

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 novembre 2010

Par MULOT Audrey

**Identification et caractérisation de la protéine
Anterior Gradient 2 (AGR2) dans le système de
surveillance du repliement des protéines dans le
réticulum endoplasmique**

Membres du jury

Mr Patrick LEGEMBRE

Chargé de Recherche, INSERM

Mr Laurent COMBETTES

Directeur de Recherche, INSERM

Mr Benoît ROGER

Maitre de conférences, Université Bordeaux 1

Mr Michel TOLEDANO

Directeur de Recherche, CEA

Mr Eric CHEVET

Chargé de Recherche, INSERM

Mr Christophe CULLIN

Professeur des Universités, Université Bordeaux 2

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Président

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement

Le 4 novembre 2010

Par MULOT Audrey

**Identification et caractérisation de la protéine
Anterior Gradient 2 (AGR2) dans le système de
surveillance du repliement des protéines dans le
réticulum endoplasmique**

Membres du jury

Mr Patrick LEGEMBRE

Chargé de Recherche, INSERM

Mr Laurent COMBETTES

Directeur de Recherche, INSERM

Mr Benoît ROGER

Maitre de conférences, Université Bordeaux 1

Mr Michel TOLEDANO

Directeur de Recherche, CEA

Mr Eric CHEVET

Chargé de Recherche, INSERM

Mr Christophe CULLIN

Professeur des Universités, Université Bordeaux 2

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Président

Remerciements

Je tiens à remercier tous les membres de l'unité INSERM U889 ainsi que mon directeur de thèse Eric Chevet pour m'avoir accueillie au sein de son équipe. Je remercie également les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de rapporter et juger ce travail.

Sommaire

REMERCIEMENTS	- 3 -
SOMMAIRE	- 4 -
TABLE DES ABREVIATIONS.....	- 7 -
RESUME	- 11 -
ABSTRACT	- 12 -
INTRODUCTION	- 13 -
<i>Introduction générale</i>	- 14 -
I. La voie de sécrétion chez les eucaryotes	- 14 -
II. Le Réticulum Endoplasmique (RE).....	- 15 -
1- Structure du RE.....	- 15 -
2- Principales fonctions du RE	- 17 -
a) Biosynthèse des lipides et dérivés lipidiques.....	- 17 -
b) Détoxification par hydroxylation et solubilisation de molécules.....	- 18 -
c) Stockage des ions calciums.....	- 18 -
d) Biogenèse des protéines membranaires, sécrétées et résidentes de la voie de sécrétion	- 19 -
<i>CHAPITRE I : Translocation des protéines dans le RE</i>	- 21 -
I. Adressage des protéines au RE	- 21 -
1- Reconnaissance de la séquence d'adressage	- 21 -
2- Interaction entre la SRP et le récepteur à la SRP à la membrane du RE.....	- 24 -
II. Transport des protéines dans le RE : mécanisme de translocation.....	- 25 -
1- Structure du canal de translocation ou translocon	- 25 -
2- Interaction entre le ribosome et le translocon.....	- 28 -
3- Mécanisme de translocation	- 29 -
a) Mécanisme général pour les protéines solubles	- 29 -
b) Insertion des protéines dans la membrane du RE	- 30 -
4- Principales protéines associées au translocon	- 31 -
a) Le récepteur au SRP.....	- 32 -
b) TRAP	- 32 -
c) p180 et p34	- 32 -
d) TRAM	- 32 -
e) RAMP4/SERP1	- 33 -
f) L' oligosaccharyltransférase (OST).....	- 33 -
g) La signal peptidase (SP)	- 34 -
h) BiP.....	- 34 -
i) Calnexine et autres protéines du RE.....	- 34 -
<i>CHAPITRE II : Maturation et repliement des protéines dans le RE</i>	- 36 -
I. Les modifications co- et post-traductionnelles dans le RE	- 36 -
1- Coupure du peptide signal	- 36 -
2- La N-glycosylation.....	- 37 -
3- Formation des ponts disulfures.....	- 39 -
4- Oligomérisation	- 40 -
5- Autre modification	- 41 -
II. Le repliement des protéines dans le RE	- 41 -
1- Les protéines à site lectine du RE	- 42 -
a) Structure de la calnexine et de la calreticuline.....	- 42 -
b) Fonctions de la calnexine et de la calréticuline	- 43 -
i. Rôle de réservoir à calcium.....	- 43 -
ii. Rôle dans la surveillance du repliement des glycoprotéines	- 44 -

iii.	Autre fonction de la calréticuline	- 45 -
2-	Les chaperonnes luminales du RE	- 46 -
a)	La famille des Hsp70s (BiP/GRP98) et leurs co-facteurs.....	- 46 -
i.	BiP/GRP78.....	- 46 -
ii.	Les co-chaperonnes et les NEFs.....	- 47 -
b)	La famille des Hsp90 (GRP94).....	- 48 -
3-	Les oxydoréductases du RE	- 49 -
a)	Les Protéines Disulfides Isomérases (PDI)	- 49 -
i.	PDI	- 49 -
ii.	La famille des PDI.....	- 50 -
b)	Ero1	- 54 -
4-	Les peptidyl-prolylisomérases (PPIases).....	- 55 -
III.	Le système de surveillance du repliement des protéines du RE	- 56 -
1-	Surveillance du repliement des protéines glycosylées	- 56 -
a)	L UDP-Glucose Glycoprotein GlucosylTransferase (UGGT).....	- 58 -
2-	Surveillance du repliement des protéines non glycosylées.....	- 59 -
	<i>Chapitre III : Export des protéines hors du RE.....</i>	<i>- 60 -</i>
A.	Export des protéines correctement conformées vers la voie de sécrétion.....	- 60 -
I.	Formation des vésicules COPII au niveau des sites de sortie du RE	- 61 -
II.	Incorporation des protéines « cargo » dans les vésicules de transport	- 62 -
B.	Export et dégradation des protéines définitivement mal conformées	- 64 -
I.	Dégradation des protéines via la voie de dégradation associée au RE (ERAD)	- 64 -
1-	Système ERAD des protéines glycosylées.....	- 66 -
a)	Reconnaissance des substrats	- 66 -
i.	Importance du clivage des mannoses du N-glycan et rôle de la protéine EDEM.....	- 66 -
ii.	Rôle des protéines OS9 et XTP3B.....	- 69 -
iii.	Autre(s) système(s) de reconnaissance des glycoprotéines définitivement mal conformées.....	- 70 -
b)	Rétrotranslocation des substrats dans le cytosol	- 71 -
i.	Nature du canal de translocation	- 71 -
1°	Le complexe Sec61	- 71 -
2°	Les protéines de la famille Derlin	- 72 -
ii.	Mécanisme de l'export dans le cytosol.....	- 73 -
c)	Déglycosylation et ubiquitination des substrats.....	- 74 -
i.	La E3 ubiquitin ligase GP78 (78 kDa GlycoProtein).....	- 75 -
ii.	La E3 ubiquitin ligase HRD1 (HMG-CoA Reductase Degradation protein 1) et son complexe associé..	- 75 -
d)	Dégradation des substrats.....	- 77 -
2-	Système ERAD des protéines non glycosylées.....	- 77 -
II.	Dégradation des protéines mal conformées par autophagie.....	- 78 -
1-	Sélection et emballage des substrats	- 79 -
2-	Formation des autophagosomes.....	- 79 -
3-	Adressage et fusion des autophagosomes aux lysosomes et dégradation de ses composants	- 80 -
	<i>Chapitre IV : Signalisation émanant du RE</i>	<i>- 82 -</i>
I.	Homéostasie et stress du RE	- 82 -
II.	La réponse UPR ou Unfolded Protein Response.....	- 82 -
1-	Voies de signalisation dépendantes de PERK	- 83 -
2-	Voies de signalisation dépendantes de ATF6	- 85 -
3-	Voies de signalisation dépendantes de IRE1	- 87 -
4-	Connections entre les différentes voies de la réponse UPR	- 90 -
5-	Stress du RE, survie et mort cellulaire	- 90 -
6-	Importance de la réponse UPR dans la physiologie cellulaire	- 92 -
a)	Importance de la réponse UPR dans le développement embryonnaire.....	- 92 -
b)	Importance de la réponse UPR dans la fonction des cellules β pancréatiques	- 92 -
c)	Importance de la réponse UPR dans la maturation des lymphocytes B.....	- 93 -
III.	Voie ER surveillance (ERSU) et héritage du RE	- 93 -

<i>Chapitre V : Réticulum Endoplasmique et pathologies.....</i>	<i>- 95 -</i>
I. Dysfonctions du RE et pathologies.....	- 95 -
1- Les pathologies de classe I.....	- 95 -
2- Les pathologies de classe II.....	- 97 -
3- Les pathologies de classe III.....	- 99 -
4- Les pathologies de classe IV	- 99 -
II. Détournements des fonctions du RE par les pathogènes	- 100 -
III. Implication du stress du RE et de la réponse UPR dans les pathologies	- 101 -
1- Stress du RE et cancer	- 101 -
2- Stress du RE et maladies métaboliques.....	- 102 -
3- Stress du RE et maladies neurodégénératives	- 102 -
4- Stress du RE et maladies inflammatoires intestinales.....	- 103 -
HYPOTHESES ET OBJECTIFS DU PROJET	- 104 -
RESULTATS	- 106 -
<i>Methodologie utilisée.....</i>	<i>- 107 -</i>
<i>Principaux résultats obtenus</i>	<i>- 107 -</i>
1- Validation de la méthodologie utilisée.....	- 107 -
2- Identification des protéines associées aux ribosomes de fonctions non caractérisées : sélection et caractérisation de la protéine Anterior Gradient 2 (AGR2).....	- 108 -
3- L'expression de AGR2 est régulée par la réponse UPR dans les cellules mammifères.....	- 108 -
4- L'atténuation de l'expression d'AGR2 perturbe l'homéostasie basale du RE.....	- 109 -
5- AGR2 interagit avec le mutant définitivement mal conforme NHK de l' α 1-antitrypsine et régule sa dégradation.....	- 109 -
<i>Conclusion</i>	<i>- 110 -</i>
ARTICLE	- 111 -
CONCLUSION GENERALE	- 112 -
BIBLIOGRAPHIE.....	- 119 -
ANNEXES	- 142 -
ANNEXE 1	- 143 -
ANNEXE 2	- 146 -

Table des abréviations

AAA+	ATPases Associated with diverse cellular Activities
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine DiPhosphate
AGR2	Anterior Gradient 2
AMP	Adenosine Monophosphate
APP	Amyloid Precursor Protein
ARE	Antioxidant Response Element
Arf	ADP-ribosylation factor
ARN	Acide RiboNucléide
ARNm	ARN messenger
ASK 1	Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATD	Alpha 1 Antitrypsine Deficiency
ATF	Activating Transcription Factor
ATF6	Activating Transcription Factor-6
ATG	AuTophagy-related Genes
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAP	BIP-Associated Protein
BBF2H7	BBF2 Human Homolog on chromosome 7
BIP	Binding Immunoglobulin Protein
C/EBP	CCAAT/Enhancer Binding Protein
CD59	Complement Defense 59
CDG	Congenital Disorder of Glycosylation
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CHOP	C/EBP Homologous Protein
CK2	Casein Kinase 2
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomegalovirus
CNX	Calnexine
COP II	Coat Protein complex II
CRE	Cyclic AMP Response Element
CREB	cAMP Response Element Binding
CREBH	CRE-Binding protein H
CRT	Calreticuline
DSS	Dextran Sodium Sulfate
DTT	Dithiothréitol
DUB	DeUBiquitinating enzyme
EDEM	ER Degradation Enhancing α 1,2 Mannosidase like protein
eIF2 α	Eucaryotic Initiation Factor 2 alpha
ER	Endoplasmic Reticulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum Associated Degradation
ERAF	ER Assisted Folding
Erdj	Endoplasmic Reticulum Dna J
ERES	Endoplasmic Reticulum Exit Site
ERGIC	ER-Golgi Intermediate Compartment
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase

ERK-1	Extracellular-signal Regulated Kinase-1
ERO 1L	ERO1 Like
ERO1	ER Oxidoreductin 1
ERSE	ER Stress Response Element
ERSU	ER Stress Surveillance
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfert
GADD	Growth Arrest DNA Damage inducible protein 34
GAP	GTPase Activating Protein
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase
GDP	Guanosine DiPhosphate
GEF	Guanine Exchange Factor
GERAD	Glycoprotein ER Associated Degradation
GH47	Glycoside Hydrolase 47
GLS	Golgi Localisation Signal
GP78	78 kDa GlycoProtein
GPI	Glycosylphosphatidyl inositol
GRP	Glucose Related Protein
GTP	Guanosine TriPhosphate
Herp	Homocysteine-induced ER protein
HRD1	HMG-CoA Reductase Degradation protein 1
HSP	Heat Shock Protein
IP 3	Inositol TriPhosphate
IRE-1	Inositol-REquiring protein 1
IRS	Insulin Receptor Substrate 1
ISR	Integrated Stress Response
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
kDa	Kilo Dalton
Keap 1	Kelch-like ECH-associated protein 1
KO	Knock Out
LC3	microtubule associated protein 1 Light Chain 3
LMAN1	Lectine Mannose-binding 1
LTP	Lipid Transfert Protein
MAP	Mitogen Activated Protein
mAtg9	mammalian Atg 9
MCFD2	Multiple Coagulation Factor Deficiency 2
MCS	Membrane Contact Site
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MJD1	Machado-Joseph Disease gene 1
MRH	Mannose 6-phosphate Receptor Homology
MUC2	Mucine 2
NCK1	Non Catalytic region of tyrosine Kinase adaptator protein 1
NEF	Nucleotide Exchange Factor
NF-Y	Nuclear Factor-Y
NHK	Null Hong Kong
NPL4	Nuclear Protein Localisation 4
Nrf 2	NF-E2 related factor 2
OASIS	Old Astrocyte Specifically Induced Substance
ORP150	Oxygen-regulated Protein

OS9	OsteoSarcoma amplified 9
OST	OligoSaccharyl Transférase
Pael-R	Parkinson-associated endothelin-like Receptor
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDI	Protein Disulfide Isomerase
PERK	Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase
PI3K	Phosphatidyl inositol 3-Kinase
PNGases	Peptide:N-Glycanases
poly Q	poly glutamine
PP1	Protein Phosphate 1
PPlase	Peptidyl-Prolylisomérise
PS	Préséniline
RAMP	Ribosome Associated Membrane Protein
RAMP4	Ribosome-Associated Membrane Protein 4
RE	Réticulum Endoplasmique
REL	Réticulum Endoplasmique Lisse
RER	Réticulum Endoplasmique rugueux
RIDD	Regulated IRE1 Dependent Decay
RING	Really Interesting New Gene
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ROS	Reactive Oxygen Species
S1P	Site-1-Protease
S2P	Site-2-Protease
Sar 1	Secretion associated ras-superfamily 1
ScFv	Single chain Fragment variable
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase
SERP1	Stress associated ER Protein 1
SP	Signal Peptidase
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SR	SRP Receptor
SRP	Signal Recognition Particle
TANGO 1	Transport And Golgi Organisation 1
TRAF2	TNF Receptor Associated Factor 2
TRAM	Translocation Associated Membrane protein
TRAP	Translocon Associated Protein
Ub	Ubiquitin
UDP	Uridine Di Phosphate
UFP1	Ubiquitin Fusion Degradation 1
UGGT	UDP-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase
uORF	upstream Open reading Frames
UPR	Unfolded Protein Response
UPRE	UPR Response Element
UPS	Ubiquitin/Proteasome System
VCIP	Vascular Endothelial Growth Factor and type 1 Inducible Protein
VCP	Valosin-Containing Protein
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIMP	VCP-Interacting Membrane Protein
VIP36	36 kDa Vesicular Integral membrane Protein

VIPL	VIP36-Like
VMP1	Vacuole Membrane Protein 1
XBP-1	X-Box Binding Protein 1

Résumé

Titre : Identification et caractérisation de la protéine Anterior Gradient 2 (AGR2) dans le système de surveillance du repliement des protéines dans le réticulum endoplasmique.

Le réticulum endoplasmique (RE) est le premier compartiment intracellulaire traversé par la voie de sécrétion des protéines. Au sein de cet organite, les protéines destinées à la sécrétion, à la membrane ou les protéines résidentes de la voie de sécrétion acquièrent une conformation native, et subissent une multitude de modifications post-traductionnelles incluant la glycosylation et la formation de ponts disulfures intra et intermoléculaires. Généralement, seules les protéines bien conformées sont véhiculées hors du RE grâce à un système de surveillance très fin dont le rôle est de vérifier la conformation correcte des protéines, de retenir les protéines mal conformées jusqu'à ce qu'elles atteignent une conformation adéquate ou de les adresser à la dégradation. Malgré le nombre important de protéines traversant la voie de sécrétion et de pathologies affectant le processus de repliement, seul un petit nombre de protéines ont été décrites dans le système de surveillance du RE et le système de repliement/dégradation qui lui est associé. Au cours de ma thèse, j'ai participé à la mise en place d'une stratégie expérimentale permettant d'isoler des facteurs impliqués dans le système de surveillance du repliement des protéines. Cette méthodologie nous a permis d'identifier et de caractériser la protéine AGR2 (Anterior Gradient 2), un membre putatif de la famille des Protein Disulfide Isomerase (PDI) qui semble interagir très précocement avec les polypeptides en voie de synthèse. Les résultats de notre étude fonctionnelle suggèrent qu'AGR2 joue un rôle dans l'homéostasie basale du RE et intervient spécifiquement dans la régulation de la dégradation des protéines mal conformées. L'étude du rôle moléculaire ce nouvel acteur du système de surveillance du RE pourrait permettre de progresser dans la compréhension de ce processus crucial pour l'homéostasie cellulaire.

Mots clés : réticulum endoplasmique, système de surveillance du repliement protéique, Anterior Gradient 2

Abstract

Title: Identification and characterization of Anterior Gradient 2 protein in endoplasmic reticulum quality control.

The Endoplasmic Reticulum (ER) is the first intracellular compartment encountered by secretory proteins. In this organelle, secretory proteins and integral membrane proteins acquire their correct conformation and undergo many post-translational modifications such as N-glycosylation or disulfide bond formation. To ensure that proteins are properly folded, the ER has evolved a quality control system achieving surveillance on the protein folding status. Partially folded or misfolded proteins are not allowed to escape this compartment and remain in the ER or are taken in charge by the degradation machinery. About one third of the genome products mature in the ER, however thus far an apparently small number of quality control actors have been identified as being responsible for the survey of these proteins's conformation. The importance of understanding principles regulating this mechanism is highlighted by the number of protein-misfolding human diseases. During my PhD thesis, I participate to a study aiming at discovering novel constituents of the ER quality control system. Our approach led to the identification and the characterization of Anterior Gradient 2 protein (AGR2) a potential member of the PDI-like family that interacts with nascent translocating polypeptides. The results of a functional study show that AGR2 is implicated in basal ER homeostasis and participates in the quality control capacity of the ER by specifically regulating the degradation of terminally misfolded proteins.

Key words: endoplasmic reticulum, quality control system, Anterior Gradient 2

Introduction

Introduction générale

I. La voie de sécrétion chez les eucaryotes

Afin de communiquer entre elles ou de modifier leur micro-environnement, les cellules (des organismes uni ou pluricellulaires) doivent exporter des protéines dans le milieu extracellulaire. Afin d'assurer l'export de ces facteurs diffusibles cruciaux pour leur homéostasie, les cellules ont développé une voie particulière, appelée voie de sécrétion. Tous les règnes du vivant possèdent une voie de sécrétion, des organismes unicellulaires simples comme la bactérie aux organismes pluricellulaires complexes comme l'être humain. Chez l'homme, la voie de sécrétion est essentielle à de nombreuses fonctions biologiques, comme par exemple la libération de neurotransmetteurs, la sécrétion d'insuline pour la régulation de la glycémie, la production d'anticorps pour la réponse immunitaire ou la libération d'hormones. Ainsi, des perturbations de la voie de sécrétion sont la cause de diverses pathologies incluant certains diabètes, hémophilie et maladies neurodégénératives.

Outre sa fonction dans la sécrétion, la voie de sécrétion joue également un rôle primordial dans la biogénèse des protéines sécrétées, des protéines constitutives de la membrane plasmique et des protéines (solubles ou membranaires) des différents constituants de la voie de sécrétion.

L'étude de la voie de sécrétion chez les eucaryotes a été amorcée par les travaux pionniers de Georges Palade et de ses collaborateurs sur des cellules mammifères dans les années 1970. En complément de ces travaux, différentes études réalisées chez la levure ont permis d'apporter de nombreuses clés dans la compréhension de ce mécanisme, en fournissant un modèle eucaryote unicellulaire facilement manipulable. De manière simplifiée, le schéma global de la voie de sécrétion communément accepté est ainsi le suivant : les protéines sont initialement ségréguées dans le Réticulum Endoplasmique (RE), point de départ de la voie de sécrétion. Empaquetées dans des vésicules, elles se déplacent ensuite vers l'appareil de Golgi avant d'atteindre, via des vésicules de sécrétion, leur destination finale, la surface cellulaire, où elles seront libérées par exocytose (**Figure 1**) (Palade 1975).

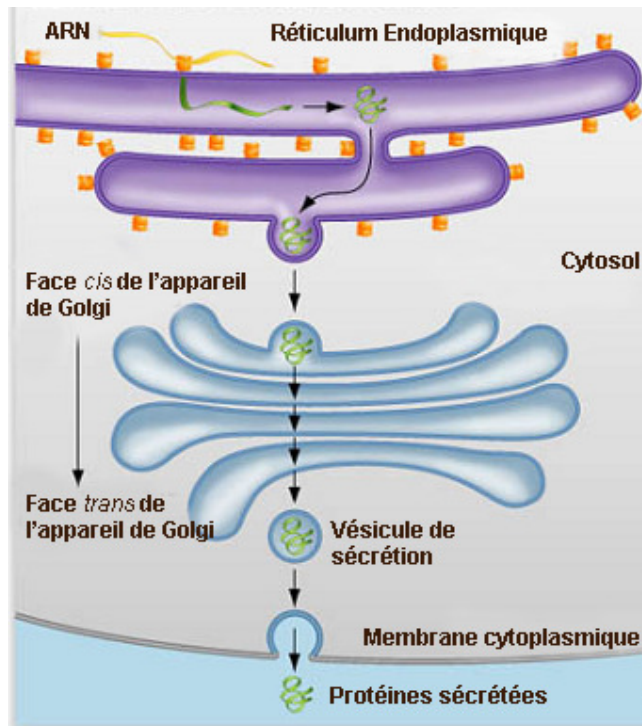


Figure 1 : Représentation schématique simplifiée de la voie de sécrétion eucaryote

Schéma adapté du Collège des Arts et des Sciences de l'Université de Miami. Les protéines sont synthétisées par les ribosomes et entrent dans la lumière du RE via un mécanisme de translocation. Les protéines mûrissent dans le RE et sont empaquetées dans des vésicules avant de rejoindre l'appareil de Golgi ou elles terminent leur maturation. Les protéines sont ensuite empaquetées dans des vésicules de sécrétion et adressées à la membrane plasmique où elles sont exportées par exocytose.

II. Le Réticulum Endoplasmique (RE)

1- Structure du RE

Le Réticulum Endoplasmique est un organe central des cellules eucaryotes, hautement spécialisé, qui assure plusieurs fonctions majeures de la cellule (biosynthèse protéique et lipidique, stockage du calcium, détoxification de drogues...). Cet organe est constitué d'un vaste réseau membranaire continu de tubules et de saccules qui peut représenter jusqu'à 50-60% de la surface membranaire cellulaire selon la spécialisation fonctionnelle de la cellule et/ou son activité métabolique.

La membrane du RE diffère en certains points de la membrane plasmique, elle est plus fine (5 à 6nm contre 8nm d'épaisseur pour la membrane plasmique), et du fait d'une répartition différente en phospholipide, elle présente une plus grande fluidité. Cette membrane délimite une lumière isolée du cytosol, caractérisée par un environnement oxydant (comparable au

milieu extracellulaire) et une forte concentration en calcium, environnement requis pour ses nombreuses fonctions. Le RE peut être divisé en deux domaines : le RE lisse (REL) et le RE rugueux (RER) qui se distinguent par la présence (RER) ou l'absence (REL) de ribosomes à la surface cytosolique de leur membrane (Baumann and Walz 2001) (Voeltz, Rolls et al. 2002) (**Figure 2**).

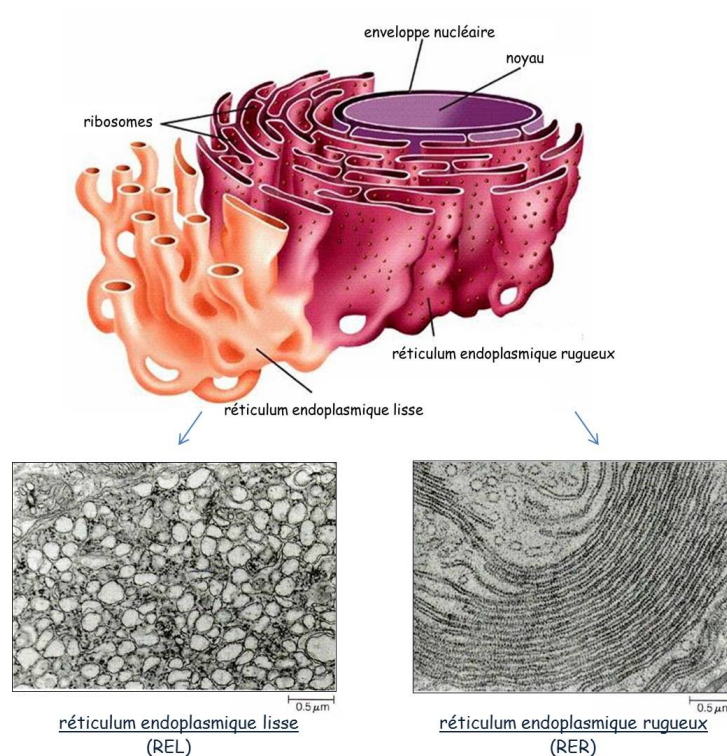


Figure 2: Structure du réticulum endoplasmique

Microscopie électronique : Moore, Clark et Vodopich, Botany Visual Resource Library, 1998, The McGraw III companies.

Les éléments du REL sont typiquement tubulaires et forment un système interconnecté de canalisations traversant le cytoplasme. Le REL est très développé dans un certain nombre de types cellulaires comme par exemple les cellules synthétisant les stéroïdes, les cellules du foie, les cellules musculaires ou les cellules des tubules rénaux. Le RER possède des ribosomes fixés à sa surface cytosolique. Il est typiquement composé d'un réseau de saccules aplatis interconnectés, les citernes. Il existe une continuité entre le RER et la membrane externe de la membrane nucléaire qui porte également des ribosomes à sa face cytosolique. La proportion relative de RER et de REL peut présenter des variations importantes avec une cinétique très rapide selon la fonction cellulaire ou les besoins de la cellule.

2- Principales fonctions du RE

La plupart des protéines résidentes du RE sont présentes à la fois dans le RER et le REL mais diverses protéines impliquées dans des fonctions particulières sont enrichies dans le RER ou le REL, appuyant un schéma global associant majoritairement le RE rugueux à la synthèse protéique et le RE lisse à la synthèse lipidique, au stockage du calcium et la détoxification de substances hydrophobes (Lavoie and Paiement 2008).

a) Biosynthèse des lipides et dérivés lipidiques

Tout d'abord, le REL, en association avec l'appareil de Golgi tient un rôle central dans la biogenèse des phospholipides membranaires nécessaires au renouvellement des constituants des membranes internes de la cellule et de la membrane cellulaire. En effet, la synthèse des phospholipides, incluant les glycerophospholipides et les sphingolipides a lieu majoritairement au niveau du feuillet cytosolique des membranes du REL à partir de précurseurs cytosoliques solubles (Baumann and Walz 2001) (Fagone and Jackowski 2009). La biosynthèse des lipides est asymétrique; toutefois, des enzymes de transfert (nommées flippases) facilitent le basculement des phospholipides d'une couche à l'autre pour former le feuillet luminal du REL. Après leur synthèse, les lipides doivent être transportés aux autres membranes de la cellule. D'une part, les lipides néoformés sont exportés vers les organites cibles (endosomes, lysosomes, appareil de Golgi...) et la membrane plasmique via des vésicules de transport, ce qui permet un transport de membranes de longue distance. D'autre part, la juxtaposition proche des membranes de deux organelles (à une distance d'environ 10nm) peut permettre aux phospholipides de se transférer facilement. Ce processus qui nécessite l'intervention de protéines particulières nommées LTPs (Lipid Transfert Proteins) (Wirtz 1991), capables de reconnaître à la fois le compartiment donneur et le compartiment accepteur, est un mécanisme rapide et très actif au niveau des sites de contact membranaire (MCS : Membrane Contact Site). Le RE est ainsi connu pour générer des MCS avec la mitochondrie, l'appareil de Golgi, les endosomes, les lysosomes ou encore la membrane plasmique (Achleitner, Gaigg et al. 1999) (Underwood, Jacobs et al. 1998) (Pichler, Gaigg et al. 2001). D'autre part, le REL est abondant dans les cellules qui sécrètent des substances lipidiques telles que les hormones stéroïdiennes (cellules endocrines des gonades, cellules cortico-surréaliennes). En effet, ces hormones sont synthétisées à partir de cholestérol qui provient en partie d'une synthèse *de novo* par le RE. Il existe cinq classes de stéroïdes (testostérone, œstrogène, progestérone, cortisol, aldostérone) (Payne and Hales 2004) toutes

synthétisées à partir d'un précurseur stéroïde commun, le pregnelone, lui-même synthétisé dans la mitochondrie à partir du cholestérol, une réaction catalysée par une famille d'enzymes transmembranaires, les cytochromes P450 (Pikuleva 2006). La membrane du REL des cellules sécrétrices de stéroïdes porte elle aussi des membres de la famille des cytochromes P450, dont le site actif est situé sur la face cytosolique. Les cytochromes P450 du RE hydroxylent le pregnelone pour donner deux types de molécules : les sex-stéroïdes (œstrogènes, progestérones, androgène) et des métabolites intermédiaires qui permettront de synthétiser les corticostéroïdes (cortisol, aldostérone) dans la mitochondrie (Miller 1988).

b) Détoxification par hydroxylation et solubilisation de molécules

Dans certains types cellulaires, tels que les hépatocytes ou les cellules rénales, le REL permet la détoxification de composés organiques très divers tels que des xénobiotiques d'origine exogène ou des métabolites produits dans le cytosol. Cette détoxification par hydroxylation, réalisée par un système d'oxygénase comprenant entre autres la famille des cytochromes P450, permet d'augmenter la solubilité des composés afin d'aboutir à leur élimination (Cribb, Peyrou et al. 2005).

c) Stockage des ions calciums

Le REL est aussi le site majeur de stockage du calcium intracellulaire (Ca^{2+}) et joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie calcique cellulaire (Berridge 2002). La concentration en Ca^{2+} dans le RE varie de 100 à 1000 μM (en moyenne 300-400 μM) alors qu'elle est en moyenne de 0,2 μM dans le cytosol (Sakaida, Thomas et al. 1991; Berridge 2002). L'homéostasie calcique dans le RE est cruciale pour une grande variété de fonctions cellulaires incluant la transduction des signaux intracellulaires, le contrôle de la prolifération, l'apoptose ou encore les processus de sécrétion, contraction ou motilité cellulaire. De plus, une majorité de protéines impliquées dans le processus de biogenèse protéique dans le RE présente des fonctions dépendantes du calcium.

