini, D.D. (1998). An essential role for the phosphatidylinositol transfer protein in the scission of coatmer-coated vesicles from the trans-Golgi network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11181-11186.
- Simons, K. et Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569-572.
- Simpson, F., Peden, A.A., Christopoulou, L., Robinson, M.S. (1997). Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* **137**, 835-845.
- Sommer, T. et Wolf, D.H. (1997). Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J.* **11**, 1227-1233.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**, 318-324.
- Sönnichsen, B., Lowe, M., Levine, T., Jämsä, E., Dirac-Svejstrup, B. (1998). A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J. Cell Biol.* **140**, 1013-1021.
- Stenmark, H., Vitale, G., Ullrich, O., Zerial, M. (1995). Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell* **83**, 423-432.
- Stepp, J.D., Huang, K., Lemmon, S.K. (1997). The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole. *J. Cell Biol.* **139**, 1761-1774.
- Stirling, C.J. (1999). Protein targeting to the endoplasmic reticulum in yeast. *Microbiology* **145**, 991-998.
- Stirling, C.J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R., Schekman, R. (1992). Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **3**, 129-142.
- Stolz, J. et Sauer, N. (1999). The fenpropimorph resistance gene *FEN2* from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a plasma membrane H⁺-pantothenate symporter. *J. Biol. Chem.* **274**, 18747-18752.
- Tanaka, K. et Takai, Y. (1998). Control of reorganization of the actin cytoskeleton by Rho family small GTP-binding proteins in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 112-116.
- Tang, H.-Y. et Cai, M. (1996). The EH-domain-containing protein Pan1 is required for normal organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4897-4914.

- Tapon, N. et Hall, A. (1997). Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**, 86-92.
- TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D., Novick, P. (1996). The exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 6483-6494.
- Teuchert, M., Schäfer, W., Berghöfer, S., Hoflack, B., Klenk, H.-D., Garten, W. (1999). Sorting of furin at the trans-Golgi network: interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 8199-8207.
- Ulrich, A.S., Otter, M., Glabe, C.G., Hoekstra, D. (1998). Membrane fusion is induced by a distinct peptide sequence of the sea urchin fertilization protein bindin. *J. Biol. Chem.* **273**, 16748-16755.
- Vallee, R.B. et Sheetz, M.P. (1996). Targeting of motor proteins. *Science* **271**, 1539-1544.
- Vernet, T., Dignard, D., Thomas, D.Y. (1987). A family of yeast expression vectors containing the phage fl intergenic region. *Gene* **52**, 225-233.
- Vida, T.A., Huyer, G., Emr, S.D. (1993). Yeast vacuolar proenzymes are sorted in the late Golgi complex and transported to the vacuole via a prevacuolar endosome-like compartment. *J. Cell Biol.* **121**, 1245-1256.
- Walter, P. et Johnson, A.E. (1994). Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **10**, 87-119.
- Waters, M.G. et Pfeffer, S.R. (1999). Membrane tethering in intracellular transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 453-459.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759-772.
- Weigert, R., Silletta, M.G., Spanò, S., Turacchio, G., Cericola, C., Colanzi, A., Senatore, S., Mancini, R., Polishchuk, E.V., Salmona, M., Facchiano, F., Burger, K.N.J., Mironov, A., Luini, A., Corda, D. (1999). CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid. *Nature* **402**, 429-433.
- Wickner, S., Maurizi, M.R., Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888-1893.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* **79**, 143-180.

Wiertz, E.J.H.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., Ploegh, H.L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-438.

Wigge, P.A., Jensen, O.N., Holmes, S., Souès, S., Mann, M., Kilmartin, J.V. (1998). Analysis of the *Saccharomyces* spindle pole by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *J. Cell Biol.* **141**, 967-977.

Wilcox, C.A. et Fuller, R.S. (1991). Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *Saccharomyces cerevisiae* secretory pathway. *J. Cell Biol.* **115**, 297-307.

Williams, D.B. (1995). Calnexin: a molecular chaperone with a taste for carbohydrate. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 123-132.

Winsor, B. et Schiebel, E. (1997). Review: an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast* **13**, 399-434.

Zheng, L., Chen, Y., Lee, W.-H. (1999). Hec1p, an evolutionarily conserved coiled-coil protein, modulates chromosome segregation through interaction with SMC proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5417-5428.