L'entrée du Ca^{2+} dans le RE se fait de manière active, majoritairement via des pompes ioniques, les pompes SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) (Lytton, Westlin et al. 1992). Cette pompe associée à la membrane est inhibée par un agent chimique la thapsigargine (Lytton, Westlin et al. 1991) et son activité est dépendante de l'adénosine triphosphate (ATP).

En réponse à divers signaux, le Ca^{2+} est relargué de manière contrôlée dans le cytosol majoritairement via l'activation de deux récepteurs canaux qui présentent un haut degré d'homologie de séquence (McPherson and Campbell 1993): les récepteurs à l'inositol triphosphate (IP3) et les récepteurs à la ryanodine. Chacun de ces canaux est représenté par trois gènes différents codant pour trois isoformes différents (Berridge, Bootman et al. 2003).

Dans la lumière du RE, il existe néanmoins peu de calcium libre et la majorité du calcium est liée à des protéines luminales résidentes du RE. Ces protéines, telles que la calréticuline ou les GRPs (Glucose Related Protein), lient le calcium avec une faible affinité mais une grande capacité (la fonction de ces protéines sera présentée dans le **Chapitre II**) (Coe and Michalak 2009). Dans les cellules musculaires, qui nécessitent notamment une mobilisation rapide et réversible du calcium lors des processus de contraction/décontraction, le REL est appelé réticulum sarcoplasmique (Porter and Palade 1957).

d) Biogenèse des protéines membranaires, sécrétées et résidentes de la voie de sécrétion

Le RER, en tant que premier compartiment de la voie de sécrétion des protéines chez les eucaryotes, est impliqué dans la biosynthèse et la maturation de la majorité des protéines sécrétées, constitutives de la membrane plasmique, des protéines membranaires ou solubles des différents compartiments de la voie de sécrétion et des lysosomes et des endosomes (organites intimement associés à la voie de sécrétion). De ce fait, il est très abondant dans les cellules spécialisées dans la production des protéines sécrétées telles que les cellules acineuses du pancréas et les cellules épithéliales intestinales sécrétrices de mucus ou encore les hépatocytes (Baumann and Walz 2001).

Dans les cellules eucaryotes, environ un tiers des produits du génome transite par la voie de sécrétion et donc par le RE (Ghaemmaghami, Huh et al. 2003). Ces protéines entament toutes leur synthèse dans le cytosol, cependant elles contiennent une séquence d'adressage au RE, appelée peptide signal, majoritairement située à leur extrémité N-terminale qui oriente le polypeptide en voie de synthèse et le ribosome vers la membrane du RE. Les protéines naissantes pénètrent ensuite dans la lumière du RE via un canal, le translocon au cours d'un processus nommé translocation (**Chapitre I**) (Johnson and van Waes 1999) (Zimmermann, Eyrisch et al.). Une fois dans la lumière du RE, les protéines néosynthétisées vont alors être repliées et subir des modifications co- et post-traductionnelles (N-glycosylation, oligomérisation, formation des ponts disulfure...) leur conférant une structure en adéquation

avec leur fonction (**Chapitre II**) (Aebi, Bernasconi et al.) (Jessop, Chakravarthi et al. 2004) (Christis, Lubsen et al. 2008). En effet, le RE fournit un cadre particulièrement propice au repliement protéique grâce à son environnement très oxydant et à la présence de nombreuses protéines chaperonnes qui favorisent la maturation des protéines (Buck, Wright et al. 2007) (Hebert and Molinari 2007). Cette maturation protéique dans le RE est un mécanisme hautement contrôlé. En effet, il existe au sein du RE un véritable système de surveillance du repliement des protéines néosynthétisées (**Chapitre II**) dont le but est d'empêcher l'export de protéines mutées ou mal conformées dont les conséquences pourraient être néfastes pour l'organisme (Maattanen, Gehring et al.). Ainsi seules les protéines présentant une conformation correcte peuvent être exportées vers l'appareil de Golgi, tandis que les autres sont retenues dans le RE afin de compléter le processus de repliement ou adressées à la dégradation via le système de dégradation associé au RE (ERAD : ER Associated Degradation) ou via le processus de macro-autophagie (**Chapitre III**) (Ellgaard, Molinari et al. 1999) (Yoshida and Tanaka) (Romisch 2005) (Yorimitsu and Klionsky 2007) (Mancias and Goldberg 2005). L'activité sécrétoire d'une cellule est ainsi dépendante d'un fonctionnement optimal du RE. Néanmoins, divers facteurs, exogènes ou endogènes, peuvent venir perturber les capacités fonctionnelles du RE, entraînant une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE. Afin de lutter contre cette situation dite de stress et restaurer au plus vite l'homéostasie de l'organite, la cellule a développé une réponse adaptative, appelée réponse UPR (Unfolded Protein Response) qui lui permet d'ajuster les fonctions du RE (**Chapitre IV**) (Schroder and Kaufman 2005) (Ron and Walter 2007).

Dans la suite de cet exposé, nous détaillerons les différents mécanismes qui permettent la biogenèse des protéines dans le RE des cellules mammifères (en mentionnant lorsque cela s'avère informatif des données obtenues chez la levure) ainsi que les voies de signalisation mises en place afin de maintenir un fonctionnement optimum du RE. Nous finirons par présenter brièvement les différentes pathologies humaines connues pour être associées à des dysfonctions de la biosynthèse des protéines du RE.

CHAPITRE I : Translocation des protéines dans le RE

Toutes les protéines produites par une cellule amorcent leur synthèse dans le cytosol. Les protéines destinées à un compartiment particulier (noyau, mitochondrie, peroxisome, voie de sécrétion) doivent rapidement être reconnues afin d'être adressées à leur destination finale. Cette reconnaissance se fait via une structure particulière, la séquence d'adressage, une petite séquence peptidique généralement située à l'extrémité N-terminale de la protéine, spécifique de la destination de la protéine. La plupart des protéines sécrétées, les protéines membranaires ou résidentes de la voie de sécrétion transitent toutes par la voie de sécrétion dont le premier compartiment est le RE. L'adressage des protéines au RE est médiée par une séquence d'adressage avec des propriétés biophysiques et biochimiques bien particulières, appelée peptide signal. Une fois les protéines spécifiquement adressées au RE, elles doivent entrer dans la lumière du RE (où être intégrées à la membrane du RE pour les protéines membranaires). Ce mécanisme d'entrée dit de translocation peut se faire selon deux processus : i) les protéines pénètrent dans le RE au fur et à mesure de leur synthèse via des ribosomes liés à la membrane du RE, on parle de translocation co-traductionnelle, ii) les protéines entrent dans le RE une fois que leur synthèse est achevée on parle alors de translocation post-traductionnelle. Tandis que les deux modes sont couramment utilisés chez la levure, la plupart des protéines entrent de manière co-traductionnelle chez les mammifères. Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons les différentes étapes de la translocation co-traductionnelle des protéines chez les mammifères, de l'adressage des protéines à la membrane du RE au transport des protéines à travers la membrane, en mentionnant lorsque cela s'avère nécessaire des données obtenues chez la levure, en vertu de la grande conservation du processus de translocation entre les espèces.

I. Adressage des protéines au RE

1- Reconnaissance de la séquence d'adressage

Le peptide signal qui permet le ciblage des protéines vers la voie de sécrétion est typiquement formé de neuf à douze acides aminés et se retrouve au niveau de l'extrémité N-terminale des protéines. Il est caractérisé par un domaine N-terminal polaire chargé positivement qui facilite

son interaction avec les phospholipides de la membrane, d'un domaine H formant une hélice α hydrophobe reconnue par la machinerie de translocation, et d'un domaine C-terminal contenant un site de clivage pour la signal peptidase (complexe enzymatique responsable du clivage du peptide signal), le peptide signal ne se retrouvant pas dans la forme mature de la protéine (McKnight, Stradley et al. 1991). Ces différents domaines, même s'ils présentent une grande variabilité de séquence entre les espèces eucaryotes, possèdent le plus souvent les mêmes caractéristiques physiques et sont souvent interchangeables (Martoglio and Dobberstein 1998).

Dans le cytosol, aussitôt que le peptide signal a émergé du site de sortie des protéines du ribosome, celui-ci est reconnu par un complexe ribonucleoprotéique, la "Signal Recognition Particle" (SRP), qui va permettre l'adressage spécifique du complexe ribosome-chaine protéique naissante à la membrane du RE. La SRP est composée de six protéines (SRP54, SRP 19, SRP 68, SRP 72, SRP 19, SRP 14) et d'un ARN de six cents nucléotides (Nagai, Oubridge et al. 2003) (Sauer-Eriksson and Hainzl 2003). La SRP forme une structure en L qui peut être divisée en deux sous-unités fonctionnelles : le domaine Alu et le domaine S (Andrews, Walter et al. 1985) (Andrews and Kole 1987). Le domaine Alu est constitué de l'hétérodimère SRP9/SRP14 lié aux extrémités 5' et 3' de la molécule d'ARN. Ce domaine interagit avec le ribosome et la chaine polypeptidique naissante et entraîne l'arrêt momentané de la traduction via un mécanisme encore peu décrit (Lipp, Dobberstein et al. 1987) (Mason, Ciufo et al. 2000). Il se pourrait cependant que son site de liaison chevauche le site de liaison du facteur d'élongation sur le ribosome (Terzi, Pool et al. 2004).

Le domaine S comprend la partie centrale de la molécule d'ARN de la SRP et les protéines SRP19/54/68/72. La protéine SRP54 est une GTPase qui reconnaît le peptide signal émergent dans une poche hydrophobe riche en méthionine et qui permet la liaison au récepteur au SRP à la membrane du RE (Batey, Rambo et al. 2000) (Wild, Sinning et al. 2001) (Kuglstatter, Oubridge et al. 2002) (**Figure 3**). La GTPase SRP54 est un composant clé de la SRP. Elle est très conservée au cours de l'évolution et est nécessaire et suffisante pour assurer la liaison à la séquence signal (Luirink and Sinning 2004) (Lutcke, High et al. 1992).

La SRP et le ribosome peuvent interagir en absence de traduction mais l'affinité entre le SRP et le ribosome est fortement augmentée en présence de la séquence signal (Flanagan, Chen et al. 2003).

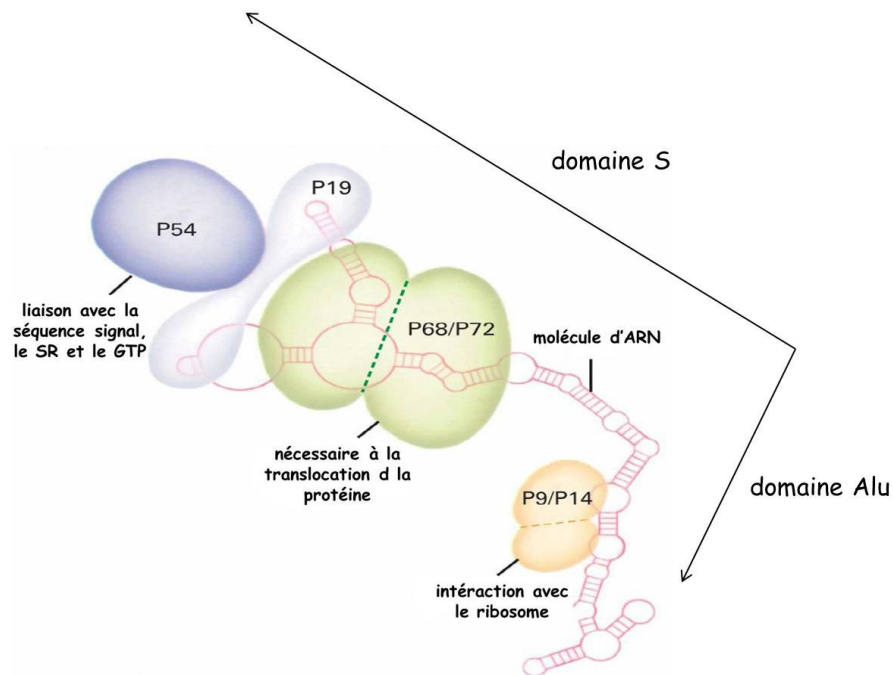


Figure 3 : La "Signal Recognition Particle" - SRP

Représentation schématique de la SRP de mammifères (chien). La molécule d'ARN est représentée par un squelette violet. La localisation des différentes protéines est indiquée par des aires de couleur.

Une analyse par cryo-microscopie électronique de la structure de la SRP de chien liée au complexe ribosome-chaine protéique naissante a mis en évidence que le domaine Alu se lie au ribosome à l'interface entre la petite sous-unité et la grosse sous-unité et que la protéine SRP54 se lie près du site de sortie des protéines des ribosomes (Halic, Becker et al. 2004) (**Figure 4**).

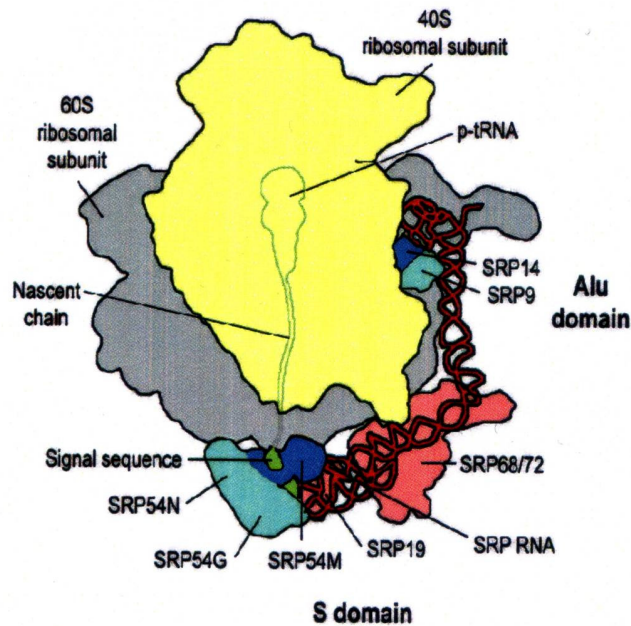


Figure 4 : Représentation schématique de l'interaction entre la SRP et le complexe ribosome-chaîne protéique naissante

Schéma adapté de Wild et al., 2004. Représentation schématique de la SRP mammifère liée au complexe chaîne protéique naissante-ribosome basée sur une analyse par cryo-microscopie. Le domaine S de la SRP est positionné proche du site du tunnel de sortie de la protéine sur la grosse sous unité du ribosome. Les sous unités du ribosome 40S et 60S sont jaunes et grises respectivement. La molécule d'ARN de la SRP est rouge et les protéines de la SRP sont représentées comme suit : SRP54 en bleu turquoise et bleu foncé, le peptide signal en vert, SRP19 et SRP68/72 en rose. SRP9 en turquoise et SRP14 en bleu foncé.

2- Interaction entre la SRP et le récepteur à la SRP à la membrane du RE

Le récepteur à la SRP (SR= SRP receptor) est un hétérodimère formé des protéines SR α et SR β son attache membranaire. SR α possède une activité GTPase et présente une homologie de séquence et de structure avec le domaine GTPase de la protéine SRP54. SR β est aussi une GTPase, mais présente peu d'homologie avec les GTPases de SRP54 et SR α . SR β appartient à la sous famille Arf (ADP-ribosylation factor) des GTPases et est ancrée dans la membrane du RE via une hélice transmembranaire en N-terminal (Miller, Tajima et al. 1995).

Dans sa conformation liée au GTP, la SRP, via SRP54, se lie au peptide signal de la chaîne naissante puis à SR α , menant à la localisation du complexe ribosome-chaîne naissante à la membrane du RE, proche du canal de translocation.

L'interaction entre la SRP et le SR provoque la dissociation de la séquence signal et de la particule SRP, la reprise de la synthèse protéique et l'adressage du complexe ribosome-protéine naissante au canal de translocation. Après formation du complexe SRP/SR, les deux

GTPases SRP54 et SR α se stimulent mutuellement, probablement en agissant comme GAPs (GTPase Activating Proteins) l'une pour l'autre (Miller and Walter 1993) (Miller, Wilhelm et al. 1993). Liée au GDP, la SRP perd son affinité pour le SR et est libérée de la membrane du RE dans le cytosol.

Ce mécanisme d'adressage des protéines à la membrane du RE, qui nécessite la reconnaissance d'une séquence signal néoformée par la SRP, est le mécanisme le plus connu et le plus décrit chez les mammifères. Cependant de récentes données semblent indiquer qu'il existe un mécanisme d'adressage des ARNm codant pour les protéines destinées à être transloquées dans le RE qui serait indépendant de la particule SRP. La séquence même des ARNm contiendrait les informations suffisantes pour être adressée au RE (Pyhtila, Zheng et al. 2008).

II. Transport des protéines dans le RE : mécanisme de translocation

Après avoir été adressés à la membrane du RE, les polypeptides naissants doivent être transportés à travers la membrane. Il est maintenant connu que ce transport est médié par un canal aqueux, appelé translocon, formé par des protéines membranaires intégrales dont le principal constituant est le complexe conservé Sec61 (Gorlich, Prehn et al. 1992) (Gorlich and Rapoport 1993) (Gorlich, Hartmann et al. 1992).

1- Structure du canal de translocation ou translocon

Ce complexe Sec61, formé de trois sous-unités : Sec61 α (52kDa), Sec61 β (14kDa) et Sec61 γ (8kDa), a été initialement isolé en purifiant la fraction des protéines membranaires associées aux ribosomes ou RAMP (Ribosome Associated Membrane Protein). Un complexe formé de RAMP 1, 2 et 3 a été isolé et renommé Sec61 α , β , γ (Gorlich, Hartmann et al. 1992).

Sec61 α possède dix domaines transmembranaires, disposés de manière quasi-symétrique dans la membrane. Les sous unités β et γ ne présentent qu'un seul domaine transmembranaire. Chez les levures, les sous-unités Sec61 α et γ sont essentielles pour la viabilité (Stirling, Rothblatt et al. 1992), contrairement à la sous-unité β qui semble uniquement jouer un rôle dans l'efficacité de translocation (Kalies, Rapoport et al. 1998).

Seule la structure cristallographique du complexe Sec a été déterminée pour l'archée *Methanococcus jannaschii* (Van den Berg, Clemons et al. 2004). Cette structure semble représentative de toutes les espèces, au vu de la conservation de séquence entre les espèces et de la similarité

avec la structure de plus basse résolution du complexe Sec chez la bactérie *Escherichia coli* déterminée par cryo-électromicroscopie (Breyton, Haase et al. 2002). La sous unité α est formée de deux parties : la première, du domaine transmembranaire 1 à 5, et la deuxième, du domaine transmembranaire 6 à 10, qui forment une porte latérale vers l'avant et sont reliées ensemble à l'arrière par la sous unité γ . Les dix hélices de la sous unité α forment un pore en forme d'entonnoir formé schématiquement de deux cônes, un cytoplasmique et un luminal, qui se rejoignent environ au milieu de la bicouche lipidique. A ce niveau, le pore est formé d'un anneau central de six acides aminés hydrophobes, majoritairement des isoleucines. A l'état inactif, état dans lequel la structure a été cristallisée, le pore coté luminal est obstrué par une courte hélice α , formant un "bouchon". Ce dernier semble être nécessaire afin de maintenir l'imperméabilité membranaire et d'empêcher le passage non souhaité d'ions, notamment d'ions calcium, et de petites particules entre le cytosol et la lumière du RE. Cette hélice α serait capable de se déplacer afin de laisser passer les polypeptides en croissance (Van den Berg, Clemons et al. 2004) (**Figure 5**).

Parallèlement, des études précédentes avaient montré que le complexe de translocation était composé d'oligomères. Ainsi des travaux par microscopie électronique à basse résolution réalisés sur des complexes Sec purifiés de mammifères, de bactéries et de levures indiquent la présence de trois ou quatre hétérotrimères Sec61 $\alpha\beta\gamma$, associés sous forme d'un anneau autour d'un centre d'environ 2nm de diamètre (pouvant aller jusqu'à 4-6nm selon les études réalisées (Hamman, Chen et al. 1997)), longtemps supposé comme étant le pore de translocation (Hanein, Matlack et al. 1996) (Hamman, Chen et al. 1997). De plus, l'association multimérique de Sec61 a aussi été suggérée par l'analyse par cryomicroscopie du complexe ribosome-translocon chez la levure et les mammifères (Beckmann, Bubeck et al. 1997) (Beckmann, Spahn et al. 2001) (Morgan, Menetret et al. 2002). Enfin des analyses par transfert d'énergie par résonance entre molécules fluorescentes (FRET) ont également montré que les complexes Sec61 étaient naturellement capables de s'oligomériser dans les bicouches lipidiques (Mori, Tsukazaki et al. 2003). Ainsi, le translocon semble pouvoir former une structure quaternaire multimérique et ce, à la fois chez les bactéries et les eucaryotes, incluant les mammifères. Néanmoins, un seul hétérotrimère Sec61 $\alpha\beta\gamma$ étant suffisant pour assurer une translocation efficace, l'intérêt biologique de cette oligomérisation demeure encore non résolu.

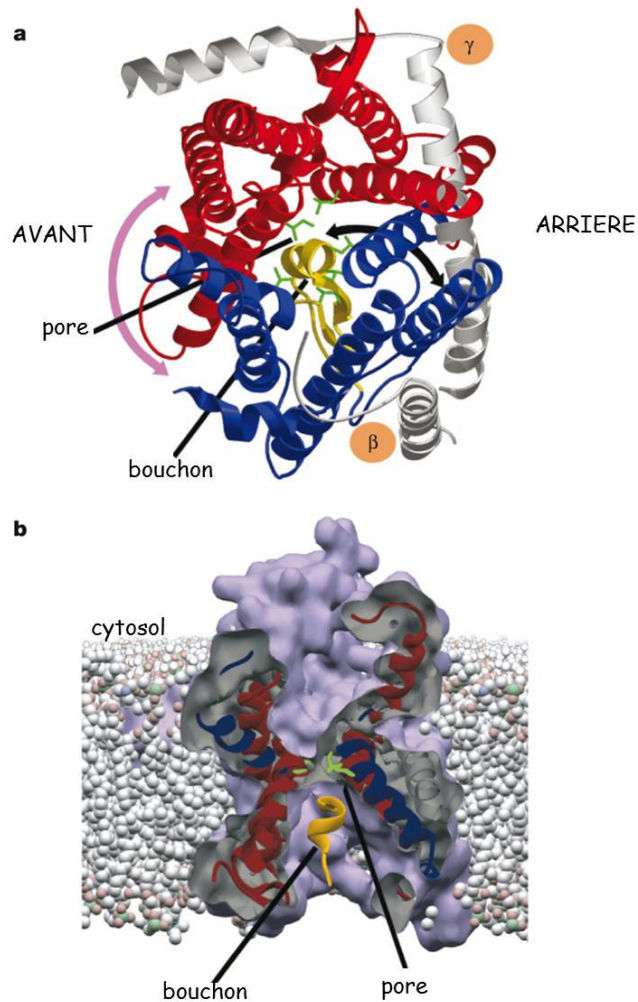


Figure 5: Structure du translocon

Schéma adapté de (Rapoport 2007) représentant la structure moléculaire du translocon de l'archée *Methanocaldococcus jannaschii* obtenue par cristallographie aux rayons X. a) Vue de haut du translocon à partir du cytosol. La sous-unité α comporte deux parties, les segments transmembranaires de 1 à 5 et de 6 à 10 (en bleu et rouge respectivement) qui peuvent ouvrir une porte latérale vers l'avant (flèche à double tête violette). Les sous-unités β et γ sont représentées en gris. Dans le canal fermé, le bouchon (en jaune) est au centre de la sous unité α . Il peut se déplacer vers l'arrière (flèche à double tête noire) ouvrant le canal à travers la membrane. Les acides aminés formant l'anneau du pore sont indiqués en vert. b) Vue de côté du translocon.

Par ailleurs, une étude utilisant des sondes photoréactives couplées à des substrats de translocation a révélé que ces substrats entrent uniquement en contact avec la sous-unité Sec61 α et les lipides de la membrane du RE au cours de la translocation (Mothes, Prehn et al. 1994). De plus, il a été mis en évidence que, reconstitué in vitro dans des protéoliposomes, le complexe Sec61 est suffisant pour permettre un transport complet des substrats à travers la membrane (Gorlich and Rapoport 1993) (Neuhof, Rolls et al. 1998). Néanmoins, in vivo, diverses protéines s'associent au complexe Sec61 afin d'assurer une translocation optimale

des protéines à travers la membrane du RE. Ces différentes protéines et leur rôle respectif seront présentés dans le **paragraphe II. 4.**

2- Interaction entre le ribosome et le translocon

Des analyses par microscopie électronique de la membrane du RE de tissu sécrétoire (riches en RE) ont permis de mettre en évidence la présence de très nombreux ribosomes liés à la membrane (Adelman, Sabatini et al. 1973).

Le site de fixation majeur des ribosomes sur la membrane du RE semble fourni par les sous unités du complexe Sec61 lui-même, notamment Sec61 α (Kalies, Gorlich et al. 1994) (Raden, Song et al. 2000) (Cheng, Jiang et al. 2005), néanmoins d'autres protéines transmembranaires semblent être impliquées dans l'interaction entre le ribosome et le canal de translocation en jouant le rôle de récepteur au ribosome à la membrane du RE. On peut citer notamment p34, p180, ou encore la ribophorine I, une protéine faisant partie du complexe de l'oligosaccharyl transférase (OST) (voir **paragraphe II.4**) (Yu, Sabatini et al. 1990) (Savitz and Meyer 1990; Tazawa, Unuma et al. 1991).

La liaison in vitro de ribosomes non traducteurs au complexe Sec61 est caractérisée par une cinétique rapide et une affinité de l'ordre du nanomolaire, que ce soit avec des microsomes débarrassés de leurs ribosomes liés ou avec des vésicules reconstituées contenant du Sec61 purifié (Borgese, Mok et al. 1974) (Prinz, Hartmann et al. 2000). L'interaction entre les ribosomes et Sec61 est conservée au cours de l'évolution comme le prouve la formation de complexe stable entre des canaux et des ribosomes d'espèces différentes (Prinz, Hartmann et al. 2000). Au niveau moléculaire, la liaison est médiée par l'ARN 28S de la grosse sous-unité du ribosome et le domaine cytosolique de Sec61, incluant les boucles cytosoliques de Sec61 α (Borgese, Mok et al. 1974) (Prinz, Hartmann et al. 2000) (Raden, Song et al. 2000). Une étude par cryo-microscopie électronique du complexe ribosome-translocon a montré que l'orifice central du translocon s'aligne sur le tunnel de la grande sous-unité du ribosome par lequel sort la chaîne polypeptidique en croissance, assurant ainsi le transfert direct de la protéine dans le canal de translocation. L'interaction entre le ribosome et le translocon est quasi -imperméable, un espace d'environ 1,5nm entre le ribosome et le canal a cependant été observé (Beckmann, Bubeck et al. 1997) (Beckmann, Spahn et al. 2001). Cet espace permet notamment le passage des domaines cytosoliques des protéines transmembranaires.

3- Mécanisme de translocation

a) Mécanisme général pour les protéines solubles

Avant que le ribosome et la chaîne naissante ne soient adressés au canal de translocation via l'interaction entre la SRP et le SR, le pore de translocation est dans un état inactif, dit fermé, dû à une courte hélice α localisée au niveau le plus étroit du canal (**Figure 5**) et à la présence de la protéine BiP, une protéine chaperonne du RE, qui obstrue le canal directement ou indirectement à son extrémité luminale (Hamman, Hendershot et al. 1998). L'interaction entre la SRP et le SR conduit à la liaison du ribosome au translocon et à l'insertion de la chaîne naissante dans le pore de translocation (Miller, Wilhelm et al. 1993). La chaîne naissante se retrouve ainsi dans un compartiment aqueux inaccessible pour le cytoplasme ou pour la lumière du RE, tandis que la synthèse protéique reprend (Crowley, Liao et al. 1994). Quand la protéine en croissance atteint environ soixante-dix acides aminés, le contact entre la séquence signal et l'intérieur du translocon entraîne le déplacement de l'hélice α et le détachement de la protéine BiP (Hamman, Hendershot et al. 1998), le canal se retrouvant en état activé dit ouvert. La translocation co-traductionnelle se poursuit ainsi à travers un canal aqueux de plus gros diamètre, fermé de manière quasi-imperméable à son extrémité cytoplasmique par l'interaction entre le ribosome et le translocon. Lorsque la traduction de la protéine s'achève, la protéine soluble est libérée dans la lumière du RE et le pore de translocation se contracte, retrouvant son état fermé (Hamman, Hendershot et al. 1998) (**Figure 6**).

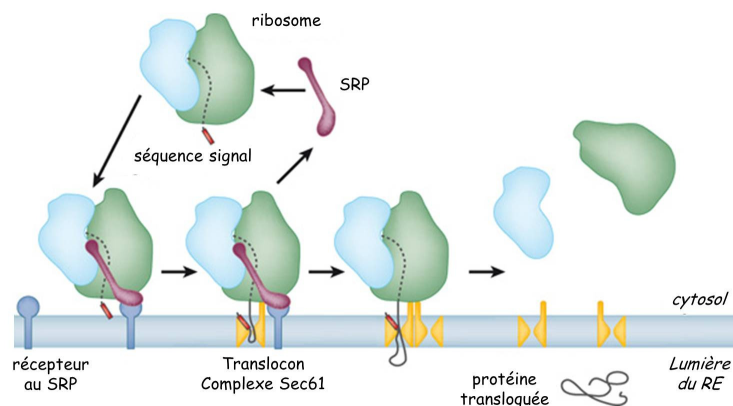


Figure 6 : La translocation co-traductionnelle chez les eucaryotes, exemple d'une protéine soluble

Schéma adapté de (Rapoport 2007) présentant les différentes étapes de la translocation co-traductionnelle. 1) la séquence signal est reconnue par le SRP (marqué en violet) dès qu'il émerge du ribosome, ce qui arrête temporairement la traduction. 2) le SRP s'associe à son récepteur membranaire (en bleu foncé) au niveau de la membrane du RE et transfère la chaîne naissante et le ribosome au translocon formé du complexe Sec61 $\alpha\beta\gamma$ (en jaune). 3) la translocation s'effectue alors co-traductionnellement à travers le pore de translocation. 4) lorsque la protéine est entièrement traduite, les deux sous unités du ribosome (bleue et verte) se dissocient et la protéine transloquée est libérée dans la lumière du RE suite au clivage de sa séquence signal.

Ce mécanisme de translocation est un processus passif qui nécessite l'intervention d'un partenaire capable de fournir l'énergie nécessaire au transport de la protéine naissante à travers la membrane du RE. Dans le cas de la translocation co-traductionnelle, le partenaire majeur du translocon est le ribosome. En effet, la topographie de l'interaction entre le ribosome et le translocon est telle que la protéine en naissance ne peut croître que dans une seule direction: à travers la membrane vers la lumière du RE (Crowley, Liao et al. 1994) (Crowley, Reinhart et al. 1993). Par ailleurs, différentes études semblent indiquer que l'absence de protéines luminales réduit l'efficacité de la translocation (Gorlich and Rapoport 1993) (Nicchitta and Blobel 1993) indiquant que des protéines luminales et notamment la protéine BiP sont nécessaires pour une translocation co-traductionnelle optimale (Brodsky, Goeckeler et al. 1995) (Boisrame, Kabani et al. 1998). Ces protéines luminales dites d'engrenage se lient à la chaîne naissante au fur et à mesure de son entrée dans la lumière du RE (c'est le cas notamment des protéines chaperonnes qui vont prendre en charge le repliement de la protéine, ou certaines enzymes responsables de modifications post-traductionnelles des protéines), et s'opposent au retour de la protéine vers le cytosol. En théorie, toute protéine luminale du RE capable de se lier précocement à la chaîne naissante est capable de jouer ce rôle d'engrenage.

b) Insertion des protéines dans la membrane du RE

L'intégration des protéines membranaires dans la membrane du RE est la première étape de la biogénèse de la plupart des protéines de la membrane plasmique et de la membrane des différents organelles. Durant cette intégration, les segments transmembranaires hydrophobes se déplacent de l'intérieur aqueux du canal vers la bicouche lipidique via la porte latérale. En effet, au cours du mécanisme de translocation, la porte latérale s'ouvre et se referme de manière continue, exposant la protéine en croissance au milieu lipidique. Si la chaîne d'acides aminés présente les caractéristiques d'un domaine transmembranaire (en terme de longueurs et d'hydrophobicité), son intégration membranaire est réalisée par simple partition entre le milieu aqueux et le milieu lipidique (Heinrich, Mothes et al. 2000) (Hessa, Kim et al. 2005). Les segments hydrophiles entre les domaines transmembranaires vont alternativement se déplacer du ribosome vers la lumière du RE via le canal de translocation, ou émerger entre le ribosome et le canal grâce à la présence de l'espace libre les séparant.

Le premier segment transmembranaire d'une protéine peut avoir son domaine N-terminal d'un côté ou de l'autre de la membrane. L'orientation du premier segment transmembranaire qui est dépendante de la composition en acides aminés de la protéine, détermine, pour les protéines à plusieurs domaines transmembranaires, l'orientation des domaines transmembranaires qui suivent. Des recherches *in vitro* effectuées sur des complexes Sec purifiés dans des protéoliposomes suggèrent que le translocon est capable lui-même d'orienter correctement les domaines transmembranaires en disposant toujours l'extrémité du domaine transmembranaire la plus positive face au cytosol (Heinrich, Mothes et al. 2000). Le processus d'insertion des domaines transmembranaires présente une cinétique lente, mais peut être aidé par des protéines accessoires, comme la protéine TRAM (Translocation Associated Membrane protein). Cette protéine semble jouer un rôle de chaperonne membranaire afin stabiliser les domaines transmembranaires peu hydrophobes, dans l'attente de leur insertion dans la membrane (Mothes, Jungnickel et al. 1998) (Voigt, Jungnickel et al. 1996). Les domaines transmembranaires agissent également comme des signaux peptidiques d'arrêt de la translocation, les régions non-transloquées des protéines complétant, quant à elle, leur traduction dans le cytosol (Mothes, Jungnickel et al. 1998).

4- Principales protéines associées au translocon

Les sous unités Sec61 α , β , γ constituent le noyau central du canal de translocation. Toutefois, ces protéines ne sont pas suffisantes pour assurer seules le processus de translocation *in vivo*. Ainsi, différentes études telles que des approches de pontage covalent ou des stratégies d'enrichissement des protéines associées au ribosome (stratégie récemment couplée à des expériences d'électrophorèse de haute résolution (Dejgaard, Theberge et al. 2010)) ont révélé la présence de protéines du RE, en particulier membranaires, à proximité du translocon minimal formé par le complexe Sec61 (Kalies, Gorlich et al. 1994) (Gorlich, Hartmann et al. 1992) (Krieg, Johnson et al. 1989). Cette découverte a mené au concept de l'existence d'une version mature du canal de translocation. Dans cette version du translocon, la protéine TRAM, RAMP4/SERP1, TRAP, la signal peptidase, l'oligosaccharyl transférase, le récepteur à la SRP et différentes chaperonnes du RE entre autres ont été montrés comme s'associant de manière stable ou transitoire ou se retrouvant à proximité du canal de translocation.

a) Le récepteur au SRP

Le récepteur à la SRP, qui est nécessaire pour le ciblage du complexe ribosome/chaine naissante/ séquence signal/ SRP à la membrane du RE, semble se retrouver de manière transitoire associé au canal de translocation comme le suggère le peu de récepteur à la SRP présent à la membrane du RE en comparaison du nombre de translocons (Rapiejko and Gilmore 1997).

b) TRAP

Le complexe TRAP (TRanslocon Associated Protein) est composé de quatre sous-unités protéiques transmembranaires (α , β , γ , δ) (Menetret, Hegde et al. 2005). Des expériences de pontage covalent ont permis de mettre en évidence que le complexe TRAP se trouvait à proximité de la chaine naissante et des ribosomes liés à la membrane. Il a aussi été montré que le complexe TRAP se localisait à la membrane du RE et qu'il s'associait avec le complexe Sec61 sous forme d'un hétérotétramère (Menetret, Hegde et al. 2005). Les sous unités α , β et δ possèdent un seul domaine transmembranaire alors que la sous unité γ traverse la membrane quatre fois. Une grande partie de chaque sous unité est localisée dans la lumière du RE. Il a récemment été décrit que l'expression des quatre sous unités du complexe TRAP est induite en réponse à un stress du RE et que ce complexe pourrait jouer un rôle dans la dégradation des protéines mal conformées par le système ERAD (Nagasawa, Higashi et al. 2007).

c) p180 et p34

Deux protéines de la membrane du RE ont longtemps été supposées jouer un rôle de récepteur au ribosome au niveau du site de translocation, il s'agit des protéines p180 (Savitz and Meyer 1993) (Morrow and Brodsky 2001) et p34 (Ichimura, Ohsumi et al. 1992) (Ohsumi, Ichimura et al. 1993). Néanmoins, certaines données indiquant que leur présence n'est pas indispensable pour la liaison du ribosome à la membrane du RE, leur rôle de récepteur aux ribosomes est controversé (Collins and Gilmore 1991).

d) TRAM

Lors de la reconstitution du translocon dans des protéoliposomes par le groupe de Tom A. Rapoport, une 4^e protéine, en plus des trois sous-unités du complexe Sec61, a été identifiée comme étant indispensable à la translocation d'un certain nombre de protéines (Gorlich and

Rapoport 1993). Cette protéine, nommée TRAM, est une glycoprotéine de 36kDa à huit domaines transmembranaires, aussi abondante dans le RE que les sous-unités du complexe Sec61 (Gorlich, Hartmann et al. 1992). La protéine TRAM interagit avec la sous-unité Sec61 α et avec les polypeptides membranaires en voie de translocation. Des études par pontage covalent ont montré que TRAM interagit préférentiellement avec les domaines N-terminaux chargés du peptide signal, immédiatement après son insertion dans le translocon (High, Martoglio et al. 1993). La fonction de la protéine TRAM est encore peu décrite à ce jour, elle est néanmoins supposée faciliter l'intégration des domaines transmembranaires dans la bicouche lipidique lors de la translocation (Mothes, Prehn et al. 1994) (Voigt, Jungnickel et al. 1996).

e) RAMP4/SERP1

L'isolement du translocon réalisé en purifiant la fraction de protéines membranaires associées aux ribosomes a également permis de mettre en évidence la présence d'une autre protéine, la protéine RAMP4 (Ribosome-Associated Membrane Protein 4), une petite protéine d'une dizaine de kDa (Gorlich, Hartmann et al. 1992). Cependant des expériences de translocation in vitro dans des protéoliposomes ont indiqué que RAMP4 n'est pas essentielle pour l'activité de translocation du complexe Sec61 et n'interagit pas avec les polypeptides en voie de translocation (Gorlich and Rapoport 1993). En parallèle, RAMP4 a été identifiée comme étant une protéine dont l'expression est fortement induite en hypoxie et en réponse à un stress du RE. Elle a ainsi été renommée SERP1 (Stress associated ER Protein 1). RAMP4/SERP1 co-immunoprécipite avec les protéines Sec61 α et Sec61 β et avec une protéine chaperonne du RE, la calnexine (Yamaguchi, Hori et al. 1999). In vivo, cette protéine semble s'opposer à l'agrégation et/ou dégradation des protéines membranaires néosynthétisées et favoriser leur glycosylation en présence d'un stress du RE (Yamaguchi, Hori et al. 1999) (Schroder, Martoglio et al. 1999).

f) L'oligosaccharyltransférase (OST)

L'OST est un complexe enzymatique responsable du transfert co-translationnel d'un groupement d'oligosaccharide sur un résidu asparagine de la protéine en croissance (processus de N-glycosylation, voir **chapitre II paragraphe I.2**). Cette activité enzymatique a lieu au niveau du feuillet luminal de la membrane du RE. Les sites de N-glycosylation pouvant être situés à différents endroits de la protéine, le complexe OST reste intimement associé au translocon tout au long de la translocation. De plus, l'une des protéines de l'OST,

la ribophorine I, agit en partie comme récepteur du ribosome (Yu, Sabatini et al. 1990). De plus, il a récemment été montré chez la levure, que l'OST interagissait directement avec la grosse sous-unité du ribosome au niveau du site de translocation et que l'OST et le complexe Sec61 pouvaient simultanément se lier au ribosome in vitro (Harada, Li et al. 2009).

g) La signal peptidase (SP)

De façon similaire à l'OST, la SP est retrouvée intimement associée au canal de translocation de par la nature de son activité. En effet, la signal peptidase est une protéine formée de cinq sous unités (Evans, Gilmore et al. 1986) qui assure la coupure du peptide signal de la plupart des protéines sécrétées et membranaires dès que le site de clivage à l'extrémité C-terminale du peptide signal de la protéine naissante est exposé dans la lumière du RE.

h) BiP

BiP est une protéine chaperonne impliquée dans le repliement des protéines qui a été identifiée initialement comme une protéine soluble luminale du RE qui se lie aux chaînes lourdes des immunoglobulines G (Haas and Wabl 1983) (Hendershot 2004) (voir **chapitre II paragraphe II.2a**). Comme nous l'avons vu précédemment, cette chaperonne est aussi requise pour le processus de translocation co-translationnelle en jouant le rôle de protéine d'engrenage qui s'oppose au retour des protéines en voie de translocation dans le cytosol (Brodsky, Goeckeler et al. 1995). Enfin, il semblerait que BiP agisse comme un "bouchon" du translocon libre, pour sceller le côté luminal, possiblement en interagissant directement avec le translocon (Hamman, Hendershot et al. 1998).

i) Calnexine et autres protéines du RE

Les protéines du RE qui assistent le repliement des protéines (voir **chapitre II paragraphe II**) sont également situées à proximité du translocon. Des expériences de pontage covalent ont ainsi mis en évidence que la calnexine interagissait avec les chaînes polypeptidiques naissantes. La calnexine a été initialement identifiée comme étant une protéine intégrale membranaire de type I du RE, dont le domaine luminal fait partie de la machinerie de chaperonnage du RE (Degen and Williams 1991) (Oliver, Hresko et al. 1996) (Tatu and Helenius 1997). La calnexine apparaît comme étant positionnée de manière adjacente au translocon, et semble également capable de lier certaines sous-unités du translocon de manière transitoire (Boisrame, Chasles et al. 2002). De plus, il a été montré que le domaine cytosolique de la calnexine pouvait être phosphorylé par CK2 (Casein Kinase 2) et ERK-1

(Extracellular signal-Regulated Kinase -1) conduisant à la stimulation de l'interaction entre la calnexine et le ribosome (Chevet, Wong et al. 1999).

De façon similaire, des protéines solubles luminales telles que la calréticuline, différents membres de la famille des PDI (Protein Disulfide Isomerase), telles que PDI ou ERp57, ou la co-chaperonne ERdj3 ont été retrouvés à proximité étroite du canal de translocation (Nicchitta and Blobel 1993) (Tatu and Helenius 1997) (Oliver, van der Wal et al. 1997) (Dejgaard, Theberge et al. 2010).

CHAPITRE II : Maturation et repliement des protéines dans le RE

La translocation co-traductionnelle des protéines à travers le translocon se caractérise par la production et l'entrée progressive dans le RE de la protéine sous la forme d'une chaîne linéaire d'acides aminés. Or, pour que les protéines soient biologiquement actives, elles doivent adopter une structure tri-dimensionnelle particulière, souvent globulaire, composée de nombreux domaines ou motifs structuraux particuliers (hélices α , feuillets β , boucles etc...). Cette conformation rigoureusement définie, unique parmi de nombreuses conformations possibles, est appelée conformation native. De plus, les protéines sont souvent modifiées de façon co- ou post-traductionnelle, que ce soit par le clivage d'un précurseur, l'addition d'oligosaccharides ou encore la formation de ponts disulfures. Le processus par lequel les polypeptides émergeant du translocon adoptent leur conformation finale est appelé maturation des protéines. La présence dans la lumière du RE de nombreuses protéines telles que les protéines chaperonnes ou des oxydoréductases, ainsi que des conditions oxydantes, créent un environnement favorable à cette maturation protéique et facilitent le repliement des protéines néo-synthétisées.

Généralement, seules les protéines bien conformées sont exportées hors du RE vers la voie de sécrétion. En effet, il existe un système de surveillance des protéines dans le RE destiné à assurer l'export sélectif des protéines ayant acquis une conformation tri-dimensionnelle correcte. Les protéines mal conformées sont alors retenues dans le RE jusqu'à ce qu'elles acquièrent une structure tri-dimensionnelle adéquate ou destinées à la dégradation.

I. Les modifications co- et post-traductionnelles dans le RE

1- Coupure du peptide signal

Le peptide signal nécessaire pour le ciblage des protéines au RE ne fait pas partie de la protéine mature, et doit donc être excisé. Le clivage du peptide signal est effectué co- ou post-traductionnellement par un gros complexe situé à la face interne de la membrane du RE, la

signal peptidase (SP). La SP canine comporte ainsi six sous unités de 25, 23, 22, 21, 18 et 12kDa (Evans, Gilmore et al. 1986).

2- La N-glycosylation

La N-glycosylation concerne la majorité des protéines néosynthétisées (Vijay 1998) et correspond à l'ajout de molécules d'oligosaccharides sur la protéine naissante au fur et à mesure de son entrée dans le RE. Cette N-glycosylation est présente aussi bien chez les procaryotes, les eucaryotes unicellulaires (levures...) que chez les eucaryotes pluricellulaires (plantes, insectes, mammifères...) (Spiro 2002). Chez les eucaryotes, c'est un processus métabolique hautement conservé et indispensable au bon fonctionnement cellulaire (Kukuruzinska and Lennon 1998). Ainsi un défaut de N-glycosylation peut conduire chez l'homme par exemple, à un syndrome de type CDG (Congenital Disorder of Glycosylation) qui en fonction du gène touché peut entraîner des retards mentaux et développementaux, des problèmes gastro-intestinaux ou immunitaires graves (Freeze and Aeby 2005). La N-glycosylation des protéines se déroule dans deux compartiments cellulaires distincts : d'abord dans le RE, puis dans l'appareil de Golgi. Tout d'abord, dans le RE, un précurseur oligosaccharidique est assemblé côté cytoplasmique sur un transporteur lipidique ancré dans la membrane du RE, le dolicholpyrophosphate. Dans un deuxième temps, ce précurseur est transféré vers l'intérieur du RE où il va subir différentes modifications. Enfin l'oligosaccharide est ajouté en bloc sur le groupement NH₂ d'un résidu asparagine de la chaîne polypeptidique naissante (Burda, Jakob et al. 1999) au cours d'une réaction catalysée par l'oligosaccharyl transférase (OST). La séquence consensus de N-glycosylation au sein de la protéine naissante est de type Asn-X-Ser/Thr où X est un acide aminé quelconque (Gavel and von Heijne 1990). Cet oligosaccharide appelé N-glycan est une unité tri-antennaire composée de trois glucoses, neuf mannoses et deux N-acétylglucosamines (**Figure 7**).

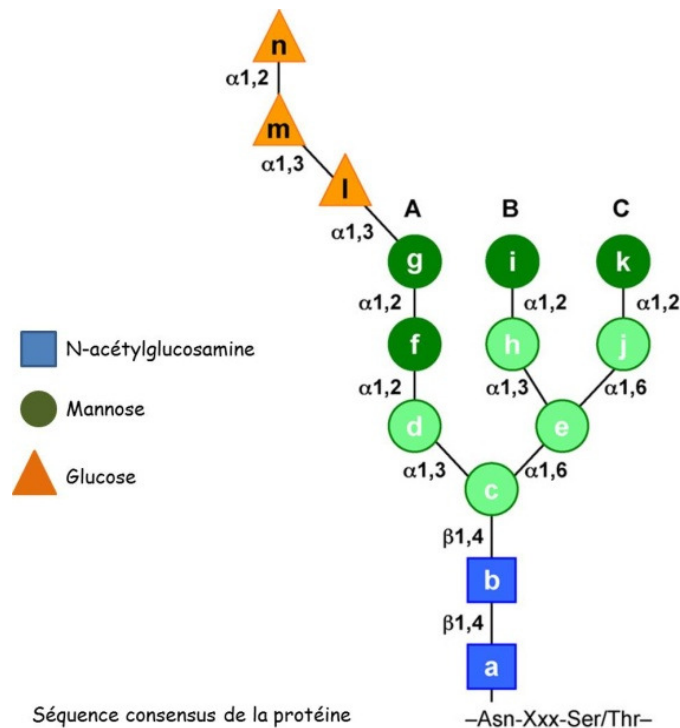


Figure 7 : Structure de l'oligosaccharide rajouté lors de la N-glycosylation

Schéma adapté de (Caramelo and Parodi 2008). L'oligosaccharide est formé de 9 mannoses, 2 acétylglucosamines, et 3 glucoses (les glucoses sont représentés en triangle orange, les mannoses en rond vert et les N-acétylglucosamine en carré bleu). Il est fixé de manière covalente sur la protéine naissante sur une séquence consensus : Asn-X-Ser/Thr. Le glucose 1(n) est clivé par la α -glucosidase I et les glucoses 2(m) et 3(l) sont tous les deux clivés par la α -glucosidase II.

Le processus de glycosylation se poursuit alors par la perte des deux premiers glucoses puis de manière réversible du troisième glucose sous l'action des α -glucosidases I et II. Dans le RE et l'appareil de Golgi, cinq mannoses sont ensuite retirés et plusieurs N-acétylglucosamines, acides sialiques et fucoses peuvent être ajoutés. Les N-glycans présents sur les protéines localisées dans le RE sont homogènes et relativement simples. A l'inverse, les modifications apportées par les étapes terminales de glycosylation dans l'appareil de Golgi leur apportent une grande diversité structurale. Ce changement structural s'accompagne d'un changement de la fonction du N-glycan (Helenius and Aebi 2001) et peut modifier la fonction, la localisation ou la spécificité de la protéine.

Dans le RE, l'ajout progressif de N-glycan sur les polypeptides en voie de translocation rend le processus de translocation des protéines vers le cytoplasme irréversible (Wormald and Dwek 1999). Les N-glycans jouent aussi un rôle commun dans le repliement et la surveillance des glycoprotéines qui les portent (Paulson 1989). Des études de repliement in vitro comparant des glycoprotéines natives par rapport à leur version non glycosylée ont montré

que la présence du glycan augmentait la stabilité, la résistance aux protéases et, de par leur nature hydrophile, la solubilité des protéines (Imperiali and O'Connor 1999) (Ellgaard and Helenius 2003). De plus, l'ajout du N-glycan peut affecter directement le repliement du polypeptide qui le porte en jouant notamment sur les propriétés physiques de la protéine. Il semblerait ainsi que l'interaction entre le N-glycan et le polypeptide joue un rôle dans l'induction et la stabilisation de structures secondaires particulières telles que les feuillets β (O'Connor, Debenedetti et al. 2007) (Petrescu, Milac et al. 2004). L'effet le plus important des N-glycans sur le repliement des protéines est cependant indirect et fait intervenir un système cyclique de protéines présentes dans le RE des cellules eucaryotes, la calnexine et la calréticuline (voir paragraphe sur les protéines à site lectine du RE : **II.1** et sur le système de surveillance du repliement des glycoprotéines dans le RE : **III.1**).

3- Formation des ponts disulfures

A la différence de l'environnement réducteur du cytoplasme, la lumière du RE est un environnement oxydant similaire à l'espace extracellulaire. Cet environnement pro-oxydant permet la formation des ponts disulfures qui caractérisent la plus part des protéines synthétisées dans le RE. Cette modification appelée repliement oxydatif se fait typiquement de manière concomitante à la translocation des protéines dans le RE et est une étape cruciale dans leur maturation. La fonction primaire des ponts disulfures est de stabiliser la structure repliée d'une protéine et de permettre la formation de complexes multimériques mais ils permettent aussi de stabiliser des conformations intermédiaires de la protéine en voie de repliement. La formation des ponts disulfures sur une protéine substrat est une réaction réversible dans laquelle les groupements thiols de deux résidus cystéines sont oxydés pour former un pont disulfure lié de manière covalente. L'oxydation des résidus cystéines d'une protéine substrat dans le RE est catalysée par une famille d'enzymes appelées Protéines Disulfides Isomérases (PDI). Les PDIs permettent également la réduction et l'isomérisation des ponts disulfures incorrects (**Figure 8**).

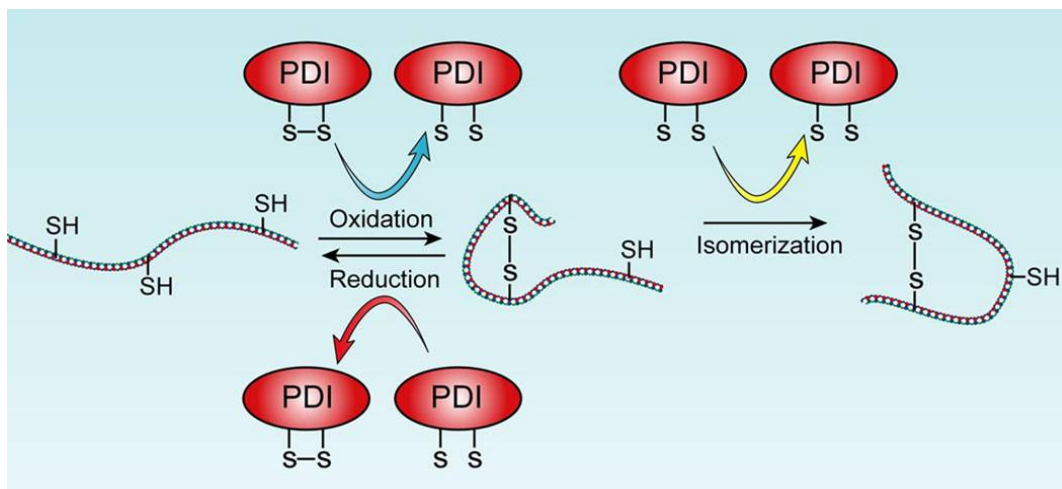


Figure 8 : Oxydation, réduction et isomérisation des ponts disulfures dans le RE
Schéma d'après (Hebert and Molinari 2007).

Ces différentes réactions requièrent le domaine thioredoxine des PDIs. Ce domaine catalytique est composé de deux cystéines dans un motif C-X-X-C. Les PDI passent donc d'un état oxydé lorsqu'ils catalysent la formation des ponts disulfures à un état réduit lorsqu'ils ont catalysé la formation de ponts disulfures. Le potentiel redox du RE doit être finement régulé afin de permettre la formation des ponts disulfures, tout en maintenant un environnement suffisamment réducteur pour rompre les ponts disulfures incorrects. Il a été longtemps suggéré que le glutathion, un tripeptide possédant un groupement thiol et l'un des principaux tampons redox cellulaire, était responsable de la ré-oxydation des PDI. Cependant de récentes données ont mis en évidence que l'oxydation des PDI est majoritairement sous la dépendance des protéines de la famille des Ero1 (oxidoreductin 1) (voir paragraphe sur les PDI : **II.3a** et sur Ero1 : **II.3b**).

4- Oligomérisation

Pour de nombreuses protéines, le processus de repliement ne s'achève pas quand le polypeptide a atteint sa conformation stable native. En effet, de nombreuses protéines s'assemblent en oligomères ou en complexes protéiques de taille variable. Cette oligomérisation nécessite que chacune des sous unités soit capable de trouver ses sous unités partenaires, et il est supposé que les protéines chaperonnes escortent les différentes sous unités jusqu'à ce qu'elles trouvent leurs partenaires respectifs (Christis, Lubsen et al. 2008).

5- Autre modification

Dans le RE, certaines protéines membranaires sont modifiées par l'ajout d'une ancre de glycosylphosphatidylinositol (GPI) fixée de manière covalente à l'extrémité C-terminale de la protéine. La réaction est catalysée par un complexe transamidase encore peu caractérisé. Les ancres GPI permettent l'attachement des protéines à la membrane tout en modifiant leurs propriétés physiques. Elles sont nécessaires pour faciliter la transduction de signaux ou encore pour diriger les protéines à des endroits précis tels que les radeaux lipidiques (Paulick and Bertozzi 2008). La structure des ancres GPI, de par leur nature riche en phospholipides, confère une grande mobilité aux protéines membranaires ainsi ancrées.

II. Le repliement des protéines dans le RE

Le processus par lequel une chaîne polypeptidique acquiert une conformation tridimensionnelle correcte de façon à assurer sa fonction biologique, est appelé repliement protéique. Bien que certaines chaînes polypeptidiques se replient spontanément, d'autres requièrent l'assistance de différentes protéines telles que des enzymes ou des protéines chaperonnes. Les chaperonnes ont la capacité en commun d'offrir un refuge temporaire à certaines régions de la protéine naissante en hébergeant par exemple les séquences hydrophobes exposées à la surface des protéines qui pourraient être à l'origine d'agrégation inter protéique interférant avec le repliement.

Quatre groupes majeurs de protéines du RE agissent sur la protéine naissante, et participent à son bon repliement : i) Les protéines à site lectine, telles que la calnexine et la calréticuline, qui se lient aux glycoprotéines immatures pour permettre le repliement protéique et la rétention des protéines malconformées si le processus de repliement est incorrect, ii) les chaperonnes luminales du RE (HSPs (Heat Shock Protein) qui empêchent l'agrégation protéique et facilitent le repliement, iii) les oxydoréductases qui médient entre autres la formation des ponts disulfure et peuvent aussi agir en tant que chaperonnes et enfin, ii) les peptidyl-prolyl isomérases qui permettent l'isomérisation des liaisons entre un acide amine X et une proline d'une conformation *trans* en une conformation *cis* et inversement. Ces protéines fonctionnent de façon synergique et coopérative afin d'assurer un repliement correct.

1- Les protéines à site lectine du RE

La prise en charge des polypeptides nouvellement synthétisés lors de leur entrée dans le RE n'est pas aléatoire et dépend de leur nature propre. Certaines protéines ont la capacité de lier une grande diversité de substrats alors que d'autres possèdent une spécificité pour leur substrat c'est le cas notamment pour les protéines de type lectine, dont font partie la calnexine, la calréticuline et la calmegine, qui interagissent spécifiquement avec les protéines glycosylées (Williams 2006).

Ces protéines possèdent un site lectine permettant de se lier de manière spécifique et réversible aux sucres. La calnexine et la calréticuline présentent un haut degré de similarité à la fois structurelle et fonctionnelle. Elles partagent notamment 30% d'identité de séquence et 41% de similarité de séquence. La calnexine est une protéine du RE membranaire de type I de 90kDa. La calréticuline est une protéine soluble luminale de 60kDa possédant dans sa partie C-terminale un motif de rétention dans le RE de type KDEL (Hebert, Simons et al. 1995).

Bien que la calnexine et la calréticuline soient très semblables au niveau structural et présentent une spécificité similaire dans leur liaison au sucre, ces deux protéines semblent avoir une affinité distincte pour leur substrat (Hebert, Foellmer et al. 1996). Des études de KO de gènes a démontré que le KO du gène codant pour la calréticuline chez la souris était létal, et que les souris KO pour le gène de la calnexine (Denzel, Molinari et al. 2002) montraient une mort précoce avec des anomalies neurologiques sévères indiquant que les fonctions de la calnexine et de la calréticuline ne se compensent pas dans le développement. Cela suggère aussi que la calnexine et la calréticuline jouent des rôles biologiques distincts dans la cellule, probablement dûs en partie à leur différence de localisation au sein du RE (soluble versus membranaire).

Une troisième lectine du RE a été caractérisée, il s'agit de la calmegine (Watanabe, Yamada et al. 1994). Chez l'homme, la calmegine est l'homologue de la calnexine qui s'exprime spécifiquement dans les cellules germinales mâles (Tanaka, Ikawa et al. 1997). La calmegine se lie aux polypeptides naissants durant la spermatogenèse. Cette protéine semble fonctionner comme une chaperonne pour une ou plusieurs protéines de surface (telle que la fertiline β) qui médient l'interaction entre le spermatozoïde et le gamète femelle (Ikawa, Nakanishi et al. 2001).

a) Structure de la calnexine et de la calreticuline

La calnexine et la calréticuline sont composées de trois domaines structurels et fonctionnels distincts qui ont pu être mis en évidence grâce à l'étude de la structure cristallographique du

domaine luminal de la calnexine (Schrage, Bergeron et al. 2001) et de l'analyse RMN du domaine P de la calréticuline (Ellgaard, Riek et al. 2001). Elles possèdent ainsi un domaine globulaire (domaine N) en N-terminal qui interagit avec les oligosaccharides, une longue extension en épingle à cheveux correspondant au domaine P riche en proline et enfin un domaine C acide. Le domaine C de la calnexine s'étend du domaine transmembranaire jusqu'à l'extrémité C-terminale de la protéine (**Figure 9**).

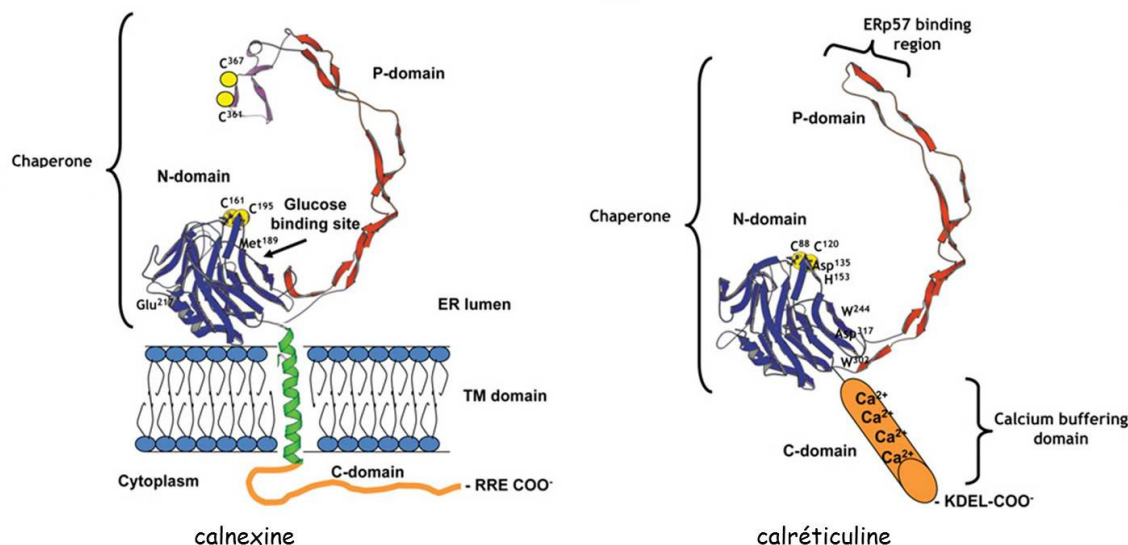


Figure 9 : Modèle de la structure de la calnexine et de la calréticuline

Schéma adapté de (Michalak, Groenendyk et al. 2009). Le modèle de structure tri-dimensionnelle des domaines N et P de la calnexine est basé sur des études cristallographiques de la calnexine (PDB code 1JHN). Le domaine N (bleu) et le domaine P central riche en proline (rouge) sont suivis d'une hélice transmembranaire (verte) et d'un domaine C en C-terminal. Le modèle de structure tri-dimensionnelle des domaines N et P de la calréticuline est basé sur des études RMN du domaine P de la calréticuline et des études cristallographiques de la calnexine. Comme la calnexine, la calréticuline contient un domaine globulaire N (bleu) et un domaine P central riche en proline (rouge). Les domaines N et P sont responsables de l'activité chaperonne de la protéine. Le domaine C en C terminal contient un grand nombre d'acides aminés chargés négativement, impliqués dans la forte capacité de stockage du calcium de la calréticuline. Le domaine d'interaction avec ERp57 est indiqué.

b) Fonctions de la calnexine et de la calréticuline

i. Rôle de réservoir à calcium

La calnexine et la calréticuline sont deux protéines qui ont été identifiées en premier lieu pour leur capacité à lier le calcium (Fliegel, Burns et al. 1989). Ces deux lectines possèdent en effet un domaine de haute affinité mais de faible capacité de liaison au calcium dans leur domaine P, indispensable à leur fonctionnement. De plus, ces deux protéines, principalement la calréticuline, sont capables de lier avec une forte capacité le calcium au niveau de leur

domaine C, riche en acides aminés chargés négativement. Des études ont ainsi mis en évidence qu'une élévation de l'expression de la calréticuline à la hauteur de 60% induisait une augmentation de 100% du calcium cellulaire et 80% de cette augmentation était localisée au sein du RE (Arnaudeau, Frieden et al. 2002). Cette capacité à stocker le calcium réticulaire confère à la calnexine et à la calréticuline un rôle de rhéostat de la concentration calcique.

ii. Rôle dans la surveillance du repliement des glycoprotéines

Plus récemment, des expériences avec la calnexine ont permis d'identifier le rôle de la calnexine et de la calréticuline en tant que chaperonnes moléculaires semblables aux lectines qui interagissent avec les glycoprotéines néo-synthétisées. L'association de ces lectines avec les glycoprotéines permet de prévenir les agrégations, de protéger les protéines d'une dégradation prématurée et d'assister les protéines dans le processus de repliement (Ireland, Niggemann et al. 2006).

Des expériences de marquage métabolique utilisant un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la calnexine ont montré que la calnexine interagit, dans le RE, avec les glycoprotéines naissantes mais pas les protéines non glycosylées telles que l'albumine (Ou, Cameron et al. 1993). De plus, des expériences *in vitro* avec de la calnexine purifiée et de la RNase B monoglucosylée ont montré que la calnexine est une lectine spécifique pour le N-glycan à un glucose (neuf mannoses et deux N-acetylglucosamines). Enfin, en utilisant un mélange de RNase B bien conformée, mal conformée ou un intermédiaire de conformation, il a été mis en évidence que la liaison avec la calnexine *in vitro* est indépendante de la conformation de la protéine (Zapun, Petrescu et al. 1997). Cependant, des expériences plus récentes ont montré que, en plus de leur activité lectine, la calnexine et la calréticuline sont capables de reconnaître des protéines non glycosylées et de s'opposer à leur agrégation *in vitro* et *in vivo* (Williams 2006). Il a finalement été proposé que la liaison initiale entre une glycoprotéine et ces deux lectines est dépendante du carbohydre, mais peut conduire à une liaison directe avec le substrat.

Ainsi, fonctionnellement, quand de nouveaux polypeptides entrent dans le RE, ils sont généralement modifiés par l'ajout d'un N-glycan (voir paragraphe sur la N-glycosylation : **I.2**) et les deux derniers glucoses sont rapidement clivés par les α -glucosidases I et II. La protéine naissante monoglucosylée est reconnue par le système calnexine / calréticuline (Hammond, Braakman et al. 1994) qui va assister la protéine dans son processus de repliement. Lorsque le glucose restant est clivé par action de l' α -glucosidase II cela va

entraîner la dissociation de la calnexine/calréticuline et de son substrat lui permettant ainsi son export vers la voie de sécrétion. Néanmoins, si le polypeptide n'est pas dans son état de repliement définitif, celui-ci peut être re-glucosylé via l'activité de l'enzyme UDP-Glucose Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) lui permettant d'être de nouveau pris en charge par le système calnexine/calréticuline (Sousa, Ferrero-Garcia et al. 1992). Les glycoprotéines mal repliées peuvent effectuer de nombreux cycles avant d'être définitivement relâchées vers la voie de sécrétion ou vers la voie de dégradation advenant un repliement incorrect persistant.

Ce rôle de chaperonne moléculaire de la calnexine et de la calreticuline, connu maintenant sous le nom de cycle de la calnexine/calréticuline, constitue un processus clé du système de surveillance du repliement des glycoprotéines dans le RE (Voir paragraphe sur la surveillance du repliement des protéines glycosylées : paragraphe **III.1**).

L'association entre ces lectines et les glycoprotéines n'a pas pour unique rôle d'empêcher les agrégations ou dégradations prématurées. En effet cette interaction permet aussi d'augmenter l'efficacité de repliement en permettant de réunir les glycoprotéines néosynthétisées et des membres de la famille des PDI à l'origine de la formation et l'isomérisation des ponts disulfures. A ce jour, un seul membre de la famille des PDI a été montré jouant un rôle de disulfide isomérase en association avec les lectines du RE. En effet, il a été mis en évidence in vitro que ERp57 se lie à la calnexine et accélère le repliement de la RNase B lié à un N-glycan à un glucose (neuf mannoses et deux N-acetylglucosamines) (Zapun, Darby et al. 1998). De plus, différentes études ont mis en évidence que ERp57 interagit avec la calnexine et la calréticuline et forme un complexe stable avec ces lectines (Oliver, Roderick et al. 1999; Russell, Ruddock et al. 2004). La détermination ultérieure de la structure de la calnexine et la combinaison d'une analyse génétique et structurale de ERp57 ont permis de déterminer que ERp57 se fixait sur les acides aminés 337 et 357 au niveau du domaine P de la calnexine (Frickel, Riek et al. 2002; Pollock, Kozlov et al. 2004) tandis que le N-glycan est reconnu au niveau du domaine globulaire (Schrage, Bergeron et al. 2001) (**Figure 9**).

La paire ERp57/calnexine(ou calréticuline) est un excellent exemple de modularité et de coopération où la spécificité de substrat est portée par un des deux partenaires, la lectine, et la fonction enzymatique est portée par le deuxième partenaire, ERp57.

iii. Autre fonction de la calréticuline

De manière intéressante, la calréticuline a aussi été identifiée comme un marqueur cellulaire membranaire indispensable pour la phagocytose des cellules en apoptose, par le système

immunitaire (Gardai, McPhillips et al. 2005). En effet, il a récemment été mis en évidence que, dans le processus de mort dit immunogène, la calréticuline, en association avec ERp57, co-transloque, de manière précoce, à la surface de la cellule, entraînant une reconnaissance de la cellule par les lymphocytes T et l'initiation d'une réponse immunitaire menant à la mort de la cellule (Obeid, Tesniere et al. 2007; Panaretakis, Joza et al. 2008).

2- Les chaperonnes luminales du RE

a) La famille des Hsp70s (BiP/GRP98) et leurs co-facteurs

Les membres de la famille de chaperonnes moléculaires Hsp70 sont essentiels pour le repliement protéique, la translocation membranaire, la lutte contre les agrégats et le réarrangement des complexes multiprotéiques. Cette classe de chaperonnes est certainement la plus étudiée. Les Hsp70 sont présentes dans le cytosol, la mitochondrie, le noyau, le cytoplasme et le RE et sont hautement conservées et retrouvées chez tous les organismes eucaryotes. La fonction et la spécificité des Hsp70 sont hautement régulées par des co-chaperonnes telles que les Hsp40 et les facteurs d'échanges de nucléotides (NEF = Nucleotide Exchange Factor).

i. BiP/GRP78

GRP78, aussi connue sous le nom de BiP, est l'homologue dans le RE de la protéine Hsp70 cytosolique. Cette chaperonne de 78kDa est exprimée lors d'une carence en glucose d'où son nom GRP pour Glucose Regulated Protein (Shiu, Pouyssegur et al. 1977). Elle fut parallèlement découverte comme participant à la maturation des chaînes lourdes des immunoglobulines des lymphocytes B et a été nommée BiP (Binding Immunoglobulin Protein) (Haas and Wabl 1983). Parmi les chaperonnes du RE, BiP est la mieux caractérisée. C'est une chaperonne très conservée au cours de l'évolution (Hendershot 2004) et est généralement la première chaperonne à se lier aux chaînes peptidiques naissantes (Melnick, Dul et al. 1994) (Gething 1999). BiP/GRP78 participe au repliement des protéines en se fixant sur les résidus hydrophobes exposés à la surface des protéines mal conformées, empêchant ainsi l'agrégation des protéines. Une étude de liaison avec une banque de peptide random a ainsi montré que les petits peptides hydrophobes de huit à treize acides aminés, notamment ceux qui forment des feuillets β se lient préférentiellement à BiP (Flynn, Pohl et al. 1991). D'autre part, il a été montré que certains substrats du système calnexine/calréticuline peuvent

se lier à BiP si la N-glycosylation est bloquée (Meunier, Usherwood et al. 2002). BiP est composé de deux domaines majeurs : un domaine de fixation aux protéines dans la partie C-terminale ainsi qu'un domaine ATPase en N-terminal. Dans sa forme liée à l'ATP, BiP se lie au peptide avec une faible affinité (de 1 à 100mM) permettant la liaison avec un large spectre de substrat. La liaison au substrat stimule l'activité ATPase de BiP et l'hydrolyse de l'ATP génère une forme de BiP lié à l'ADP qui possède une forte affinité pour le peptide lié. Enfin, l'échange de l'ADP en ATP permet la libération du substrat par BiP, ce qui lui permet de progresser dans son processus de repliement. Bien qu'il soit généralement accepté que BiP cycle entre un état lié et un état détaché de son substrat polypeptide in vitro, il n'existe aucune preuve prouvant que BiP cycle in vivo.

Parallèlement, sa capacité à lier le calcium confère également à cette chaperonne un rôle important dans le maintien de l'homéostasie calcique. Il a ainsi été montré qu'en conditions normales, BiP représentait 25% du calcium immédiatement disponible depuis les stocks internes de la cellule (Lievremont, Rizzuto et al. 1997). Enfin BiP joue un rôle important dans la reconnaissance des protéines mal conformées et participe à l'adressage de ces protéines au système ERAD, notamment en maintenant leur solubilité (voir **chapitre III**) (Molinari, Galli et al. 2002). Par ailleurs, il a aussi été démontré que dans certaines conditions et notamment en réponse à un stress du RE, BiP se relocalise à la surface cellulaire où il joue un rôle de récepteur à une large variété de ligands, tels que l' α 2-macroglobuline. Au niveau de la surface cellulaire, BiP semble également s'associer à diverses protéines, comme par exemple le canal ionique VDAC (Voltage Dependent Anion Channel) ou les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I (Gonzalez-Gronow, Selim et al. 2009) (Zhang, Liu et al.).

ii. Les co-chaperonnes et les NEFs

D'une part, l'activité de BiP est régulée par des co-chaperonnes de la famille des Hsp40 appelées ERdj (Endoplasmic Reticulum DnaJ). Ces co-chaperonnes possèdent un domaine J, nommé ainsi en rapport à un domaine de soixante-dix acides aminés environ sur la protéine DnaJ, qui assure le même rôle chez la bactérie *E. coli* (Ohki, Tamura et al. 1986). Ce domaine J stimule l'activité du domaine ATPase des Hsp70 qui est particulièrement faible (Cyr, Langer et al. 1994). Au moins six co-chaperonnes de BiP de la famille Hsp40 ont été identifiées : ERdj1, ERdj3, ERdj4, ERdj5, SEC63 et p58^{IPK} (Otero, Lizak et al.). ERdj3 interagit également avec les polypeptides présentant des défauts de repliement et facilite leur prise en charge par BiP (Jin, Zhuang et al. 2009).

D'autre part, des facteurs d'échange de nucléotides interviennent pour stimuler la libération de l'ADP des Hsp70. Deux NEFs ont été identifiés pour BiP : la BiP-Associated Protein (BAP) (Chung, Shen et al. 2002) et la Glucose-Related Protein 170 (GRP170) (Weitzmann, Volkmer et al. 2006). GRP170 aussi nommé ORP150 (150kDa Oxygen-Regulated Protein) a un rôle dual dans le RE puisque c'est aussi un membre de la famille des Hsp70 qui joue un rôle de chaperonne dans le RE (Lin, Masso-Welch et al. 1993). L'expression de cette chaperonne est induite par l'ischémie/reperfusion et plus généralement par une carence en oxygène ou un stress oxydatif (Ikeda, Kaneda et al. 1997). GRP170 présente un haut de degré de similarité avec le domaine ATPase des protéines de la famille des Hsp70, suggérant que GRP170 est capable de lier l'ATP (Easton, Kaneko et al. 2000). Le rôle de GRP170 est peu caractérisé, mais il a été mis en évidence qu'il médie des signaux antiapoptotiques dans divers cancers (Miyagi, Hori et al. 2002).

b) La famille des Hsp90 (GRP94)

Les Hsp90, comme les Hsp70, se lient et se dissocient des substrats de manière concomitante avec la liaison et l'hydrolyse de l'ATP. Cependant, contrairement aux Hsp70 qui sont impliqués dans le repliement des polypeptides nouvellement synthétisés, les Hsp90 se lient spécifiquement à un jeu de substrats qui approchent de leur conformation native.

GRP94 est la seule représentante de la famille des Hsp90 connue dans le RE et c'est la plus abondante des chaperonnes présentes dans le RE. A l'inverse de BiP, cette chaperonne est uniquement présente chez les vertébrés. Cette protéine semble se fixer sur des structures protéiques différentes de celle de BiP en particulier sur des intermédiaires de conformation plus tardifs (Melnick, Dul et al. 1994). Néanmoins, les mécanismes de régulation de cette chaperonne ne sont pas encore clairement établis.

GRP94 possède aussi une forte capacité de liaison au calcium, ce qui en fait un important tampon calcium (Van, Peter et al. 1989). Enfin, tout comme BiP, GRP94 semble jouer un rôle important dans la reconnaissance et l'adressage des protéines mal conformées au système ERAD (voir **chapitre III**) (Christianson, Shaler et al. 2008).

3- Les oxydoréductases du RE

a) *Les Protéines Disulfides Isomérases (PDI)*

La plupart des protéines qui mûrissent dans le RE contiennent des ponts disulfures. L'oxydation des groupements sulfhydryle libres des résidus cystéines durant le repliement est essentielle pour que la protéine puisse atteindre sa conformation native (voir paragraphe sur la formation des ponts disulfures : paragraphe I.3). Cette réaction est catalysée par une famille d'enzymes, les protéines disulfides isomérase, qui présentent des similarités de séquence et de structure avec la thioredoxine cytosolique. Le membre de cette famille le plus étudié est la protéine PDI (Protein Disulfide Isomerase).

i. PDI

PDI est une protéine homodimérique de 55 kDa qui est largement distribuée et représente environ 2% du contenu total en protéine du RE. C'est la première oxydoréductase à avoir été mise en évidence dans le RE des cellules mammifères (Bulleid and Freedman 1988) mais à l'heure actuelle des détails importants de son mécanisme d'action sont encore peu caractérisés.

Cette enzyme catalyse l'oxydation des groupements sulfhydryle libres de la cystéine pour former des ponts disulfures, grâce à son domaine actif structurellement homologue à celui de la réductase thioredoxine cytosolique.

PDI est une protéine multidomaine avec deux domaines catalytiques a et a' séparés par deux domaines non catalytiques b et b' (Kemink, Darby et al. 1996; Kemink, Darby et al. 1997). De plus, il existe un domaine de dix neuf acides aminés qui fait le lien entre le domaine b' et le domaine a', désigné x (Pirneskoski, Klappa et al. 2004) et une extension en C-terminale fortement acide, désigné c, qui contient le motif de rétention dans le RE, KDEL. La structure cristallographique de PDI chez les mammifères n'est pas à ce jour déterminée. Cependant, grâce à l'analyse RMN des domaines aa'bb' et de l'obtention récente de la structure cristallographique de la protéine entière de l'homologue de PDI chez la levure *S. Cerevisiae* (Tian, Xiang et al. 2006) une image de l'agencement des domaines les uns par rapport aux autres a pu être suggérée : les quatre domaines sont arrangés en forme de U ou les domaines catalytiques a et a' se font face. Les domaines b et b' forment la base rigide du U. La surface intérieure de b et b' formant une région hydrophobe (**Figure 10**).

Les sites actifs oxydoréductase de PDI, localisés dans les domaines a et a', consistent en un motif CGHC (**Figure 10**). Les deux sites actifs semblent impliqués dans l'activité de PDI. En effet des études par mutagenèse dirigée de chacun des deux sites ont permis de mettre en évidence une diminution de 50% de l'activité de PDI quel que soit le site muté et une perte totale d'activité si les deux sites sont mutés simultanément (Vuori, Pihlajaniemi et al. 1992). De plus, la mutation de la cystéine en C-terminal ou en N-terminal de chacun des deux sites entraîne une perte de la capacité de PDI à catalyser efficacement l'oxydation et la réduction des ponts disulfure. Cependant, uniquement la mutation de la cystéine située en N-terminal perturbe l'activité isomérase de la PDI (LaMantia and Lennarz 1993). PDI est l'unique membre de la famille des PDI capable de catalyser à la fois l'oxydation et la réduction des ponts disulfures dans des conditions physiologiques. Dans la lumière du RE, PDI peut agir comme oxydant et comme disulfide isomérase. Quand il est localisé à la membrane plasmique, dans le cytosol ou dans les endosomes, PDI agit en tant que réducteur (Turano, Coppari et al. 2002).

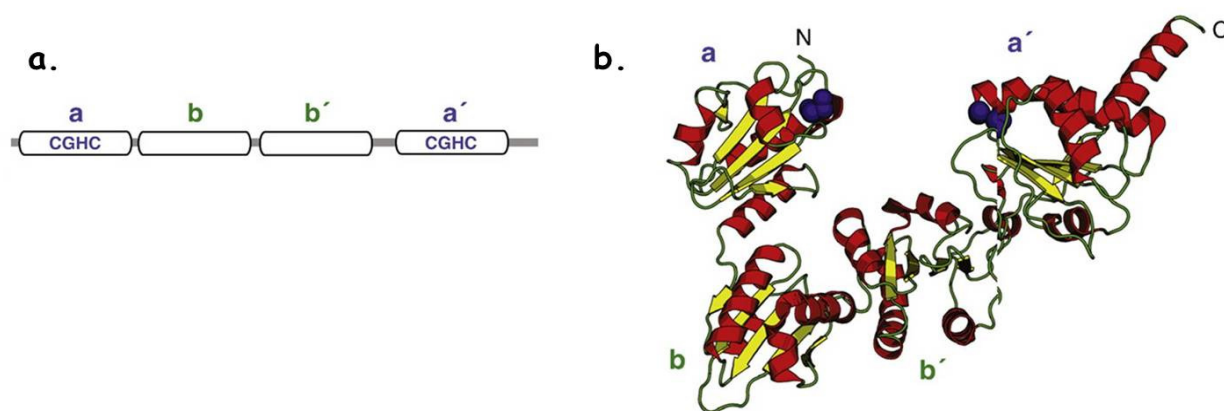


Figure 10 : Composition des domaines et structure tridimensionnelle de PDI

Schéma adapté de (Appenzeller-Herzog and Ellgaard 2008). a) représentation schématique de la composition des domaines de PDI. b) structure tridimensionnelle de PDI, les hélices α sont en rouge, les feuillets β en jaune et les boucles en vert. Les cystéines des sites actifs sont représentées en sphère violette.

ii. La famille des PDI

Dans les cellules eucaryotes, des milliers de protéines différentes sont transportées dans le RE et le long de la voie de sécrétion. Ces protéines adoptent différentes conformations et peuvent former des complexes oligomériques souvent liés par des ponts disulfures inter-moléculaires. Probablement à cause de la grande diversité de substrats protéiques, le RE contient de nombreuses PDI qui assurent le repliement oxydatif des protéines sécrétées en réalisant l'oxydation, l'isomérisation et la réduction des ponts disulfures.

Le regroupement des protéines dans la famille des PDI n'est pas basé sur une fonction commune ou sur des propriétés enzymatiques identiques mais plutôt sur leur séquence et leur similarité structurelle. Ainsi, l'appartenance à cette famille est basée sur deux critères : tout d'abord la protéine doit se localiser dans le RE c'est-à-dire posséder une séquence signal et un motif de rétention dans le RE de type KDEL ou KDEL-like (Raykhel, Alanen et al. 2007). La protéine doit aussi posséder au moins un domaine avec un motif thioredoxine-like (a, a', b, b') similaire à ceux retrouvés chez PDI.

Les différentes PDI diffèrent considérablement en taille, en potentiel redox et en spectre de substrat et contiennent un ou plusieurs domaines thioredoxine-like catalytiques (a, a') et/ou non catalytiques (b, b'). Un domaine thioredoxine-like est typiquement composé de deux cystéines dans un motif CXXC, où X représente n'importe quel acide aminé. On dénombre aujourd'hui une vingtaine de membres dans la famille des PDI chez les mammifères (Maattanen, Kozlov et al. 2006) (**Figure 11**). L'expression de ces protéines est pour la plus part ubiquitaire mais certaines sont tissu-spécifique. On peut ainsi noter par exemple que PDILT est spécifiquement exprimé dans les cellules germinales mâles où il coopère avec la calmagéine (van Lith, Karala et al. 2007). PDIp est spécifiquement enrichi dans le pancréas (Klappa, Stromer et al. 1998) et enfin AGR2 est une protéine qui s'exprime majoritairement dans les tissus épithéliaux glandulaires (sein, prostate...) (Thompson and Weigel 1998; Fletcher, Patel et al. 2003; Zhang, Gong et al. 2005; Zheng, Rosenstiel et al. 2006).

Deux membres de cette famille, ERp57 et PDIp, partagent les mêmes domaines que PDI. A l'opposé, ERp29 et ERp27 possèdent uniquement un domaine de type b et/ou b' non catalytique. De plus, ERp19, AGR-2 et hAG-3 contiennent chacun un unique domaine thioredoxine-like de type catalytique a ou a'. Par ailleurs, huit des vingt PDI humaines identifiées à ce jour, PDILT, ERp27, ERp29, ERp44, TMX2, TMX5, AGR-2 et hAG-3 ne possèdent pas un domaine thioredoxine-like complet CXXC et de ce fait pourraient ne pas être impliquées dans la formation/réduction des ponts disulfures (**Figure 11**).

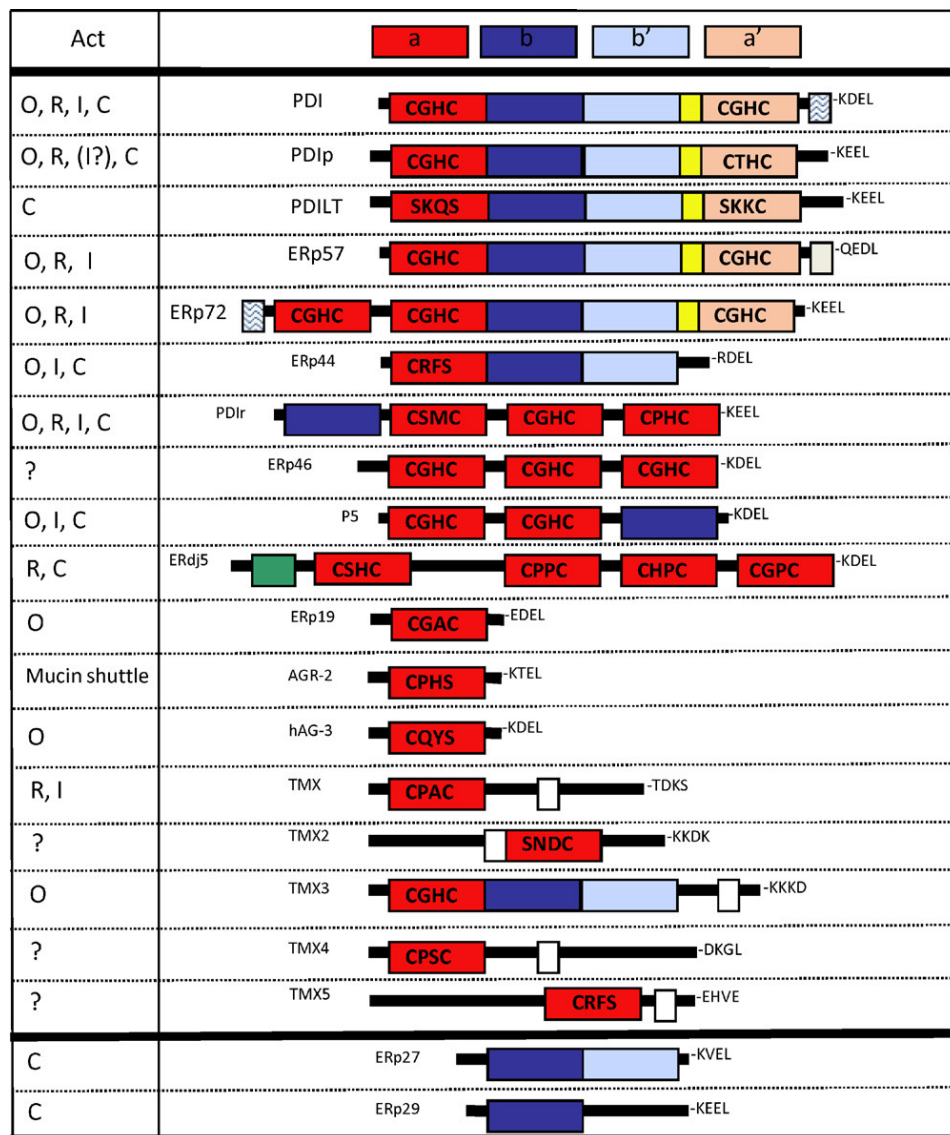


Figure 11 : La famille des Protein Disulfide Isomerase chez les mammifères

Les domaines thioredoxines sont montrés par des rectangles. Les domaines catalytiques sont en rouge (a) et rouge clair (a'). Les domaines non catalytiques sont en bleu (b) et bleu clair (b'). Le jaune représente un domaine de liaison conservé entre a' et b'. Les petits rectangles vagués représentent des extensions acides. Le domaine J de ERdj5 est représenté par une boîte verte. Les rectangles blancs correspondent aux domaines transmembranaires. Pour les activités (Act), O=oxydase, R=reductase, I=isomerase, C=chaperonne.

Les PDI les plus abondantes semblent avoir des spécificités de substrats bien distinctes malgré quelques redondances (Rutkevich, Cohen-Doyle et al.; Jessop, Watkins et al. 2009), suggérant que les différentes PDI sont spécialisées pour différents substrats ou différentes classes de substrat. Cette spécificité pourrait dépendre du potentiel redox du site catalytique qui varie selon le type de protéines qui le portent. En effet, les deux acides aminés qui relient les deux cystéines ont un rôle majeur dans la détermination du potentiel redox de l'enzyme et donc

dans sa fonction en tant que disulfide réductase, oxydase ou isomérase. La spécificité au substrat peut aussi dépendre du type cellulaire, du tissu ou encore du stade de développement. La liaison des PDI avec leurs substrats est une interaction de basse affinité, hautement dynamique et transitoire, ce qui rend leur étude en complexe ou *in vivo* très difficile. Des études par pontage avec des peptides radiomarqués et des mutants de PDI ont cependant impliqué le domaine b' comme étant essentiel à l'interaction avec le substrat (Pirneskoski, Klappa et al. 2004). Ce domaine semble ainsi suffisant pour la liaison avec les petits peptides, bien que les autres domaines contribuent à l'association de PDI avec les peptides de plus grande taille (Klappa, Ruddock et al. 1998; Klappa, Koivunen et al. 2000). La comparaison des séquences du domaine b' de PDI et des autres membres de la famille a permis de prédire que PDIp, ERp27, PDILT et ERp44 pouvaient lier les substrats probablement de la même façon que PDI. Les autres membres de la famille PDI doivent probablement posséder des domaines de liaison au substrat trop différents en séquence pour être reconnus. Il est aussi envisageable qu'ils s'associent avec d'autres protéines du RE qui peuvent, elles, recruter des substrats. C'est le cas notamment d'ERp57 et de la calnexine/calréticuline. En effet, pour ERp57, le domaine b' ne sert pas à la reconnaissance du substrat mais à la liaison avec la calnexine ou la calréticuline (Russell, Ruddock et al. 2004). De plus, il semblerait que la reconnaissance et l'interaction au préalable de la plupart de ces substrats avec la calnexine ou la calréticuline soit nécessaire pour que ERp57 puisse jouer son rôle de catalyseur (Jessop, Tavender et al. 2009). Néanmoins, ERp57 a aussi été montré comme ayant un rôle indépendant des lectines, il intervient notamment dans l'isomérisation des ponts disulfures nécessaire à la formation des complexes de CMH de classe I (Zhang, Baig et al. 2006). De manière comparable à ERp57, PDI P5 s'associe avec la chaperonne BiP et interagit avec ses substrats, incluant ceux adressés au système ERAD (Meunier, Usherwood et al. 2002). Par ailleurs, une analyse récente de la structure du domaine b b' de ERp72 a montré une forte similarité avec celui de ERp57, bien que ERp72 n'interagisse pas avec la calnexine.

En plus de leurs activités d'oxydoréductase, certaines PDI facilitent le repliement des protéines en tant que chaperonnes (**Figure 11**). PDI facilite notamment le repliement des protéines GAPDH et rhodanèse dénaturées (Cai, Wang et al. 1994; Song and Wang 1995). Aucune de ces protéines ne contient de ponts disulfures, confirmant l'activité chaperonne de PDI. Le site actif d'activité redox n'est pas essentiel pour son activité de chaperonne, puisque l'alkylation du résidu cystéine du site actif a été montrée comme n'inhibant pas le repliement de la GAPDH dénaturée (Quan, Fan et al. 1995). Il a été suggéré que tous les domaines de

PDI contribuent à son activité de chaperonne néanmoins, l'extrémité C-terminale de la protéine incluant le domaine a' et c semble primordiale (Tian, Li et al. 2004).

Cependant, encore peu d'informations sont encore disponibles sur la régulation de l'expression des membres de la famille des PDI, leur distribution tissulaire ou leur rôle in vivo sur la biogénèse et la dégradation protéique.

b) Ero1

Pour assurer un repliement efficace des protéines dans le RE, les PDI doivent être rapidement réoxydées. Cette étape semble être majoritairement sous la dépendance d'une famille de protéines conservées les Ero1. Cette famille de protéines est composée d'un site catalytique CXXC similaire aux PDI qui a pour fonction d'oxyder les protéines disulfides isomérases. L'oxydoréductin 1 ou Ero1 est la mieux caractérisée. Cette enzyme oxyde les PDI et transporte les électrons et protons vers son co-facteur la flavine adénine dinucléotide (FAD), le convertissant en FADH2. La réaction se termine alors lorsque le FADH2 cède ses électrons et protons à l'oxygène qui représente ici l'accepteur final. Le FADH2 est alors converti en FAD et l'oxygène en une molécule d'H₂O₂ (**Figure 12**). La réactivation d'Ero1 par l'oxygène génère ainsi des dérivés réactifs de l'oxygène dans le RE qui peuvent causer des dommages cellulaires et doivent donc être rapidement détoxifiés. Cependant, les mécanismes protecteurs permettant cette détoxification sont encore mal élucidés. De plus, la génération d'H₂O₂ doit être finement contrôlée afin de limiter la mise en place de conditions hyper-oxydantes. Récemment, un mécanisme de rétro-contrôle de l'activité d'Ero1 a été identifié. En effet, Ero1 contient plusieurs cystéines non catalytiques qui forment des ponts disulfures intra-moléculaires dans des conditions hyper-oxydantes, ce qui atténue l'activité oxydase d'Ero1.

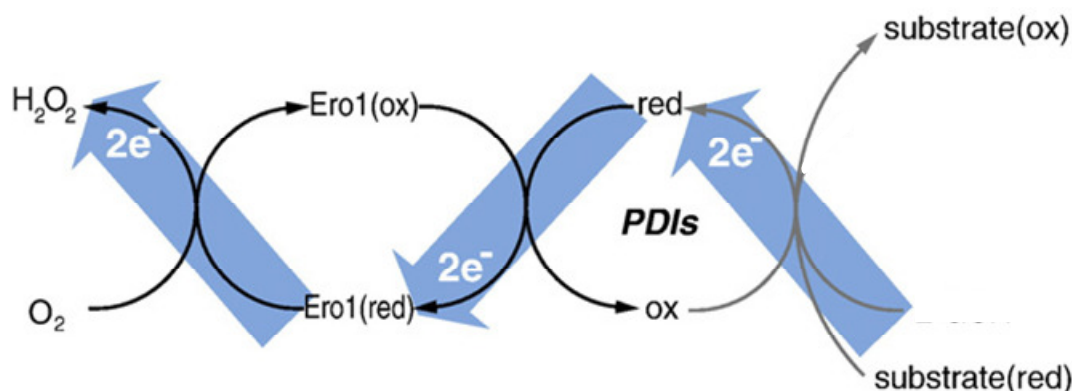


Figure 12 : Régulation de l'oxydation de PDI via ERO1

Dans le RE de la levure, une seule Ero1 a été identifiée. À l'inverse, plusieurs Ero1 existent chez les mammifères : Ero1 α et Ero1 β (Ero1L pour Ero1 Like). Aucune de ces deux protéines ne possède de motifs de retention dans le RE connus, elles semblent ainsi maintenues dans le RE via une association avec la protéine PDI ou la protéine ERp44. De plus, PDI a été montrée comme chaperonnant Ero1, sa propre oxydase, en prévenant son agrégation et sa dimérisation (Otsu, Bertoli et al. 2006).

4- Les peptidyl-prolylisomérases (PPIases)

Les liaisons peptidiques sont synthétisées en configuration *trans* par le ribosome et la majorité des liaisons peptidiques dans les protéines repliées adoptent naturellement une conformation *trans*, énergétiquement plus stable que la configuration *cis*. Néanmoins, les liaisons peptidiques faisant intervenir des prolines font exception à cette règle, les configurations *cis* et *trans* étant d'énergie égale. Selon les chaînes polypeptidiques, 6 à 38% des liaisons peptidiques acide aminé X - Proline sont dans une configuration *cis* dans les protéines bien conformées. Le changement spontané de conformation de *trans* en *cis* est un procédé très lent mais la famille des peptidyl-prolylisomérases présente dans le RE catalyse cette réaction (Hebert and Molinari 2007) (**Figure 13**).

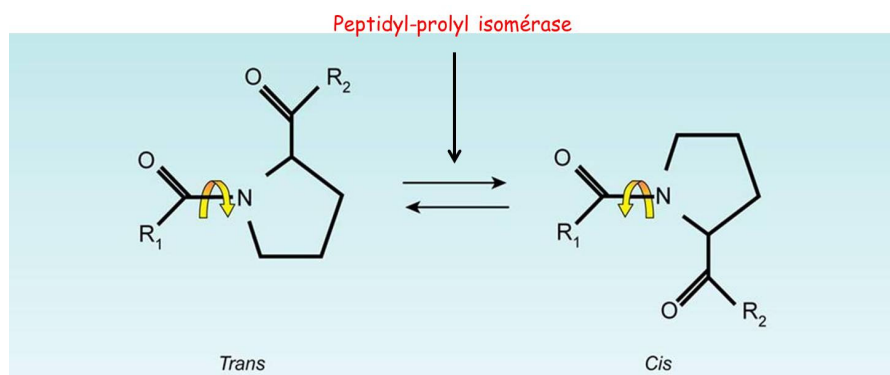


Figure 13 : Les peptidyl-prolyl isomérases (PPIases)

Schéma d'après (Hebert and Molinari 2007). Les PPIases permettent l'isomérisation des liaisons peptidyl-prolyl d'une conformation *trans* à *cis* et inversement, ce qui aboutit à un changement d'orientation de la chaîne peptidique dans l'espace.

Cette réaction induit donc une modification de l'orientation de la chaîne peptidique dans l'espace entraînant des changements dans la structure de la protéine. Si le changement d'orientation de la protéine n'est pas bien établi, ceci peut provoquer des modifications importantes sur les propriétés de la protéine (Lavoie, Albert et al. 2003). Les PPIases sont classifiées en trois familles, basées sur leur capacité à se lier à des drogues

immunosuppressives spécifiques : les membres de deux de ces classes ont été identifiés dans le RE : la cyclophilin B de la famille des cyclophilin et six membres de la famille des FK506. L'isomérisation de la proline a été identifiée comme étant une étape limitante dans le repliement de différents modèles protéiques incluant les fragments ScFv (Single chain Fragment variable) dérivés des anticorps et la ribonucléase A (Fischer and Bang 1985; Jager and Pluckthun 1997). La correction de l'orientation de la liaison proline est une étape tardive dans le repliement protéique et intervient quand la protéine a atteint une conformation quasi complète (Lilie, Rudolph et al. 1995).

III. Le système de surveillance du repliement des protéines du RE

1- Surveillance du repliement des protéines glycosylées

Dans la cellule, existent différents systèmes de contrôle qui visent à limiter au maximum la production de macromolécules aberrantes. Ce processus dit de surveillance intervient à chaque étape menant à la synthèse des protéines : de la transcription à l'assemblage oligomérique des protéines. Pour passer le point de contrôle final, la protéine doit avoir atteint sa conformation native, seule conformation qui confère à la protéine sa fonction biologique.

Dans le RE, le système de surveillance le mieux caractérisé à ce jour est celui des polypeptides N-glycosylés. Le rôle principal de ce système de surveillance des glycoprotéines est de vérifier la conformation correcte des glycoprotéines et de retenir les glycoprotéines mal conformées avant de les adresser vers les compartiments plus tardifs de la voie de sécrétion. La machinerie de surveillance du RE comprend de nombreuses protéines qui fonctionnent de façon coordonnée et synergique afin de sélectionner uniquement l'export des protéines correctement repliées. Ce mécanisme met en jeu diverses protéines et enzymes et notamment la calnexine et la calréticuline :

Lorsque les protéines entrent dans le RE, la plupart est rapidement N-glycosylée par ajout sur un résidu asparagine d'un N-glycan formé de deux N-acétylglucosamines, neuf mannoses et trois glucoses. Très vite, par l'action de l'enzyme membranaire, l' α -glucosidase I (Hettkamp, Legler et al. 1984) et de l'enzyme soluble, l' α -glucosidases II (formée de deux sous-unités α et β) (Trombetta, Simons et al. 1996) deux résidus glucoses sont clivés du N-glycan. Les protéines portent ainsi un N-glycan monoglucosylé, formé de deux N-acétylglucosamines, neuf mannoses et un glucose. La protéine monoglucosylée est alors reconnue par le système

de calnexine/calréticuline. L'interaction entre la calnexine/calréticuline et la glycoprotéine néosynthétisée en association avec la protéine disulfide isomérase ERp57 aboutit à la formation d'un complexe favorisant le repliement de la glycoprotéine. Lorsque le glucose restant est clivé par l' α -glucosidase II et ce de manière indépendante de la conformation de la protéine (Pelletier, Marcil et al. 2000), le polypeptide perd son affinité pour le système calréticuline/calnexine. Cependant, si le polypeptide n'est pas dans son état de repliement définitif, il est alors reconnu par l'enzyme UGGT qui est capable de reglucosyler la protéine substrat (sur la branche A du N-glycan, voir la structure du N-glycan **Figure 7**) ce qui permet de restaurer son affinité pour le système des lectines (Parodi 2000). L'action de l'UGGT permet donc aux protéines qui n'auraient pas atteint leur conformation native de subir un nouveau cycle de repliement (**Figure 14**).

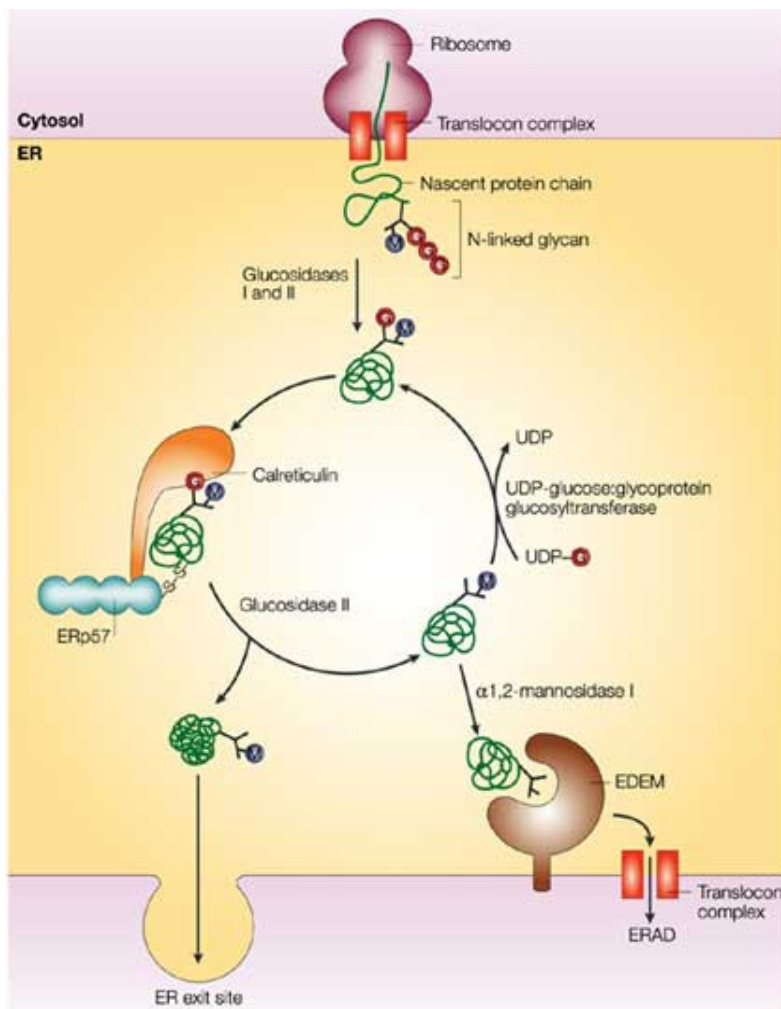


Figure 14 : Surveillance du repliement des protéines N-glycosylées : Cycle de la calnexine/calréticuline
Schéma adapté (Ellgaard and Helenius 2003).

a) L UDP-Glucose Glycoprotein GlucosylTransferase (UGGT)

L'UGGT est une enzyme luminale qui est exprimée de manière ubiquitaire dans le RE de la plupart des espèces eucaryotes (Trombetta, Bosch et al. 1989) et qui a été séquencée à partir de différentes sources. Chez le rat, l'UGGT est une grosse glycoprotéine soluble de 170kDa avec un signal de rétention dans le RE de type KDEL-like (HDEL) au niveau de sa partie N-terminale. Le domaine C-terminal d'UGGT est responsable de la reconnaissance du nucléotide donneur de sucre (UDP-glucose) et contient le domaine catalytique. Dans cette région, il a été identifié deux motifs très conservés : un motif DxD, le plus conservé, qui permet probablement la liaison à la molécule UDP-glucose et le motif DGDxxN, probablement impliqué dans la reconnaissance du résidu N-acétylglucosamine lié à l'asparagine de la glycoprotéine substrat à laquelle le glucose est transféré (Arnold, Fessler et al. 2000; Tessier, Dignard et al. 2000). Le domaine N-terminal de UGGT a un plus faible degré de conservation de séquence entre les espèces suggérant qu'il intervient dans la reconnaissance de la conformation des protéines (Parodi 2000).

UGGT reconnaît simultanément deux critères sur une protéine malconformée : d'une part, l'exposition de ses séquences hydrophobes et d'autre part, le motif oligosaccharidique (Sousa and Parodi 1995; Taylor, Ferguson et al. 2004). Il a plus récemment été proposé que l'UGGT reconnaît le résidu N-acétylglucosamine de l'oligosaccharide lié à la protéine, qui serait uniquement accessible sur les protéines malconformées. La structure flexible de ce résidu N-acétylglucosamine et les acides aminés environnants semblent être le déterminant clé dans la reconnaissance des protéines mal conformées par UGGT (Sousa and Parodi 1995; Taylor, Ferguson et al. 2004). Néanmoins, la nature exacte du déterminant protéique reconnu par UGGT reste encore floue.

Parallèlement, des études semblent indiquer que la reconnaissance des substrats par UGGT est similaire à celle de BiP, UGGT se liant à des nonapeptides hydrophobes (Trombetta and Parodi 1992). Par ailleurs, *in vivo*, les protéines totalement dénaturées semblent être de faibles substrats pour UGGT (Fernandez, D'Alessio et al. 1998), suggérant que UGGT reconnaît des substrats partiellement structurés et ainsi que UGGT interviendrait en aval de BiP.

UGGT apparaît ainsi comme étant un senseur extrêmement sensible de la structure tridimensionnelle des glycoprotéines qui permettrait de sélectionner les glycoprotéines incomplètement repliées pour un nouveau cycle de repliement en ignorant les polypeptides fortement mal-conformés.

Ce cycle de la calnexine/calréticuline peut se répéter plusieurs fois et aboutit, soit à une protéine correctement repliée qui est exportée hors du RE vers l'appareil de Golgi, soit à la dégradation de la protéine. En effet, si au bout d'un certain temps, la glycoprotéine n'a toujours pas atteint sa conformation native, elle est alors adressée à la dégradation. Dans le RE, deux systèmes de dégradation co-existent afin d'éliminer les protéines mal conformées et d'éviter leur accumulation dans la lumière du RE. Majoritairement, les protéines solubles vont être éliminées via le système ERAD, rétrotransloquées dans le cytosol et dégradées via le protéasome. A l'opposé, les agrégats protéiques seront éliminés par macro-autophagie.

Le signal inducteur du système ERAD des glycoprotéines est le clivage d'un mannose effectué par l'enzyme ER α 1,2 mannosidase de type I (ER pour Endoplasmic Reticulum). La conformation du N-glycan à huit mannoses empêche ainsi la reconnaissance de la glycoprotéine par l'UGGT et permet la reconnaissance de la protéine par la protéine EDEM (ER Degradation Enhancing α 1,2 Mannosidase like protein) qui semble cibler les protéines au système ERAD (**Figure 14**).

La sortie des protéines bien conformées vers l'appareil de Golgi et l'adressage des protéines (glycosylées et non glycosylées) définitivement mal repliées au système de dégradation seront développés dans le chapitre suivant (**Chapitre III : export des protéines hors du RE**).

2- Surveillance du repliement des protéines non glycosylées

Les protéines non glycosylées sont soumises à un autre système de surveillance, qui fait probablement intervenir les chaperonnes du RE telles que BiP ou GRP94 (Okuda-Shimizu and Hendershot 2007). A l'heure actuelle, peu de choses sont connues sur ce système de surveillance. Cependant des travaux récents de Sekijima et al., ont permis de mettre en évidence que le système de surveillance des protéines non glycosylées dépendrait de leur niveau d'énergie. Cette étude suggère ainsi qu'il existe au sein du RE une compétition basée sur le niveau énergétique des protéines, opposant deux systèmes : le système ERAF (ER Assisted Folding), influencé par l'énergie de repliement des protéines et la distribution des protéines chaperonnes, et le système ERAD (Sekijima, Wiseman et al. 2005).

Chapitre III : Export des protéines hors du RE

Les protéines qui acquièrent une conformation tri-dimensionnelle correcte sont exportées vers l'appareil de Golgi. Dans ce compartiment, elles poursuivent leur maturation avant de rejoindre leur destination finale : le milieu extracellulaire, la membrane plasmique ou un compartiment particulier de la voie de sécrétion. En revanche, les protéines dont le processus de repliement échoue et qui n'atteignent pas une conformation correcte malgré plusieurs cycles dans la machinerie de repliement vont être spécifiquement reconnues et dégradées. Ce processus permet d'éviter une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE qui pourrait entraîner des dysfonctions de l'organite.

A. Export des protéines correctement conformées vers la voie de sécrétion

Sur la base des travaux pionniers de Georges Palade et de ses collaborateurs, différentes études ont montré que les protéines correctement conformées, également appelées « cargo » ayant passé avec succès le contrôle qualité du RE, se concentrent dans des sous domaines spécifiques du RE avant d'être transportées vers l'appareil de Golgi. Ces sous-domaines appelés RE de transition sont des régions du RE rugueux, dépourvues de ribosome, qui présentent des bourgeonnements caractéristiques recouverts d'un manteau protéique particulier dit COPII (COat Protein complex II) (Palade 1975; Hobman, Zhao et al. 1998). Le RE de transition et les structures post-RE libérées entourées de COPII forment les sites de sortie du RE ou ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Site) (Stephens 2003). Dans les cellules mammifères, ces sites ont un diamètre approximatif de 0,5µm et sont des structures relativement stables et immobiles (Hammond and Glick 2000). Plusieurs centaines d'ERES peuvent être rencontrés à travers le cytoplasme et dans des régions juxta-nucléaires (Bannykh, Rowe et al. 1996).

I. Formation des vésicules COPII au niveau des sites de sortie du RE

Les sites de transition du RE sont ainsi spécialisés dans la production et le transport des vésicules COPII tapissées d'un manteau complexe et hétérogène qui vont permettre de transporter les protéines du RE vers l'appareil de Golgi. La première étape dans l'assemblage des vésicules COPII, est l'activation d'une petite GTPase Sar1 (Secretion associated ras-superfamily 1) via son facteur d'échange de guanine (GEF=Guanine Exchange Factor) Sec12. L'échange GDP/GTP conduit à l'exposition d'une hélice amphiphatique en N-terminale de Sar1, permettant ainsi son insertion dans la membrane du RE (Bi, Corpina et al. 2002). Cette insertion provoque les premières déformations de la membrane. Via une interaction directe avec Sec23, Sar1 recrute un complexe hétérodimérique cytosolique Sec23-Sec24. Cette association aboutit à la formation d'un complexe stable dit de pré-bourgeonnement qui forme la couche interne du manteau (Yoshihisa, Barlowe et al. 1993). La couche externe du manteau est alors recrutée à la membrane du RE. Cette couche est formée d'un hétérotétramère Sec13-Sec31 qui s'auto-assemble pour former une sorte de cage de forme cuboctaédrale qui amorce la formation du bourgeon (Lederkremer, Cheng et al. 2001). Peu après le bourgeonnement, la vésicule COPII perd son manteau dû à l'hydrolyse du GTP de Sar1 (Saito, Kimura et al. 1998) (**Figure 15**).

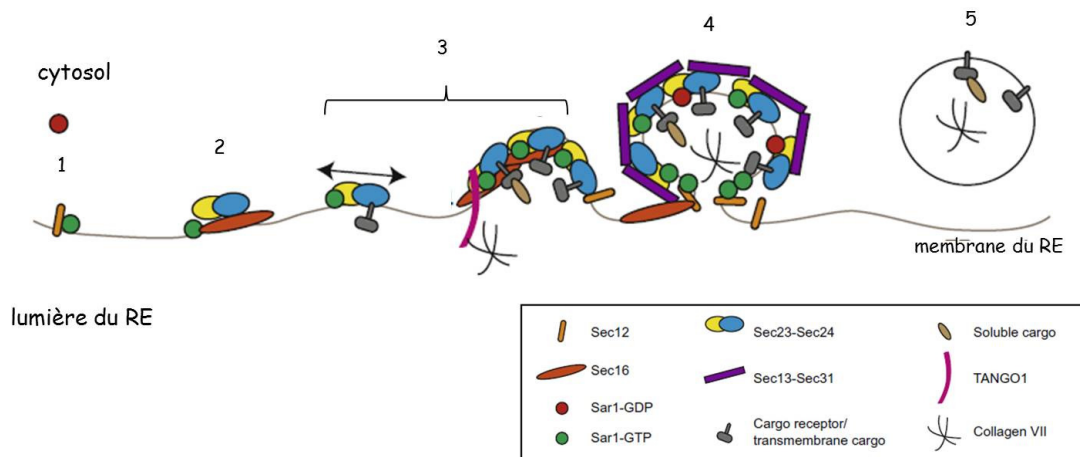


Figure 15 : Représentation schématique de la formation des vésicules COPII

Schéma adapté de (Budnik and Stephens 2009). 1. Activation de Sar1 par échange du GDP en GTP, via sec12. 2. Recrutement de la couche interne du manteau COPII formé par le complexe Sec23-Sec24 ce qui provoque les premières déformations de la membrane. 3. Propagation de la formation du manteau COPII et recrutement des substrats (voir paragraphe 2). 4. Recrutement de la couche externe du manteau COPII formé par le complexe Sec13-Sec31 et formation du bourgeon. 5. Hydrolyse du GTP de Sar1 et perte du manteau de la vésicule COPII.

II. Incorporation des protéines « cargo » dans les vésicules de transport

Il existe à l'heure actuelle deux théories qui s'affrontent sur la manière dont les protéines cargo sont incorporées dans les vésicules de transport COPII. La première théorie est basée sur un modèle d'incorporation non sélectif, par flux de masse, dans lequel les protéines cargo sont incorporées par défaut dans les vésicules en direction de la membrane plasmique. Dans ce modèle, toutes les protéines sont incorporées dans les vésicules et seules les protéines résidentes du RE contiennent un motif permettant leur rétention dans le RE (Wieland, Gleason et al. 1987). Ce modèle était le seul envisagé jusqu'aux travaux de Balch et de ses collègues dans les années 90, qui ont mis en évidence l'existence d'un transport régulé des protéines cargo (Balch, McCaffery et al. 1994). Cette deuxième théorie est un modèle de transport sélectif régulé des protéines cargo, qui nécessite la présence aux sites de sorties du RE de récepteurs aux protéines cargo, qu'elles soient membranaires ou solubles. Ainsi, le modèle de transport RE-appareil de Golgi admis actuellement semble être une combinaison entre ces deux théories. A l'heure actuelle, il existe encore peu d'informations sur les protéines pouvant jouer ce rôle d'adressage des protéines cargo aux vésicules COPII. Cependant, la majorité des cargo transmembranaires semble être capturée via l'interaction directe avec Sec24, qui présente de multiples sites de liaison cargo-indépendante (Miller, Antonny et al. 2002). Les cargos solubles, quant à eux, interagissent indirectement avec les protéines du manteau via l'intervention d'un récepteur transmembranaire (**Figure 16**). De récents travaux semblent indiquer que la protéine ERGIC53 pourrait jouer ce rôle de récepteur pour certaines glycoprotéines (Appenzeller, Andersson et al. 1999). ERGIC53 est une protéine membranaire de 53kDa de type I qui possède tous les critères pour être un récepteur de transport : tout d'abord, bien qu'il soit localisé principalement dans le compartiment ERGIC (ER-Golgi Intermediate Compartment), le compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi, il est constitutivement recyclé du ERGIC au RE. Ensuite, il possède un segment d'environ deux cents acides aminés dans son domaine luminal qui présente une homologie avec les domaines lectines. Et enfin, il possède dans sa partie cytosolique, un domaine qui médie la liaison avec les molécules COPII (Kappeler, Klopfenstein et al. 1997). En effet, ERGIC53 interagit directement avec Sec23 conduisant au recrutement des complexes ERGIC53-cargo dans les vésicules COPII. Après avoir atteint le compartiment ERGIC, le cargo est dissocié de ERGIC53 qui est recyclé vers le RE (Itin, Schindler et al. 1995). Néanmoins, à ce jour, peu de substrats de ERGIC53 ont été formellement caractérisés.

Par ailleurs, d'autres lectines capables de recruter les protéines cargo ont été identifiées. Il s'agit de VIP36 (36kDa Vesicular Integral membrane Protein) et VIPL (VIP36-Like), deux protéines transmembranaires localisées comme ERGIC53 à la fois dans le RE et dans le compartiment ERGIC. Ces lectines semblent impliquées dans la reconnaissance des glycoprotéines mais avec un spectre de sélectivité plus restreint qu'ERGIC53 (Reiterer, Nyfeler et al.; Kamiya, Kamiya et al. 2008).

D'autre part, l'incorporation des gros complexes protéiques tels que le procollagène ou les lipoprotéines semble être un processus à part. Des protéines transmembranaires telles que Erv29p chez la levure ou TANGO1 (Transport AND Golgi Organisation 1) chez les mammifères ont été identifiées comme permettant de coupler les gros complexes cargo et les protéines de manteau. Pour exemple, TANGO1 peut lier le collagène de type VII au niveau de son domaine luminal et peut aussi interagir avec Sec23-24 au niveau de son domaine cytosolique. Cependant, contrairement aux autres récepteurs de cargo connus, TANGO1 n'est pas incorporé dans les vésicules de transport (Saito, Chen et al. 2009) (**Figure 15**).

Nom du récepteur de cargo	Protéine(s) cargo(s) transportée(s)
ERGIC-53	Facteurs de coagulation V et VIII Cathepsine C α 1-antitrypsine
VIP36	α -amylase α 1-antitrypsine
VIPL	Glycoprotéines sécrétées non identifiées
TANGO1	Collagène VII

Figure 16 : Tableau représentant les principaux récepteurs de protéines cargos identifiés

Les protéines résidentes du RE qui accidentellement se retrouvent transportées dans les vésicules COPII jusqu' à l'appareil de Golgi sont redirigées vers le RE selon un transport rétrograde, après reconnaissance par un récepteur et formation de vésicules de type COPI (Ostermann, Orci et al. 1993). La plupart des protéines résidentes du RE possèdent ainsi une séquence KDEL (ou KDEL-like) (Raykhel, Alanen et al. 2007) dans leur partie C-terminale

qui permet la liaison de la protéine avec un récepteur au KDEL présent au niveau de la face cis de l'appareil de Golgi. Les protéines membranaires quant à elles, contiennent majoritairement un motif di-lysine (KKxx ou KxKxx) et sont soit retenues directement dans le RE, soit ramenées depuis l'appareil de Golgi (Cosson and Letourneur 1994; Teasdale and Jackson 1996).

B. Export et dégradation des protéines définitivement mal conformées

Comme nous l'avons vu précédemment, si la conformation native de la protéine n'est pas atteinte après plusieurs cycles dans la machinerie de repliement, les protéines sont alors prises en charge afin d'être dégradées. Deux mécanismes semblent jouer un rôle dans cette clairance du RE : la voie de dégradation associée au RE ou ERAD qui semble être la voie majoritaire, principalement impliquée dans la dégradation via le protéasome des protéines mal conformées solubles, et la macro-autophagie du RE, permettant entre autres la dégradation des agrégats protéiques.

Ces systèmes de dégradation permettent d'éviter que des polypeptides n'ayant pas atteint une conformation correcte ne soient retenus inutilement par la machinerie de repliement et ne s'accumulent dans la lumière du RE, ce qui pourrait avoir des conséquences néfastes sur le fonctionnement du RE et de la cellule.

I. Dégradation des protéines via la voie de dégradation associée au RE (ERAD)

Le système ERAD utilise le système ubiquitine/protéasome (UPS : Ubiquitin/Proteasome System) afin de dégrader ses substrats. L'UPS est la machinerie cellulaire majeure d'élimination des protéines dans les cellules eucaryotes. Ce système de dégradation est localisé dans le cytoplasme, ce qui impose que les protéines mal conformées du RE soient reconnues et rétrotransloquées à travers la membrane du RE vers le cytosol. Cette voie de dégradation peut être ainsi divisée en quatre étapes : 1. reconnaissance des protéines définitivement mal conformées, les substrats de l'ERAD. 2. rétrotranslocation des substrats dans le cytosol. 3. poly-ubiquitination du substrat (et déglycosylation pour les glycoprotéines)

et enfin 4. dégradation par le protéasome (Jarosch, Lenk et al. 2003; McCracken and Brodsky 2005) (**Figure 17**).

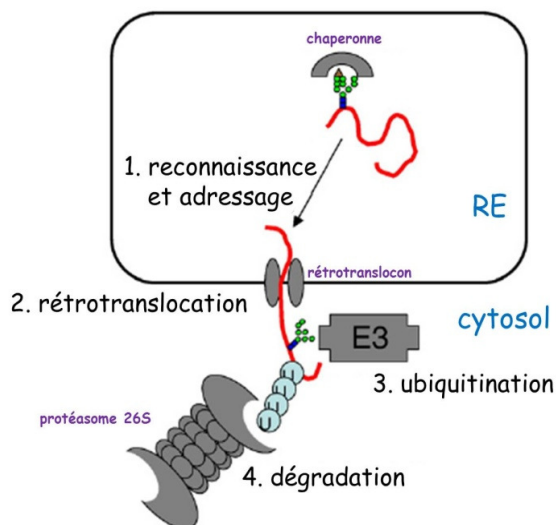


Figure 17 : Schéma récapitulatif des différentes étapes du système ERAD

Schéma adapté de (Yoshida and Tanaka). Première étape : les protéines et glycoprotéines mal conformées sont reconnues par des chaperonnes et/ou des lectines spécialisées qui vont les adresser au complexe de rétrotranslocation. Deuxième étape : les polypeptides sont rétrotransloqués de la lumière du RE vers le cytoplasme via un canal. Troisième étape : quand la chaîne polypeptidique est disponible dans le cytosol elle est poly-ubiquitinylée et déglycosylée (pour les glycoprotéines). Quatrième étape : les polypeptides sont dégradés par le protéasome.

Chez la levure *S. cerevisiae*, il existe trois sous-systèmes ERAD majeurs qui dépendent de la localisation du domaine mal conformé de la protéine substrat (dans la lumière du RE (substrats solubles/substrats transmembranaires), dans la membrane ou dans le cytosol (substrats transmembranaires)). Ces différentes voies de signalisation nommées ERAD-L (L pour luminal), ERAD-C (C pour cytosolic) et ERAD-M (M pour membrane) comportent à la fois des parties distinctes et des parties convergentes (Carvalho, Goder et al. 2006). La machinerie de l'ERAD chez les mammifères possède des composants analogues au système chez la levure, cependant le système est bien plus complexe, et il n'est pas établi qu'il existe des différents sous-systèmes ERAD.

Dans la suite de cet exposé, nous nous focaliserons sur les différentes étapes du système ERAD décrit chez les mammifères et les différents acteurs moléculaires impliqués dans chacune d'entre elles en précisant lorsque cela s'avère nécessaire l'état des connaissances chez la levure.

1- Système ERAD des protéines glycosylées

La plupart des protéines qui entrent dans le RE étant N-glycosylée, le système ERAD le plus commun et le plus décrit est celui qui permet la dégradation des glycoprotéines. Ce système est aussi appelé GERAD (Glycoprotein ER Associated Degradation).

a) Reconnaissance des substrats

i. Importance du clivage des mannoses du N-glycan et rôle de la protéine

EDEM

Il apparaît, à l'heure actuelle, que la structure de la chaîne polypeptidique et la composition du N-glycan sont les deux facteurs clés dans la sortie des glycoprotéines définitivement mal conformées du cycle de repliement. En effet, tout d'abord, UGGT, dont l'action est nécessaire pour retenir les polypeptides non natifs dans le cycle de la calnexine/calréticuline, reconnaît spécifiquement les polypeptides dont la conformation approche de la conformation native et est supposé ignorer les polypeptides fortement mal conformés (Fernandez, D'Alessio et al. 1998). Ensuite, il existe dans la lumière du RE des ER α 1,2 mannosidase de type I, enzymes transmembranaires de la famille des glycoside hydrolase 47 (GH47), capables de cliver spécifiquement un mannose sur la branche B du N-glycan (lié en α 1,2) de manière indépendante de la structure de la protéine (voir structure du N-glycan, **Figure 7**) (Tremblay, Campbell Dyke et al. 1998; Tremblay and Herscovics 1999). Ce clivage des mannoses est un processus lent qui a été proposé comme jouant le rôle de chronomètre du temps de présence d'une protéine dans le RE. Ainsi, plus la protéine met du temps à atteindre sa conformation correcte, plus les N-glycans de cette protéine sont exposés à l'action de l'ER α 1,2 mannosidase I, ce qui va conduire à la formation d'un N-glycan à huit mannoses (8B), diminuant ainsi sa reconnaissance et sa reglucosylation par UGGT. Cette forme du N-glycan à huit mannoses semble être le point de départ du ciblage de la protéine substrat vers la dégradation. Chez la levure *S. cerevisiae*, la perte de ce seul mannose est suffisante pour activer le système ERAD. Chez les mammifères, le nombre de mannoses substitués pour induire l'ERAD n'est pas encore clairement établi mais semble plus important (Schrage, Procopio et al. 2003; Molinari 2007). En effet, le clivage du mannose terminal de la branche A qui est l'accepteur de la reglucosylation semble également nécessaire pour conduire à l'extraction définitive du polypeptide du cycle de la calnexine/calréticuline. De plus, des clivages ultérieurs générant des formes à six voire à cinq mannoses semblent aussi importants

dans cet adressage des polypeptides malconformés vers la dégradation. Comme nous le verrons par la suite, les enzymes responsables de ces clivages dits extensifs des mannoses sont encore, à ce jour, sujets à débat.

Néanmoins, il a été mis en évidence que l'isomère du N-glycan à huit mannoses où un mannose a été clivé sur la branche B est reconnu par une protéine appelée EDEM1. EDEM1 a été récemment identifié comme étant une lectine putative du RE impliquée dans l'adressage des glycoprotéines mal repliées vers la rétrotranslocation et la dégradation (Hosokawa, Wada et al. 2001; Schrag, Procopio et al. 2003; Molinari 2007). EDEM1 a été initialement caractérisée comme une protéine membranaire intégrale de type II localisée dans le RE (Hosokawa, Wada et al. 2001; Schrag, Procopio et al. 2003; Molinari 2007) mais des données plus récentes du groupe de M. Molinari indiquent que EDEM1 est aussi une protéine soluble dans certains types cellulaires (Olivari, Galli et al. 2005). Deux études publiées dans Science ont ainsi pu démontrer qu'EDEM1 accélère la sortie des glycoprotéines aberrantes du cycle de la calnexine et accélère leur dégradation via le protéasome. Ces études semblent indiquer que cette protéine aurait pour rôle d'extraire les protéines mal conformées définitivement du cycle de la calnexine. De plus, il a été montré que EDEM1 co-immunoprécipite avec la calnexine suggérant que EDEM1 acquiert ses substrats directement depuis la calnexine (Molinari, Calanca et al. 2003; Oda, Hosokawa et al. 2003). Des études ultérieures dans les bases de données ont identifié deux homologues de EDEM1 : EDEM2 et EDEM3 (Mast, Diekman et al. 2005; Olivari, Galli et al. 2005; Hirao, Natsuka et al. 2006). EDEM 1, 2, et 3 font aussi partie de la famille des GH47 et partagent des homologies avec les ER α 1,2 mannosidases I, bien que leur capacité à porter une activité mannosidase soit controversée (**Figure 18**). En effet, tandis que plusieurs études n'ont détecté aucune activité mannosidase in vitro pour les différents EDEM, d'autres ont mis en évidence une augmentation de la démannosylation de substrats de l'ERAD dans des conditions expérimentales de surexpression d'EDEM1 ou EDEM3 (Hosokawa, Tremblay et al.; Hirao, Natsuka et al. 2006).

De plus, les trois protéines EDEM 1, 2 et 3 ont été montrées comme s'associant à un substrat de l'ERAD bien caractérisé, le variant NHK (Null Hong Kong) de l' α -1 antitrypsine, et médient sa dégradation (Hosokawa, Wada et al. 2001; Mast, Diekman et al. 2005; Hirao, Natsuka et al. 2006; Hosokawa, Wada et al. 2006).

Comme cela a été mentionné précédemment, l'entité enzymatique responsable de la dégradation du N-glycan à huit mannoses en des formes à sept, six voire cinq mannoses dans le RE n'est pas à ce jour clairement identifiée et pourrait ne pas être l'œuvre d'une enzyme résidente du RE. En effet, il a été montré que des protéines définitivement mal conformées

peuvent cycler entre le RE et l'appareil de Golgi avant d'être dirigées vers la dégradation. De plus, la face cis de l'appareil de Golgi des mammifères (voir **introduction générale Figure 1**) présente trois enzymes transmembranaires à activité mannosidase, membres de la famille des GH47, les Golgi α 1,2-mannosidase IA, IB, IC (**Figure 18**). Ces enzymes sont capables de dégrader les molécules à huit mannoses en molécules à six voire à cinq mannoses (Lal, Pang et al. 1998; Tremblay and Herscovics 2000). Ces enzymes ont aussi été montrées comme stimulant la dégradation du mutant NHK de l' α -1 antitrypsine (Hosokawa, You et al. 2007). Cependant, des données in vitro montrent que l'ER α 1,2 mannosidase I est aussi capable de cliver des mannoses sur la branche A et la branche C du N-glycan dans des conditions non physiologiques (Herscovics, Romero et al. 2002). Ainsi, au moins trois possibilités existent quant à l'identité de la mannosidase impliquée dans le clivage extensif des mannoses du N-glycan : tout d'abord, les substrats de l'ERAD et l'ER α 1,2 mannosidase I pourraient être regroupés dans des sous régions du RE où la concentration en mannosidase pourrait atteindre des niveaux similaires à ceux utilisés in vitro entraînant un clivage extensif des mannoses (Avezov, Frenkel et al. 2008). Ensuite, il est envisageable que les mannosidases de l'appareil de Golgi interviennent et clivent les mannoses des branches A ou C du N-glycan. Enfin, les membres de la famille EDEM (notamment EDEM 3 et 1) dont des données récentes semblent imputer une activité mannosidase pourraient intervenir dans ce clivage.

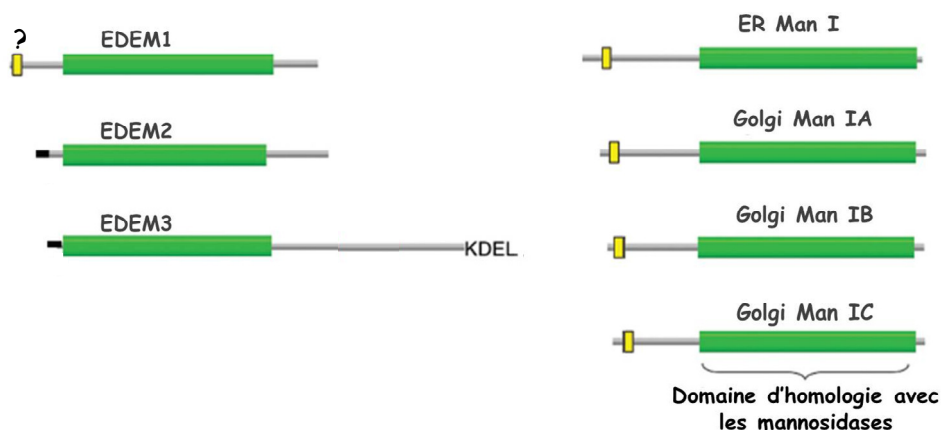


Figure 18 : Représentation schématique des différents domaines des membres de la famille des glycoside hydrolase 47 (GH47).

Schéma d'après (Mast, Diekman et al. 2005). Le domaine d'homologie aux mannosidases est représenté en vert, le peptide signal en noir, les domaines transmembranaires en jaune et les autres séquences en gris.

ii. Rôle des protéines OS9 et XTP3B

Le clivage extensif des mannoses, outre le fait qu'il entraîne la sortie définitive de la protéine définitivement mal conformée du cycle de repliement, permet aussi de générer un oligosaccharide qui va servir de ligand pour d'autres lectines impliquées dans le système ERAD, OS-9 (OsteoSarcoma amplified 9) et XTP3-B (ou Erlectin) (**Figure 19**). Ces lectines semblent reconnaître les N-glycans exposant un résidu mannose lié en $\alpha 1,6$ c'est-à-dire après clivage du mannose lié en $\alpha 1,2$ de la branche C (ces N-glycans pouvant ainsi comporter sept, six ou cinq mannoses au total) (Mikami, Yamaguchi et al.; Yamaguchi, Hu et al.; Hosokawa, Kamiya et al. 2009). OS-9 et XTP3-B sont des glycoprotéines solubles résidentes du RE qui contiennent un ou plusieurs domaines lectines homologues au récepteur au mannose6-phosphate (domaines MRH pour Mannose6-phosphate Receptor Homology) et qui présentent 23% d'homologie entre elles (Cruciat, Hassler et al. 2006).

OS-9 a deux variants transcriptionnels majoritaires et leur déplétion induit une inhibition significative de la dégradation du mutant NHK de l' $\alpha 1$ -antitrypsine (Bernasconi, Pertel et al. 2008; Christianson, Shaler et al. 2008). En comparaison, XTP3-B possède deux variants transcriptionnels (une forme courte et une forme longue) et la surexpression de chacun d'entre eux retarde la dégradation du mutant NHK. A l'opposé, la déplétion de XTP3-B n'a pas d'impact sur la clairance de NHK (Christianson, Shaler et al. 2008). Par ailleurs, ces deux protéines semblent également capables de lier les substrats glycosylés de manière indépendante de leur domaine MRH ainsi que des substrats non glycosylés, suggérant qu'elles possèdent aussi la capacité de reconnaître directement les protéines mal conformées. Il a aussi été mis en évidence que OS9 et XTP3-B interagissent uniquement avec le mutant NHK de l' $\alpha 1$ -antitrypsine et pas avec la forme sauvage de la protéine (Yamaguchi, Hu et al.; Bernasconi, Pertel et al. 2008). Ainsi OS9 et XTP3-B semblent être des lectines impliquées comme EDEM dans la reconnaissance et l'adressage des protéines définitivement mal conformées à la rétrotranslocation et à la dégradation (**Figure 19**).

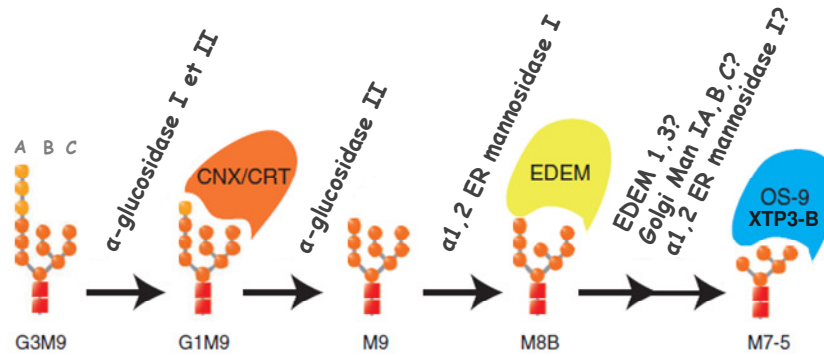


Figure 19 : Représentation schématique du remaniement du N-glycan menant à la reconnaissance des glycoprotéines définitivement mal conformées par les lectines du système ERAD

Schéma adapté de (Hoseki, Ushioda et al.). L'oligosaccharyltransférase transfère le N-glycan composé de 2 N-acétylglucosamine, 9 mannoses et 3 glucoses (G3M9) sur le polypeptide naissant. Les deux derniers glucoses sont immédiatement clivés par les α -glucosidases I et II. Cette forme monoglucosylée du N-glycan est reconnue par la calnexine/calréticuline (CNX/CRT), qui facilite le repliement des glycoprotéines. L'ER α 1,2 mannosidase I clive le dernier mannose de la branche B. Cette forme à 8 mannoses est reconnue par EDEM qui extrait la protéine définitivement du cycle de la CNX/CRT et adresse cette protéine au système ERAD. Une démannosylation extensive conduit à la formation de N-glycans de 7 à 5 mannoses, qui sont reconnus par les lectines OS-9 et XTP3-B.

iii. Autre(s) système(s) de reconnaissance des glycoprotéines définitivement mal conformées

Le clivage des mannoses des N-glycans n'est pas le seul mécanisme qui cible les protéines mal repliées à la dégradation. En effet, des chaperonnes résidentes du RE semblent pouvoir reconnaître les substrats de l'ERAD afin de les délivrer au système de rétro-translocation. Les protéines BiP et PDI ont ainsi été montrées comme s'associant avec des substrats de l'ERAD juste avant leur translocation (Molinari, Galli et al. 2002; Hosokawa, Wada et al. 2008). GRP94 a aussi été impliqué dans la reconnaissance de substrats de l'ERAD et dans leur adressage au système de retrotranslocation, notamment via la formation d'un complexe avec OS-9 (Christianson, Shaler et al. 2008). Cette reconnaissance des substrats de l'ERAD par les protéines chaperonnes reste à ce jour peu étudiée et semble être impliquée majoritairement dans la dégradation des protéines mal conformées non glycosylées (voir paragraphe **B II.2**).

Par ailleurs, outre leur rôle dans la reconnaissance des substrats de l'ERAD, les protéines chaperonnes semblent jouer un rôle important dans l'engagement des protéines vers la dégradation en maintenant la solubilité des substrats et en évitant la formation d'agrégats protéiques, permettant ainsi le maintien des protéines dans un état compétent pour la rétrotranslocation (Molinari, Galli et al. 2002). De plus, la réduction des ponts disulfures, notamment ceux intervenant dans les complexes multimériques, est nécessaire pour permettre

le passage des protéines mal conformées dans le cytosol. A ce jour, peu de membres de la famille des PDI ont été identifiés comme étant capables d'avoir une activité réductase dans un environnement oxydatif tel que le RE. Néanmoins, récemment, une étude a mis en évidence qu'une protéine co-chaperonne de BiP membre de la famille des PDI, ERdj5, était capable de se lier à EDEM et de jouer un rôle de disulfide reductase participant à l'ERAD. Pour exemple, ERdj5 est nécessaire à la dégradation du mutant NHK de l' α 1-antitrypsine en clivant les ponts disulfures intermoléculaires s'opposant ainsi à la formation de dimère (Ushioda, Hoseki et al. 2008).

b) Rétrotranslocation des substrats dans le cytosol

i. Nature du canal de translocation

Pour devenir accessible à la machinerie de dégradation, les protéines mal conformées doivent être entièrement retrotransloquées dans le cytosol et les protéines membranaires doivent être extraites de la membrane du RE. L'export de ces deux types de protéines du RE semble intervenir via un canal aqueux par lequel les substrats peuvent traverser la barrière hydrophobe que représente la membrane plasmique. L'identité de ce canal de rétrotranslocation est encore à ce jour très controversée. Ainsi, au moins deux acteurs semblent impliqués dans la rétrotranslocation des substrats de l'ERAD : le complexe Sec61 et les protéines Derlin.

1° Le complexe Sec61

Des analyses génétiques et biochimiques, notamment grâce à l'utilisation d'un substrat inhabituel de l'ERAD, la chaîne lourde des molécules de CMH de classe I, ont ainsi suggéré que le complexe de translocation Sec61 était impliqué dans ce processus de rétrotranslocation (Wiertz, Tortorella et al. 1996; Plemper, Bohmler et al. 1997; Zhou and Schekman 1999). En effet, les molécules de CMH de classe I, qui médient la présentation d'antigènes aux cellules immunes, sont adressées à la dégradation via le système ERAD lorsque les cellules sont infectées par le cytomégalo virus humain (CMV) (pour revue, (Hansen and Bouvier 2009)). Cet adressage à la dégradation est médiée par deux glycoprotéines, US2 et US11, codées par le CMV. Le complexe Sec61 a ainsi été montré

comme étant impliqué dans la dégradation de la molécule de CMH de classe I, induite par US2 (Wiertz, Tortorella et al. 1996). Le complexe Sec61 présente également la possibilité d'une ouverture latérale qui pourrait faciliter non seulement l'insertion des protéines membranaires dans la bicouche lipidique mais aussi l'extraction de celles-ci (Menetret, Neuhof et al. 2000). Cependant, dans ces conditions, ce canal devrait fonctionner de manière bidirectionnelle impliquant une régulation spécifique inconnue à ce jour. De plus, certains substrats de l'ERAD sont toujours glycosylés et repliés au moment de leur translocation (Blom, Hirsch et al. 2004) ainsi, le canal responsable du rétrotransport dans le cytosol doit posséder un pore d'une taille suffisamment importante pour permettre le passage de protéines glycosylées. La structure cristallographique de l'homologue archée de sec61 (voir **Chapitre I paragraphe II.1**) suggère que la taille du pore permet le passage de protéines ne dépassant pas les 1-2 nm (Van den Berg, Clemons et al. 2004) ce qui laisse supposer que les protéines encore glycosylées dont la taille peut atteindre jusqu'à 4nm ne sont pas rétrotransloquées via ce canal. Néanmoins, la structure cristallographique ne donne pas d'information sur la flexibilité du pore et des études antérieures avaient estimé que le diamètre du translocon pouvait atteindre jusqu'à 4-6nm (Hanein, Matlack et al. 1996; Hamman, Chen et al. 1997).

2° Les protéines de la famille Derlin

Récemment, un autre mécanisme permettant la rétrotranslocation des substrats de l'ERAD a été décrit. Celui-ci fait intervenir la protéine Derlin-1 qui interagit cette fois avec la protéine US11 codée par le CMV (Lilley and Ploegh 2004). Une analyse de séquence a indiqué que Derlin-1 est l'orthologue chez la levure de Der1p, une protéine identifiée dans un criblage de mutants qui induisent la stabilisation et la rétention de substrats de l'ERAD dans le lumière du RE (Knop, Finger et al. 1996). Derlin-1 est une petite protéine de 22kDa environ qui possède quatre domaines transmembranaires et dont les extrémités N- et C-terminales sont toutes deux dans le cytosol. Derlin-1 possède, chez l'Homme, deux autres homologues de la même famille appelés Derlin-2 et Derlin-3. De récents travaux ont montré que Derlin-2 et -3 interagissent avec le mutant NHK de l' α 1-antitrypsine. De plus, la surexpression de Derlin-2 et -3 accélère la dégradation du mutant NHK tandis que leur déplétion peut bloquer sa dégradation. Enfin, Derlin-2 et -3 semblent interagir avec la protéine EDEM1 (Oda, Okada et al. 2006). Sur la base de ces observations, les membres de la famille Derlin ont été supposés être des facteurs importants dans l'extraction de protéines aberrantes du RE. Néanmoins,

aucune donnée directe ne démontre que les membres de la famille Derlin forment des pores ce qui laisse la question de l'identité du canal de rétrotranslocation encore ouverte.

ii. Mécanisme de l'export dans le cytosol

Une autre question importante en ce qui concerne la rétrotranslocation est l'origine de l'énergie permettant le passage des substrats à travers le canal en direction du cytosol. Comme cela a été présenté précédemment, cette force est assurée, dans le cadre de l'import des protéines dans la lumière du RE, par la machinerie de traduction et par les protéines luminales d'engrenage (telle que la chaperonne Bip) qui piègent les protéines coté luminal (voir **chapitre I paragraphe II.3a**). De manière analogue aux protéines d'engrenage, il semblerait que l'attachement des molécules d'ubiquitine au substrat partiellement transloqué puisse diriger la rétrotranslocation, en empêchant le polypeptide de retourner dans le RE (Biederer, Volkwein et al. 1997). Alternativement, la rétrotranslocation doit aussi nécessiter une force active. Pour nombre de substrats, cette énergie semble fournie par l'intermédiaire d'une protéine AAA⁺ (ATPases Associated with diverse cellular Activities) hexamérique, nommée p97 ou VCP (Valosin-Containing Protein), accompagnée de deux de ses co-facteurs UFD1 (Ubiquitin Fusion Degradation 1) et NPL4 (Nuclear Protein Localisation 4). Cette protéine, qui lie à la fois les protéines ubiquitinilées et le protéasome (Dai and Li 2001; Ye, Meyer et al. 2001), semble fournir, grâce à l'hydrolyse de l'ATP, l'énergie nécessaire à l'extraction de la plupart des substrats de l'ERAD (Bays, Wilhovsky et al. 2001; Jarosch, Geiss-Friedlander et al. 2002). Comme les autres protéines AAA⁺, p97 possède deux domaines de liaison à l'ATP (appelés cassettes de Walker), D1 et D2, et un domaine N-terminal d'environ deux cents acides aminés qui permet la liaison avec le substrat ubiquitinilé. p97 est recruté à la membrane du RE principalement via une interaction avec une protéine transmembranaire, la protéine VIMP (VCP-Interacting Membrane Protein) (Ye, Meyer et al. 2001), mais aussi en formant un complexe avec les membres de la famille Derlin (Lilley and Ploegh 2005; Ye, Shibata et al. 2005; Oda, Okada et al. 2006).

D'autre part, pour certains substrats, l'énergie est directement fournie par le protéasome lui-même. En effet, certaines protéines en voie de translocation peuvent s'associer directement au protéasome et c'est l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP lors du dépliement des polypeptides qui assure l'extraction de la protéine hors du RE. Ce mécanisme reste peu décrit mais semble faire intervenir des AAA⁺ ATPase au niveau de la sous unité régulatrice 19S du protéasome (Mayer, Braun et al. 1998).

c) Déglycosylation et ubiquitination des substrats

D'une manière générale, les protéines destinées à la dégradation via le protéasome 26S sont ubiquitinilées, c'est-à-dire qu'elles vont être liées de manière covalente à une chaîne formée de nombreuses ubiquitines, une protéine de soixante seize acides aminés. La conjugaison de l'ubiquitine à la protéine substrat nécessite trois étapes distinctes. Dans un premier temps, l'enzyme E1 (ubiquitin activating enzyme) active l'ubiquitine de manière ATP-dépendante, en créant une liaison thioester de haute énergie entre une cystéine de son site actif et l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine. Ensuite, l'ubiquitine activée est transférée à une enzyme E2 (ubiquitin conjugating enzyme) via une réaction de transthioylation. Enfin, la molécule d'ubiquitine est transférée de E2 sur un résidu lysine de la protéine substrat qui est liée à l'enzyme E3 (ubiquitin ligase enzyme), qui catalyse cette réaction. Une chaîne de polyubiquitine se formera ensuite par ajouts successifs d'ubiquitine au niveau d'une lysine de l'ubiquitine précédente (**Figure 20**). C'est cette chaîne de polyubiquitine qui est reconnue comme signal de dégradation par le protéasome. Dans la plupart des organismes, tandis qu'une seule E1 transfère l'ubiquitine à différentes E2, de nombreuses E3 existent (Wong, Parlati et al. 2003).

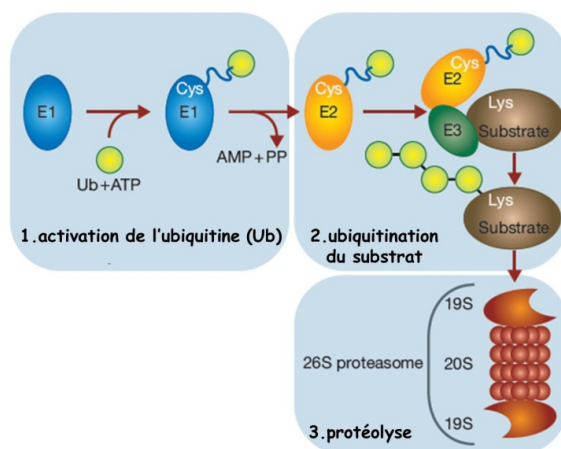


Figure 20 : Schéma général du système de dégradation ubiquitine/protéasome

Schéma adapté de (Meusser, Hirsch et al. 2005). Premièrement, l'enzyme E1 (ubiquitin-activating) hydrolyse l'ATP pour former une liaison de haute énergie entre la cystéine de son site actif et l'extrémité carboxy-terminale de l'ubiquitin (Ub). Deuxièmement, l'ubiquitine activée est transférée sur un membre de la famille des E2 (ubiquitin-conjugating enzyme). E2 et E3 attachent l'ubiquitine sur un résidu lysine du substrat lié à E3 (ubiquitin-ligase). Une chaîne de polyubiquitine est formée sur le substrat par addition successive de molécules d'ubiquitine sur la lysine de l'ubiquitine précédente. Les protéines polyubiquitinilées sont dégradées spécifiquement par le protéasome 26S.

De nombreuses données semblent montrer que la rétrotranslocation des substrats de l'ERAD à travers la membrane du RE suit des voies de signalisation dépendantes de l'E3 ubiquitine ligase qui prend en charge le substrat. Chaque ubiquitine ligase possède ainsi un complexe

comprenant des éléments luminaux, cytosoliques et transmembranaires bien particuliers au niveau de la membrane du RE. Chez la levure *S. cerevisiae*, la sélection de l'ubiquitine ligase régulant la polyubiquitination est en partie déterminée par la localisation du ou des défauts de repliement de la protéine substrat. Les protéines transmembranaires avec des défauts cytosoliques utilisent la E3 ligase nommée Doa10p et ses facteurs associés (ERAD-C). Les protéines transmembranaires avec des lésions membranaires (ERAD-M) ou lumineales ainsi que les substrats luminaux solubles (ERAD-L) sont éliminés du RE via l'intervention de la E3 ligase Hrd1 et ses protéines associées.

Chez les mammifères, le système est plus complexe et de nombreuses E3 ubiquitine ligases associées à la membrane du RE ont été identifiées. La plupart sont encore peu caractérisées, telles que RNF5/RMA1, TEB4, TRC8, ou RFP2. D'autres, au contraire, comme Synovioline/HRD1 et GP78 sont mieux décrites et semblent fonctionner de concert avec différents partenaires protéiques.

i. La E3 ubiquitin ligase GP78 (78 kDa GlycoProtein)

GP78 est la première ubiquitine ligase de la membrane du RE, impliquée dans le système ERAD, identifiée chez les mammifères (Fang, Ferrone et al. 2001). La déplétion de GP78 par ARN interférence inhibe la dégradation via le système ERAD de plusieurs substrats bien caractérisés, tels que les sous unités des récepteurs des lymphocytes t (CD3- δ et TCR- α), l'apolipoprotéine B100 ainsi que le mutant Z de l' α 1 antitrypsine (Fang, Ferrone et al. 2001; Shen, Ballar et al. 2006). GP78 est une protéine intégrale du RE possédant de multiples domaines transmembranaires (Shimizu, Tani et al. 1999). Dans son domaine C-terminal cytosolique, GP78 présente un domaine de liaison aux E2 conjugating enzyme et à p97 (Zhong, Shen et al. 2004). Peu d'informations sont encore disponibles quant à la reconnaissance des substrats par cette enzyme.

ii. La E3 ubiquitin ligase HRD1 (HMG-CoA Reductase Degradation protein 1) et son complexe associé

HRD1 aussi appelé synovioline a été initialement décrit comme étant une E3 ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation de CD3- δ et TCR- α et de la protéine Pael-R malconformée (Parkinson-associated endothelin-like Receptor), qui est un récepteur couplé aux protéines G, impliqué dans la maladie de Parkinson (Kikkert, Doolman et al. 2004; Omura, Kaneko et al.

2006). HRD1 est une protéine intégrale du RE non glycosylée qui appartient à la famille des RING (Really Interesting New Gene) E3 ubiquitine ligase (Kikkert, Doolman et al. 2004).

Le recrutement des substrats de HRD1 semble se faire indirectement via une association transitoire entre SEL1L, le cofacteur membranaire de HRD1, et les protéines luminales de reconnaissance de protéines définitivement mal conformées tels que OS-9, XTP3-B, EDEM1, BiP ou GRP94 (Mueller, Lilley et al. 2006; Christianson, Shaler et al. 2008; Hosokawa, Wada et al. 2008; Mueller, Klemm et al. 2008; Cormier, Tamura et al. 2009). Par ailleurs, ces composants ne semblent pas participer au complexe de GP78. Les protéines de la famille des Derlin s'associent aussi à la protéine SEL1L (Lilley and Ploegh 2005; Ye, Shibata et al. 2005) ce qui aboutit à la formation d'un complexe SEL1L, HRD1, Derlin et p97. La présence de ce complexe suggère que la reconnaissance des substrats de l'ERAD par le complexe de l'E3 ubiquitin ligase HRD1/SEL1L pourrait participer à l'adressage des protéines au complexe de rétrotranslocation permettant ainsi de coupler l'extraction des substrats et leur ubiquitination (**Figure 21**).

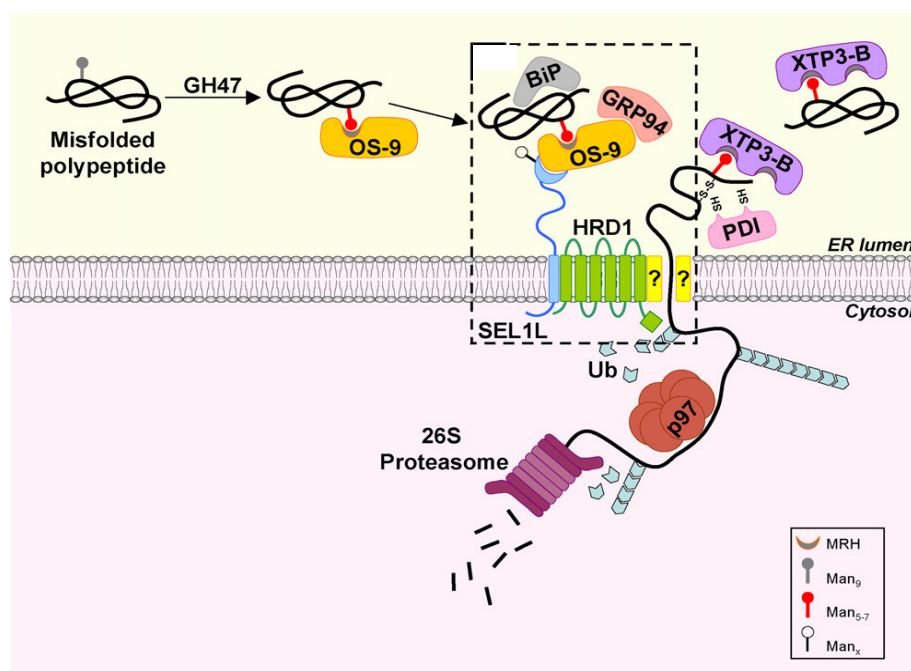


Figure 21 : Représentation schématique de la voie de dégradation dépendante de la E3 ubiquitin ligase HRD1 pour les substrats de l'ERAD glycosylés

Schéma adapté de (Hebert, Bernasconi et al.). Les polypeptides définitivement mal conformés subissent une démannosylation extensive par les membres de la famille GH47. Le N-glycan à 5-7 mannoses est reconnu par les lectines OS-9 et XTP3-B qui dirigent le polypeptide au complexe de rétrotranslocation et ubiquitination via une interaction avec un adaptateur membranaire SEL1L. Le polypeptide est polyubiquitiné par HRD1 en même temps qu'il est rétrotransloqué dans le cytoplasme grâce à l'énergie fournie par la protéine p97 et/ou le protéasome. Le polypeptide polyubiquitiné est alors dégradé via le protéasome 26S dans le cytoplasme.

En conclusion, les différentes compositions des complexes formés autour de ces E3 ubiquitin ligase semblent être le facteur déterminant quant à la sélection du substrat. Cependant, le ou les critères du substrat pris en compte, pour déterminer quelle E3 ubiquitine ligase va être préférentiellement utilisée, sont encore inconnus à ce jour.

En parallèle de leur ubiquitination, les glycoprotéines vont aussi être déglycosylées par action de Peptide : N-Glycanases (PNGases) (Suzuki, Park et al. 2000) qui sont recrutées à la membrane du RE via une interaction avec la protéine Derlin-1 (Katiyar, Joshi et al. 2005). Il n'est pas encore très clair si la déglycosylation intervient avant, après ou de manière simultanée à l'ubiquitination des substrats.

d) Dégradation des substrats

L'ajout séquentiel d'ubiquitines sur le substrat crée une chaîne polyubiquitinilée. Lorsque la chaîne atteint quatre ubiquitines, la protéine ubiquitinilée est reconnue par le protéasome 26S qui dégrade le substrat après que celui-ci ait été déubiquitinilé via l'intervention des enzymes DUBs (DeUBiquitinilating enzyme) associées au protéasome (Thrower, Hoffman et al. 2000; Glickman and Ciechanover 2002). Le protéasome 26S est une protéase multicatalytique d'environ 1,5 MDa, constituée de une à deux particules 19S régulatrices et d'un corps catalytique 20S (Voir **Figure 20**). La particule 19S se lie aux protéines ubiquitinilées, catalyse la rétrotranslocation des substrats, remodèle leur conformation et conduit les substrats déubiquitinilés dans le cœur 20S qui procède à la protéolyse.

2- Système ERAD des protéines non glycosylées

Tous les substrats de l'ERAD ne sont pas des protéines glycosylées. Il existe donc un autre mécanisme capable de reconnaître les protéines non glycosylées mal conformées.

En effet, en plus d'aider au repliement des protéines nouvellement synthétisées, BiP semble jouer un rôle important dans la reconnaissance et l'adressage des protéines non glycosylées vers la dégradation. Une étude utilisant la protéine Ig κ LC (mutant de la chaîne légère des immunoglobulines), un substrat non glycosylé de l'ERAD, a permis de mettre en évidence que sa dégradation était dépendante de la protéine BiP. BiP semble être capable de reconnaître des substrats non glycosylés de l'ERAD et de les adresser à une protéine membranaire du RE la protéine Herp (Homocysteine-induced ER protein), qui forme un complexe avec Derlin-1.

Cette étude suggère aussi que la dégradation des substrats de BiP est dépendante de la E3 ubiquitin ligase HRD1 et de p97 (Okuda-Shimizu and Hendershot 2007) (**Figure 22**).

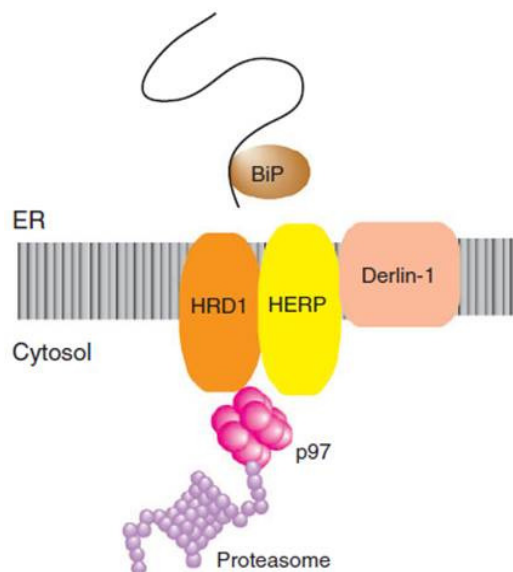


Figure 22 : Représentation schématique de la voie de dégradation ERAD pour les protéines non glycosylées
Schéma adapté de (Hoseki, Ushioda et al.).

La dégradation des substrats non glycosylés semble aussi nécessiter une réduction des ponts disulfures du substrat avant la rétrotranslocation. De manière similaire aux substrats de l'ERAD glycosylés, la co-chaperonne réductase ERdj5 semble importante dans ce processus (Ushioda, Hoseki et al. 2008).

Cette reconnaissance des substrats de l'ERAD par BiP et les protéines chaperonnes reste à ce jour peu étudiée et à l'heure actuelle, le signal ou le déterminant utilisé par les chaperonnes pour différencier les protéines destinées à l'ERAD des autres protéines, en particulier celles qui sont en voie de repliement, est encore mal compris.

II. Dégradation des protéines mal conformées par autophagie

En complément de l'ERAD, de récentes données ont indiqué qu'un mécanisme alternatif, la macro-autophagie, était mis en jeu pour assurer la clairance des protéines mal conformées qui s'accumulent dans la lumière du RE.

La macro-autophagie est une voie de dégradation lysosomiale hautement conservée chez les eucaryotes, impliquant la séquestration de constituants cytoplasmiques (incluant des organelles) dans des vésicules à double membrane reliée, ou autophagosomes, qui fusionnent avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu. Elle a classiquement été étudiée en réponse à des manques en énergie telles qu'une carence en nutriments ou en acides gras (Mizushima 2007). Les acteurs moléculaires de la macro-autophagie ont été initialement identifiés grâce à des études de criblages chez la levure *S. cerevisiae*. Les gènes codants pour les composants de l'autophagie sont nommés ATG pour AuTophagy-related Genes. Ce mécanisme comporte quatre étapes distinctes (Wang and Klionsky 2003): 1) sélection et empaquetage des substrats. 2) formation des vésicules autophagiques : les autophagosomes. 3) adressage et fusion des autophagosomes avec les lysosomes. 4) hydrolyse des protéines dans les lysosomes. L'autophagie qui vise à dégrader les protéines mal conformées dans la lumière du RE a été appelée RE-phagie et représente une branche à part de l'autophagie (Bernales, McDonald et al. 2006). Ce mécanisme reste encore peu décrit et nous allons dans la suite de ce paragraphe décrire brièvement les différentes étapes qui le caractérisent.

1- Sélection et empaquetage des substrats

Des études par microscopie électronique ont montré que les autophagosomes contiennent des structures membranaires lamellaires qui sont marquées par des anticorps dirigés contre des protéines résidentes du RE. De plus, dans le cadre d'études utilisant le mutant Z de l' α 1-antitrypsine qui peut être dégradé par autophagie, il a été constaté que les autophagosomes contiennent à la fois le mutant et des protéines résidentes du RE. Ces observations suggèrent ainsi un adressage sélectif de portions de la membrane du RE à l'autophagosome (Kamimoto, Shoji et al. 2006). Cependant, il est encore mal compris comment intervient cette sélectivité. Il est possible que les protéines mal conformées soient ségréguées dans des sous domaines du RE qui vont être spécifiquement reconnus par la machinerie d'autophagie (Yorimitsu and Klionsky 2007).

2- Formation des autophagosomes

La formation des autophagosomes lors de la RE-phagie semble similaire à l'autophagie de molécules du cytosol ou des autres organelles. L'étape initiale de nucléation et l'assemblage de la membrane primaire (ou phagophore) de l'autophagosome semble nécessiter de nombreux acteurs et notamment un complexe de kinases (formé de la phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K), de la protéine kinase myristylée p150 et de la protéine beclin1

aussi connue sous le nom de Atg6) et au moins deux protéines transmembranaires, mAtg9 (mammalian Atg9) et VMP1 (Vacuole Membrane Protein 1), dont le rôle est à ce jour peu caractérisé (pour revue (Yang and Klionsky 2009)). Le phagophore sélectionne ensuite sa cible, ici des sous domaines de RE, et s'allonge jusqu'à fusionner et former une vacuole à double membrane, l'autophagosome. L'élongation du phagophore par addition de membrane est médiée par deux systèmes de conjugaison d'ubiquitine, le complexe Atg16 et le complexe Atg8/LC3 (microtubule associated protein 1 Light Chain 3). L'activation du complexe LC3 résulte en la conversion de la LC3 de sa forme libre (LC3-I) à sa forme liée à la membrane (LC3-II). Généralement, chez les mammifères, le développement du phagophore est observé entre les citernes du RE (Mizushima, Yamamoto et al. 2001). A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus clair quant à l'identité de la source lipidique pour les membranes de l'autophagosome. Différentes études ont cependant montré que les fonctions propres du RE étaient nécessaires à la formation de l'autophagosome, suggérant que le RE est au moins un des donneurs de membranes durant le processus de RE-phagie (Hayashi-Nishino, Fujita et al. 2009).

3- Adressage et fusion des autophagosomes aux lysosomes et dégradation de ses composants

L'autophagosome fusionne ensuite via sa membrane externe avec le lysosome. Cela conduit au relargage d'une vésicule interne, le corps autophagique, dans la lumière du lysosome, où la vésicule et son contenu seront dégradés et relargués dans le cytosol via des perméases (Yang and Klionsky 2009) (**Figure 23**).

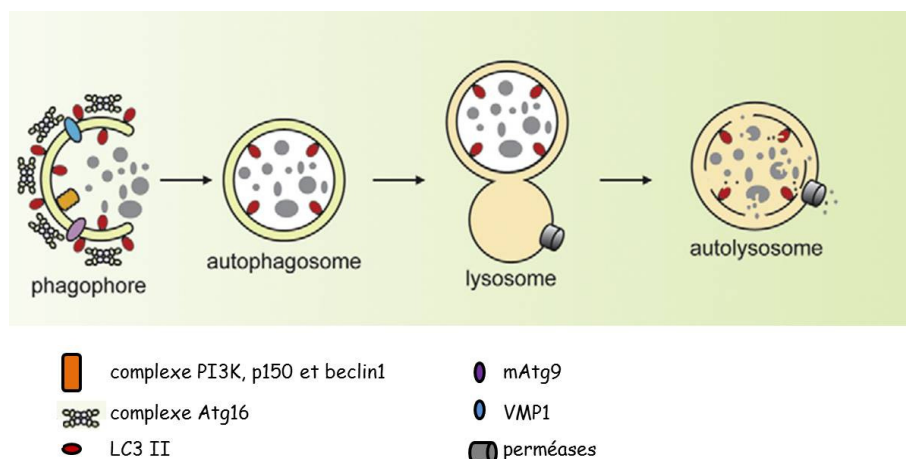


Figure 23: Représentation schématique de la voie de macro-autophagie chez les mammifères
Schéma adapté de (Yang and Klionsky 2009).

Malgré les différences mécanistiques entre la voie protéasomale et la dégradation autophagique, différentes études suggèrent qu'il existe des recoupements entre ces deux voies (Kruse, Brodsky et al. 2006; Pandey, Batlevi et al. 2007). Pour exemple, les deux voies de signalisation ont été montrées comme étant impliquées dans la dégradation du variant Z de l' α -1 antitrypsine, de protéines contenant des polyglutamines, et du mutant Δ F508 de la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), un substrat caractéristique de l'ERAD. Ces résultats suggèrent que l'ERAD et l'autophagie sont capables d'agir de concert et simultanément dans la dégradation des protéines mal conformées (Kruse, Brodsky et al. 2006). Néanmoins, une étude utilisant du collagène de type I mal conformé suggère que la dégradation des protéines via l'ERAD ou via l'autophagie est dictée par la conformation de la protéine. En effet, il semblerait que les substrats monomériques soient dégradés préférentiellement via le système ERAD tandis que les agrégats protéiques, souvent incompatibles avec une dégradation via l'ERAD, sont dégradés via le mécanisme d'autophagie (Ishida and Nagata 2009). Enfin, différentes études proposent que l'autophagie joue un rôle compensatoire quand les fonctions protéosomales sont compromises ou dépassées (Janen, Chaachouay et al.; Pandey, Nie et al. 2007).

Chapitre IV : Signalisation émanant du RE

I. Homéostasie et stress du RE

Afin d'assurer une activité sécrétoire performante, la cellule est dépendante d'un fonctionnement optimal du RE. L'homéostasie du RE est maintenue tant que les différentes machineries du RE, c'est-à-dire l'import, le repliement, l'export et la dégradation sont en équilibre. Cependant, différents facteurs, endogènes ou exogènes, peuvent venir perturber les capacités fonctionnelles du RE. Par exemple, une carence en nutriments ou en oxygène, une infection par un pathogène, une mutation dans un gène conduisant à la production d'une protéine mal conformée, une perturbation de l'homéostasie calcique ou encore l'exposition à une substance chimique, entraînent l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE. Dans cette situation dite de stress du RE, la cellule a développé un ensemble de mécanismes lui permettant d'ajuster les capacités fonctionnelles du RE. Cette réponse adaptative appelée réponse UPR (Unfolded Protein Response) est rapidement activée afin de restaurer au plus vite l'homéostasie et la fonctionnalité de cet organelle.

II. La réponse UPR ou Unfolded Protein Response

La réponse UPR se traduit par l'activation de différentes voies de signalisation dont l'objectif est de résorber l'accumulation de protéines dans la lumière du RE, d'une part via l'atténuation de la synthèse protéique et d'autre part via la mise en place d'un programme transcriptionnel spécifique permettant une augmentation de l'expression de chaperonnes, de protéines impliquées dans le système ERAD ou de composants qui médient l'autophagie. De plus, dans certains types cellulaires, notamment ceux avec de fortes capacités de sécrétion tels que les cellules pancréatiques, les hépatocytes ou les plasmocytes, l'induction de la réponse UPR entraîne une prolifération importante des membranes du RE afin de diluer au maximum la concentration locale de protéines mal conformées et de limiter la formation d'agrégats.

Cependant, si l'homéostasie du RE n'est pas restaurée, la réponse UPR induit la mort des cellules, dans le but de favoriser la survie de l'organisme en éliminant les cellules incapables de s'adapter au stress subi.

Trois grandes voies ont été mises en évidence dans l'activation de la voie UPR en réponse à un stress. Elles sont contrôlées par trois protéines transmembranaires résidant dans le RE : PERK (Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase), ATF6 (Activating Transcription Factor-6) et IRE1 (Inositol-REquiring protein-1).

Brièvement, le consensus actuel propose que, à l'état basal (c'est-à-dire en absence de stress), ces trois protéines transmembranaires sont maintenues dans un état inactif via l'association de leur domaine luminal à la chaperonne BiP. Lors d'un stress du RE, la protéine BiP, en qualité de chaperonne, s'associe préférentiellement aux protéines mal conformées et se dissocie de PERK, IRE1 et ATF6 conduisant ainsi à leur activation et à la transduction de signaux spécifiques (**Figure 24**).

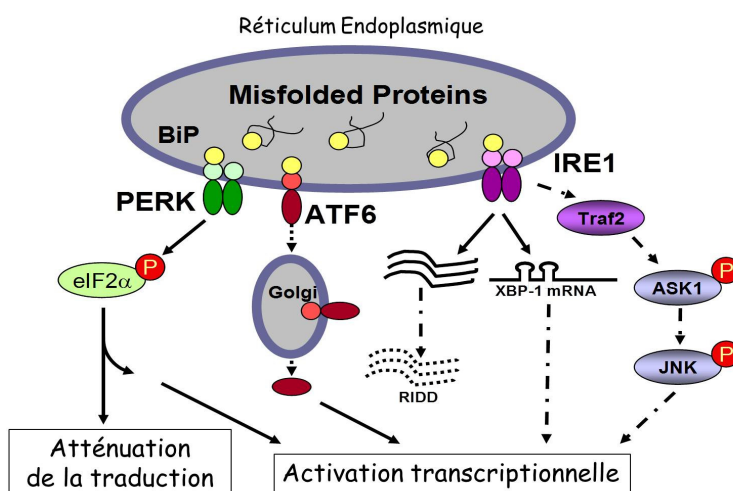


Figure 24 : Représentation schématique de la voie UPR suite à l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE.

Dans la suite de ce chapitre, nous détaillerons les différentes voies de signalisation initiées à partir de ces trois protéines en situation de stress du RE et les conséquences de leur activation.

1- Voies de signalisation dépendantes de PERK

PERK est une sérine/thréonine kinase transmembranaire de type I de 125kDa. Lors d'un stress du RE, PERK s'active par oligomérisation ce qui induit à son auto-

transphosphorylation. Son substrat préférentiel est eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha), une sous unité régulatrice d'eIF2, facteur d'initiation de la traduction. La phosphorylation de la sérine 51 d'eIF2 α prévient la formation du complexe eIF2/GTP/met-tRNAi (ARN de transfert porteur du codon initiateur méthionine), permettant d'atténuer de manière globale et immédiate la synthèse des protéines dépendante de la coiffe (Harding, Zhang et al. 1999). Les protéines de courte durée de vie sont ainsi éliminées de la cellule durant cette inhibition de la synthèse protéique. Un exemple important est celui de la cycline D1. La perte de la synthèse de la cycline D1 au cours d'un stress du RE stoppe alors les cellules mammifères en phase G1 du cycle cellulaire (Brewer, Hendershot et al. 1999; Harding, Zhang et al. 1999; Brewer and Diehl 2000). La voie PERK/eIF2 α est, au cours du temps, la première qui se met en place, et ce, dès les premières minutes qui suivent un stress du RE. Elle permet, via le ralentissement momentané de la synthèse protéique, d'éviter un afflux supplémentaire de protéines dans le RE (Harding, Zhang et al. 1999; Harding, Zhang et al. 2000).

De manière paradoxale, l'inhibition générale de la traduction via la phosphorylation d'eIF2 α stimule la traduction de certains ARNm. C'est notamment le cas pour le facteur de transcription ATF4 (Activating Transcription Factor 4). L'ARNm de ATF4 est exprimé de manière constitutive. Cependant, sa traduction en protéine est dépendante de la présence de deux uORFs (upstream Open Reading Frames) situés en amont de la séquence codante d'ATF4. L'uORF1 est constitué de trois codons tandis que l'uORF2 est plus long et chevauche le début de la séquence codante d'ATF4. Ainsi, en absence de stress, les uORFs dont la traduction est dépendante de la coiffe, répriment la traduction de l'ARNm de ATF4. Lorsqu'eIF2 α est phosphorylé, les uORFs ne sont alors plus fonctionnels, ce qui permet la traduction de l'ARNm de ATF4 (Vattem and Wek 2004). ATF4, ainsi traduit, peut induire la transcription d'un grand nombre de gènes présentant un élément de réponse CRE (Cyclic AMP Response Element) tels que CHOP (C/EBP Homologous Protein) (Fawcett, Martindale et al. 1999; Ma, Brewer et al. 2002), ATF3 (Activating Transcription Factor 3) (Jiang, Wek et al. 2004), GADD34 (Growth Arrest DNA Damage inducible protein 34) ainsi que de nombreux gènes du métabolisme des acides aminés (Harding, Zhang et al. 2003). Comme les deux autres senseurs de stress, l'activation de PERK est régulée par la liaison de BiP au niveau de son domaine luminal. Cependant, l'activation de la voie PERK est aussi régulée de manière indirecte selon une boucle de retro contrôle négatif. En effet, la protéine GADD34 (cible transcriptionnelle de ATF4) s'associe à la sous unité catalytique de la protéine

phosphatase 1 (PP1) et induit la déphosphorylation d'eIF2 α et la reprise de la synthèse protéique (Novoa, Zeng et al. 2001).

PERK a également la capacité de phosphoryler le facteur de transcription Nrf2 (NF-E2 related factor 2) qui, en condition basale, est séquestré dans le cytoplasme par la protéine Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). Suite à un stress du RE, la phosphorylation de Nrf2 par PERK permet sa dissociation de Keap1 et sa translocation dans le noyau où il induit l'expression de gènes présentant un élément de réponse ARE (Antioxidant Response Element) qui codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme de détoxification cellulaire et dans la réponse anti-oxydante (Cullinan, Zhang et al. 2003; Cullinan and Diehl 2004). Des études utilisant des cellules MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) invalidées pour le gène *Perk* ont démontré l'importance de PERK dans la réponse anti-oxydante. En effet, en absence de PERK, les cellules présentent une accumulation de ROS (Reactive Oxygen Species) lorsqu'elles sont soumises à un stress du RE (Harding, Zeng et al. 2001).

La voie PERK/eIF2 α /ATF4 permet donc d'agir rapidement et de manière globale sur la synthèse protéique et dans le même temps d'induire un programme transcriptionnel adapté. Cette voie est aussi appelée "Integrated Stress Response" (ISR) car elle permet à la fois d'alléger la charge protéique du RE et d'activer un ensemble de gènes allant des chaperonnes à des protéines impliquées dans la réponse anti oxydante ou dans le contrôle de la mort cellulaire.

2- Voies de signalisation dépendantes de ATF6

ATF6 est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 90kDa. ATF6 est formé d'un domaine luminal contenant deux domaines de localisation à l'appareil de Golgi (GLS1 et GLS2 : Golgi Localisation Signal 1, 2) et un domaine cytosolique contenant un motif leucine zipper (Haze, Yoshida et al. 1999). En réponse à un stress du RE, ATF6 migre vers l'appareil de Golgi où il va subir un clivage protéolytique par deux protéases S1P et S2P (Site-1-Protease et Site-2-Protease) au niveau de son domaine transmembranaire.

Le fragment mature libéré de 50kDa correspondant au domaine N-terminal d'ATF6 est un facteur de transcription qui migre dans le noyau et stimule la transcription de ces gènes cibles (Ye, Rawson et al. 2000; Chen, Shen et al. 2002) en se fixant sur des éléments de réponse ATF/CRE ainsi que des séquences ERSE I et ERSE II (ER Stress Response Element I et II) (Yoshida, Okada et al. 2000). ATF6 agit sur ces gènes cibles porteurs de la séquence ERSE en association avec le co-facteur transcriptionnel NF-Y (Nuclear Factor-Y) (Yoshida, Okada et

al. 2000). L'activation d'ATF6 active la transcription de différentes chaperonnes (BiP, GRP94, calréticuline) ainsi que le facteur CHOP, la protéine co-chaperonne P58^{IPK} et le gène codant pour XBP1 (X-Box Binding Protein 1) (Yoshida, Matsui et al. 2001).

L'activation d'ATF6 en réponse à un stress du RE est un processus régulé par au moins deux mécanismes. De la même façon que les deux autres senseurs de stress, ATF6 est retenu à l'état inactif dans le RE via une interaction avec la chaperonne BiP qui masquerait une séquence de localisation golgienne. Lors d'un stress du RE, BiP se dissocie de ATF6 ce qui permet sa migration vers l'appareil de Golgi (Chen, Shen et al. 2002; Shen, Chen et al. 2002). Plus récemment, un second mécanisme de régulation de l'activation a été décrit et semble impliquer les ponts disulfures (**Figure 25**). Ainsi, à l'état basal, ATF6 forme des complexes homodimériques ou homo-oligomériques via la formation de ponts disulfures au niveau de son domaine luminal. En réponse à un stress, les ponts disulfures sont réduits ce qui conduit à l'augmentation de formes monomères réduites qui vont être transportées jusqu'à l'appareil de Golgi. De plus, il a été montré que la forme monomérique réduite d'ATF6 est un meilleur substrat pour l'enzyme S1P. Ainsi, en absence de stress, si des monomères oxydés d'ATF6 sont transportés jusqu'à l'appareil de Golgi, ils ne seront pas clivés par la S1P et seront renvoyés au RE par transport rétrograde (Nadanaka, Yoshida et al. 2006; Nadanaka, Okada et al. 2007).

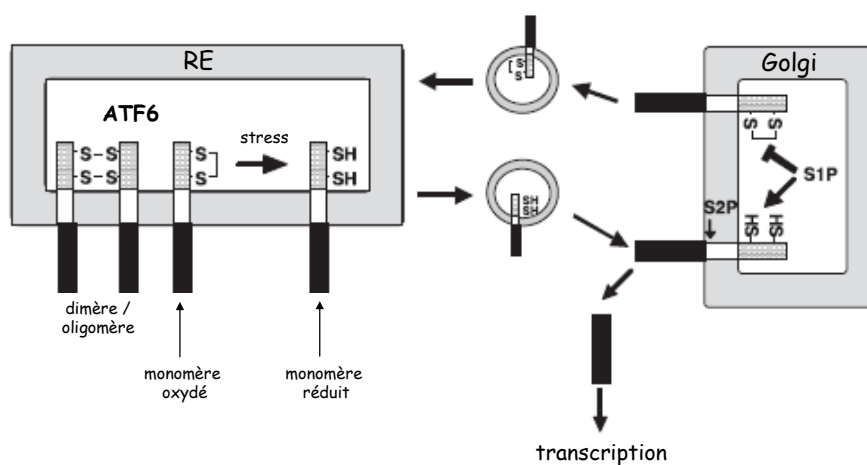


Figure 25 : Modèle de régulation de l'activation de ATF6 basé sur la réduction des ponts disulfures
Schéma adapté de (Nadanaka, Okada et al. 2007).

Chez les mammifères, il existe deux isoformes d'ATF6, ATF6 α (90kDa) et ATF6 β (150kDa) issues de deux gènes différents (Haze, Okada et al. 2001). ATF6 α et ATF6 β partagent le même domaine leucine zipper, cependant il semblerait que l'isoforme β ait peu d'activité

transcriptionnelle, faisant de ATF6 α l'isoforme principal dans la transduction du signal en réponse au stress (Adachi, Yamamoto et al. 2008).

L'invalidation d'ATF6 chez la souris conduit à une létalité embryonnaire lorsque les deux isoformes sont délétées simultanément. Néanmoins, l'invalidation de l'une ou l'autre des isoformes n'a pas d'effet majeur sur le développement et le phénotype des animaux suggérant qu'ATF6 α et ATF6 β partagent des fonctions redondantes indispensables au développement (Wu, Rutkowski et al. 2007; Yamamoto, Sato et al. 2007).

Ces dernières années, il a été mis en évidence que d'autres protéines transmembranaires du RE, structurellement proches d'ATF6, sont activées en réponse au stress de manière similaire à ATF6. Ces facteurs de la famille des ATF/CREB (cAMP Response Element Binding), tels que CREBH (CRE-Binding protein H), OASIS (Old Astrocyte Specifically Induced Substance) ou BBF2H7 (BBF2 Human homolog on chromosome 7), ne s'expriment pas de manière ubiquitaire suggérant que certaines cellules adaptent la réponse UPR dépendamment de leur fonction et possèdent des facteurs de transcription spécifiques (Bailey and O'Hare 2007).

3- Voies de signalisation dépendantes de IRE1

La protéine IRE1 est sans doute la protéine la plus étudiée des trois. D'une part car c'est la première à avoir été mise en évidence, et, d'autre part, car c'est la plus conservée au cours de l'évolution, présente de la levure à l'Homme. IRE1 est une protéine kinase transmembranaire de type I du RE de 110 kDa qui possède chez les mammifères deux isoformes IRE1 α et IRE1 β , codées par deux gènes différents. IRE1 α est exprimée de manière ubiquitaire tandis que l'expression d'IRE1 β est restreinte aux cellules épithéliales intestinales (Tirasophon, Welihinda et al. 1998; Wang, Harding et al. 1998).

Le domaine luminal d'IRE1 est composé d'un peptide signal permettant son adressage au RE, d'un domaine de dimérisation (voire d'oligomérisation) et d'un domaine de liaison à la protéine chaperonne BiP (Credle, Finer-Moore et al. 2005). Les domaines luminaux d'IRE1 et PERK présentent un faible degré d'homologie qui est conservé chez tous les eucaryotes. De plus, des études génétiques chez la levure ont révélé que les domaines luminaux de IRE1 et PERK étaient fonctionnellement interchangeables (Liu, Schroder et al. 2000).

Comme cela a été présenté précédemment, à l'état basal, BiP maintient la protéine IRE1 monomérique et inactive. Lors d'un stress du RE, BiP libère IRE1 qui peut ainsi se dimériser et s'activer (Bertolotti, Zhang et al. 2000). Cependant, de récentes études réalisées chez *S. cerevisiae* suggèrent que le domaine de liaison à BiP n'est pas crucial à l'activité d'IRE1. Il

est ainsi actuellement proposé que la dissociation d'IRE1 et BiP ne serait pas suffisante pour permettre l'activation de IRE1, et qu'une étape supplémentaire telle que l'interaction directe de IRE1 avec les protéines mal conformées via son domaine luminal serait nécessaire (Kimata, Oikawa et al. 2004; Credle, Finer-Moore et al. 2005; Zhou, Liu et al. 2006). De plus, l'étude de la structure du domaine cytosolique de IRE1 de *S. cerevisiae* suggère que cette protéine pourrait exister à l'état de dimère voire d'oligomère en absence de stress, l'activation de IRE1 pourrait alors résulter aussi de changements conformationnels (Lee, Dey et al. 2008). Le domaine C-terminal cytoplasmique d'IRE1 a la particularité de posséder une double activité enzymatique : une activité kinase et une activité endoribonucléase. En réponse à un stress, l'oligomérisation du domaine luminal permet la juxtaposition des domaines cytosoliques et facilite la trans-autophosphorylation au niveau du domaine kinase et l'activation du domaine endoribonucléase (Lee, Dey et al. 2008).

L'activité endoribonucléase d'IRE1 entraîne l'épissage de l'ARNm de XBP-1 (Calton, Zeng et al. 2002). XBP1 a été découvert comme l'analogue fonctionnel chez les mammifères du facteur de transcription Hac1, épissé par Ire1p, l'homologue de IRE1 chez la levure *S. cerevisiae* (Schroder and Kaufman 2005). IRE1 clive ainsi un intron de taille variable (26 nucléotides chez l'Homme) dans cet ARNm et les fragments obtenus sont ensuite reliés par une ligase encore non caractérisée (Uemura, Oku et al. 2009). Cet épissage génère un changement du cadre de lecture lors de la traduction de la protéine. La protéine produite à partir de l'ARNm épissé de XBP-1 est un facteur de transcription de type leucine zipper appartenant à la famille ATF/CREB. Après translocation dans le noyau, XBP1 se fixe sur des régions promotrices contenant une séquence CRE, ERSE I et II ou UPR (UPR Response Element). XBP1 induit l'expression de nombreuses chaperonnes, co-chaperonnes et oxydoreductases (BiP, PDI, ERp57, ERdj4, P58^{IPK} (Lee, Iwakoshi et al. 2003)) et de nombreuses protéines impliquées dans le système de dégradation ERAD (EDE1, HRD1, OS-9, XTP3-B, Derlin 2,3...) (Yoshida, Matsui et al. 2003). XBP1 participe également à la transcription du facteur CHOP. La forme non épissée de XBP1 est elle aussi traduite, et semble jouer un rôle de régulateur négatif de la réponse UPR car elle se fixe sur la protéine XBP1 épissée, formant un complexe dégradé par le protéasome (Yoshida, Oku et al. 2006).

La voie IRE1/XBP1 permet donc l'activation d'un certain nombre de gènes permettant d'augmenter les capacités fonctionnelles de repliement du RE ou de dégrader de manière plus efficace les protéines aberrantes.

De plus, depuis quelques années, de nombreuses données démontrent que l'activité endoribonucléase de IRE1 ne se limite pas à l'épissage de XBP1, et que IRE1 pourrait cliver

spécifiquement d'autres ARNm comme par exemple l'ARNm codant pour SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein), le CD59 (Cluster of Differentiation 59), l'insuline ou le récepteur au PDGF (Platelet Derived Growth Factor) (Hollien and Weissman 2006; Oikawa, Tokuda et al. 2007; Hollien, Lin et al. 2009). D'autre part, IRE1 peut réguler son expression en clivant son propre ARNm (Tirasophon, Lee et al. 2000; Hollien and Weissman 2006; Oikawa, Tokuda et al. 2007; Hollien, Lin et al. 2009). Cette dégradation sélective d'ARNm codant pour des protéines qui traversent la voie de sécrétion pourrait réduire la charge protéique du RE et aussi libérer les ribosomes et les facteurs de traduction permettant de synthétiser les facteurs induits par la réponse UPR. Cette branche de l'UPR a été nommée RIDD pour "Regulated IRE1 Dependent Decay".

Outre son activité endoribonucléasique, IRE1 activée a la capacité de s'associer à différents partenaires protéiques à l'origine de l'induction de différentes voies de signalisation. IRE1 s'associe ainsi, via son domaine kinase, avec la protéine adaptatrice TRAF2 (TNF Receptor Associated Factor 2) entraînant le recrutement de la protéine kinase ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) et l'activation de la protéine c-Jun N-terminal kinase (JNK), un facteur impliqué dans le processus d'apoptose (Urano, Wang et al. 2000).

De plus, en absence de stress, la protéine adaptatrice NCK1 (Non Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein 1) interagit via son domaine SH3 avec la région C-terminale d'IRE1. En présence d'un stress, NCK1 et IRE1 se dissocient, conduisant à l'activation de la voie dépendante de la protéine kinase ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Enfin, IRE1 interagit avec les protéines chaperonnes cytosoliques Hsp90 et Hsp72 qui se fixent sur son domaine cytosolique, permettent sa stabilisation et pourraient ainsi participer à la régulation de la réponse UPR (Gupta, Deepti et al.; Marcu, Doyle et al. 2002). L'ensemble de ces données et le nombre grandissant de protéines identifiées comme pouvant interagir avec IRE1, suggèrent que la voie de signalisation dépendante de IRE1, et par extension la réponse UPR, est un processus hautement régulé et contrôlé par la formation de complexes protéiques particuliers, potentiellement tissu-spécifiques (Hetz and Glimcher 2009).

L'invalidation d'IRE1 α chez la souris, tout comme l'invalidation de XBP1, induit une létalité embryonnaire précoce (Urano, Bertolotti et al. 2000) mettant en évidence le rôle crucial de cette branche de la réponse UPR dans le développement. Par ailleurs, les souris invalidées pour le gène IRE1 β ne présentent pas, dans des conditions normales, d'anomalies phénotypiques notables en comparaison des souris sauvages. Cependant, elles apparaissent plus sensibles à l'effet du DSS (Dextran Sodium Sulfate) qui induit des pathologies inflammatoires du tractus digestif (Bertolotti, Wang et al. 2001).

4- Connections entre les différentes voies de la réponse UPR

A ce jour, aucune interaction physique directe entre les trois grands senseurs du stress du RE n'a pu être établie. Cependant il existe une certaine redondance et une réelle coordination entre les différents axes de la réponse UPR. On peut noter ainsi que les trois branches de l'UPR ont en commun d'induire la transcription de chaperonnes (notamment BiP et GRP94) et la protéine pro-apoptotique CHOP. L'induction de ces gènes est donc particulièrement importante pour la cellule en situation de stress et l'augmentation de la transcription par trois voies différentes permet de renforcer l'expression de ces cibles et d'assurer une réponse minimale si une voie est défaillante. Cette redondance fonctionnelle a notamment été mise en évidence entre la voie dépendante d'IRE1 et celle dépendante d'ATF6, grâce à une étude réalisée chez le nématode *C. elegans*. En effet, l'inhibition de l'une ou l'autre des voies est bien tolérée alors que l'inhibition simultanée des deux voies abroge le développement du ver (Shen, Ellis et al. 2005).

Par ailleurs, la voie UPR représente une voie d'adaptation très intégrative car les trois branches coopèrent entre elles. L'exemple le plus représentatif de cette coopération est certainement celui du facteur de transcription XBP1. En effet, la transcription du gène codant pour XBP1 est stimulée via l'activation d'ATF6. L'ARNm de XBP1 est ensuite épissé par IRE1 afin d'obtenir un facteur de transcription fonctionnel. De plus, des travaux ont montré que les protéines ATF6 et XBP1 co-immunoprécipitent, ce qui suggère que ces deux facteurs de transcription peuvent former un hétérodimère in vivo (Yamamoto, Sato et al. 2007). D'autre part, les voies ATF6 et IRE1 régulent de façon négative l'activité de PERK. En effet, ATF6 et XBP1 augmentent la transcription de la protéine p58^{IPK}, or il a été démontré que p58^{IPK} inhibe la voie de signalisation dépendante de PERK, en empêchant la phosphorylation de eIF2 α (van Huizen, Martindale et al. 2003). Il en est de même pour la protéine adaptatrice NCK1 : non seulement celle-ci interagit avec IRE1, mais elle est aussi impliquée dans l'atténuation de la voie PERK en favorisant la déphosphorylation de eIF2 α (Kebache, Cardin et al. 2004).

5- Stress du RE, survie et mort cellulaire

En premier lieu, la réponse UPR est une réponse cytoprotectrice qui permet à la cellule de s'adapter à un stress protéotoxique. Cependant, si ce stress devient trop sévère, la cellule, ne pouvant y faire face, est éliminée. Il existe ainsi une balance entre cytoprotection et mort cellulaire, et c'est l'évolution de cette balance qui va déterminer l'avenir de la cellule. Bien que les voies de signalisation conduisant à ces deux phénotypes (survie ou mort) ne soient

activées simultanément, le résultat final intègre la durée et l'intensité d'activation de chacune de ces voies de signalisation pour conduire à la mort ou à la survie de la cellule.

Les mécanismes moléculaires impliqués dans la mort cellulaire consécutive à un stress du RE sont encore mal compris. D'une part, la libération de calcium stocké dans le RE pourrait être impliquée dans l'activation de protéases cytoplasmiques, contribuant ainsi à la mort cellulaire, mais il n'a pas été encore formellement démontré que le stress du RE pouvait favoriser cette libération de calcium.

D'autre part, l'activation des trois branches de l'UPR conduit à l'induction de la protéine pro-apoptotique CHOP. CHOP, également nommé GADD153 (Growth Arrest DNA Damage protein 153), appartient à la famille des protéines C/EBPs (CCAAT/Enhancer Binding Proteins) et est un facteur de transcription qui potentialise l'apoptose. Il a notamment été montré que l'inactivation de CHOP est associée à une survie cellulaire augmentée en réponse au stress du RE, tandis que sa surexpression se caractérise par des cellules plus sensibles à l'apoptose (Zinszner, Kuroda et al. 1998). Plusieurs mécanismes mis en jeu par CHOP aboutissent à la mort cellulaire. Il a été mis en évidence que CHOP exacerbe le stress du RE en induisant l'expression de GADD34 (qui favorise la synthèse protéique en provoquant la déphosphorylation d'eIF2 α). De plus des données récentes ont montré que CHOP induit la transcription du gène Bim, membre de la famille Bcl-2, facteur pro-apoptotique nécessaire à l'initiation de l'apoptose (Puthalakath, O'Reilly et al. 2007).

De plus, l'activation de IRE1 conduit au recrutement d'un complexe TRAF2-ASK1 permettant l'activation de JNK qui initie la mort cellulaire par apoptose (Urano, Wang et al. 2000). L'interaction IRE1/TRAF2 favorise également le clivage et l'activation de la procaspase 12 en caspase 12. Il s'en suit l'induction des caspases 9 et 3 permettant alors le déclenchement de l'apoptose (Nakagawa, Zhu et al. 2000; Yoneda, Imaizumi et al. 2001). Enfin, il a été montré que IRE1 via son domaine cytosolique, interagit avec les protéines pro-apoptotiques BAK et BAX, suggérant que la voie IRE1 pourrait être liée à l'activation des voies de signalisation pro-apoptotiques dépendantes de la mitochondrie (Hetz, Bernasconi et al. 2006).

Ces différentes études semblent imputer à IRE1 un rôle important dans le déterminisme de l'apoptose liée au stress du RE. Cependant, des études de surexpression de IRE1 dans différentes lignées sont associées à une amélioration de la survie cellulaire (Lin, Li et al. 2007; Lin, Li et al. 2009). De plus, si l'épissage de XBP1, qui disparaît normalement approximativement 16h après un stress, est maintenu 48h, l'apoptose des cellules est diminuée (Han, Upton et al. 2008). Enfin, paradoxalement, l'induction de la voie

IRE1/TRAF2/JNK semble jouer un rôle crucial dans l'induction de l'autophagie et la formation d'autophagosomes, et favoriserait donc la survie cellulaire. Ainsi, le rôle précis d'IRE1 dans l'induction de l'apoptose liée au stress du RE reste encore à élucider, au vu de la complexité des mécanismes activés suite à l'induction d'IRE1 et des résultats expérimentaux qui peuvent sembler contradictoires.

6- Importance de la réponse UPR dans la physiologie cellulaire

Le stress du RE et la réponse UPR qui en découle constituent une réponse physiologique de la cellule pour s'adapter à tout moment à un changement ou une perturbation de leur environnement. C'est notamment le cas pour les cellules sécrétrices, telles que les cellules β du pancréas, les hépatocytes ou encore les lymphocytes B producteurs d'anticorps qui, lorsque cela s'avère nécessaire, vont activer la voie UPR afin de répondre à un besoin accru de production et sécrétion de protéines. Dans la suite de ce paragraphe, nous présenterons quelques exemples caractéristiques reflétant l'importance de la voie UPR dans la physiologie cellulaire.

a) Importance de la réponse UPR dans le développement embryonnaire

L'importance de la réponse UPR dans le développement est soulignée par le phénotype des souris invalidées pour le gène codant pour IRE1 ou pour XBP1. En effet, l'inactivation d'IRE1 est caractérisée par une létalité embryonnaire entre les stades E9,5 et E11,5 et celle de XBP-1 entraîne la mort des embryons au stade E14,5 (Urano, Bertolotti et al. 2000). L'absence du facteur de transcription XBP1 est caractérisée entre autres, au niveau du phénotype de l'embryon, par des défauts dans le développement du foie, une anémie et une cardiomyopathie. La voie IRE1/XBP1 représente donc un axe de signalisation crucial au cours du développement embryonnaire. Par ailleurs, des mutations dans les gènes codant pour PERK et eIF2 α entraînent des dysfonctions dans les organes glandulaires, tels que le foie et le pancréas (exocrine et endocrine) (Harding, Zeng et al. 2001).

b) Importance de la réponse UPR dans la fonction des cellules β pancréatiques

La voie de signalisation dépendante de PERK semble primordiale dans l'homéostasie glucidique et la physiologie des cellules β du pancréas, sécrétrices d'insuline, comme cela a été montré grâce à l'étude des souris invalidées pour le gène *Perk*. Ces souris sont viables mais développent rapidement une hyperglycémie puis une insuffisance pancréatique sévère due à une destruction massive des cellules β (Harding, Zeng et al. 2001). En effet, chez ces

animaux, l'invalidation de la voie PERK ne permet pas à la cellule de freiner la synthèse protéique. La pro-insuline est alors produite en excès et s'accumule dans le RE, induisant l'activation des autres branches de l'UPR et conduisant à l'apoptose des cellules β du pancréas. Chez l'Homme, la mutation du gène codant pour PERK conduit au syndrome de Wolcott-Rallison, caractérisé par un diabète juvénile sévère lié à l'apoptose des cellules β pancréatiques (Delepine, Nicolino et al. 2000).

c) Importance de la réponse UPR dans la maturation des lymphocytes B

La maturation terminale des lymphocytes B en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps, se caractérise par une prolifération importante du RE au sein de la cellule, probablement due à une demande accrue de la synthèse protéique pour la production des anticorps. Cette maturation s'accompagne également d'une augmentation importante de l'expression de XBP1 suggérant un rôle important de la réponse UPR dans ce processus. En effet, l'absence de XBP1 dans des lymphocytes B activés s'oppose à leur différenciation en plasmocytes et la production d'anticorps (Iwakoshi, Lee et al. 2003). Ainsi, la réponse UPR, et notamment la voie IRE1/XBP1 pourrait faire partie intégrante d'un programme de différenciation permettant la maturation des lymphocytes B en plasmocytes.

III. Voie ER surveillance (ERSU) et héritage du RE

Au cours de la division cellulaire, en plus du matériel génétique, les composants cytoplasmiques de la cellule mère doivent être séparés entre les deux cellules filles, de façon à ce que chacune d'elles soit immédiatement capable de fonctionner de manière autonome (Peng and Weisman 2008). Le RE, qui est un organite crucial pour le bon fonctionnement cellulaire, ne peut pas être généré *de novo*, mais provient uniquement d'un RE pré-existant. Ainsi il est nécessaire que chacune des cellules filles reçoive une partie minimale de RE fonctionnel, c'est-à-dire non stressé, durant le cycle cellulaire. Jusqu'à présent, peu d'informations étaient disponibles sur la manière dont les cellules contrôlaient la fonctionnalité du RE pendant le cycle cellulaire. Récemment, des études réalisées chez la levure *S. cerevisiae* ont permis d'identifier un mécanisme de surveillance nommé ERSU (ER stress Surveillance), qui permet d'assurer l'héritage dans chacune des cellules filles d'un RE fonctionnel non stressé. En effet, il a été mis en évidence qu'un stress du RE entraîne un délai dans le cycle cellulaire et que des cellules stressées présentent un défaut de cytokinèse dû à

une altération du complexe des septines. Cette voie ERSU se révèle indépendante de la voie canonique UPR et est coordonnée par la MAP (Mitogen Activated Protein) kinase Slt2 (Babour, Bicknell et al.).

Chapitre V : Réticulum Endoplasmique et pathologies

I. Dysfonctions du RE et pathologies

De nombreuses pathologies telles que la mucoviscidose, un déficit en $\alpha 1$ -antitrypsine, des défauts du métabolisme ou du développement ont pour cause des mutations dans des protéines secrétées qui altèrent leur propriété de repliement. Ces maladies nommées "ER storage diseases" ont été initialement classifiées sur la base de leur cause biochimique par Kim et Arvan (Kim and Arvan 1998) et sont caractérisées par la reconnaissance de la protéine mutante par le système de surveillance du repliement des protéines dans le RE, entraînant selon les cas, soit la dégradation de la protéine soit sa rétention dans la lumière du RE parfois à l'origine d'un stress. Plus récemment, cette classification a été étendue pour inclure les pathologies causées par une dysfonction de certains composants du RE qui affecte le repliement ou le transport des protéines hors du RE, et celles causées par des déficiences dans les voies de signalisation dépendante de l'UPR. L'ensemble de ces pathologies associées au RE sont ainsi regroupées maintenant en quatre classes (Schroder and Kaufman 2005). Dans la suite de ce chapitre, nous présenterons les caractéristiques de chaque classe et des exemples caractéristiques de chacune d'entre elles.

1- Les pathologies de classe I

Les pathologies de classe I sont causées par des mutations dans des protéines secrétées qui altèrent leurs propriétés de repliement. Dans cette catégorie, trois sous-groupes peuvent être distingués. Dans le sous groupe A, seul le transport de la protéine à travers la voie de sécrétion est affecté et la maladie est causée par une perte de fonction de la protéine à sa destination finale. Ces protéines mutées peuvent être fonctionnelles ou non mais n'atteignent pas leur destination finale due à une interaction prolongée avec les chaperonnes moléculaires et une rétention dans le RE. Dans le sous groupe B, la protéine mutante est incorporée dans des complexes multimériques composés ainsi à la fois de protéines sauvages et de protéines mutées. Du fait de la présence du mutant dans le complexe, celui-ci est retenu dans le RE. Les protéines mutantes à l'origine des pathologies de classe IA et IB sont sensibles à la dégradation via le système ERAD et ne s'accumulent pas dans la lumière du RE.

A l'opposé, dans la troisième catégorie (sous groupe C), les défauts de repliement des protéines mutantes altèrent les fonctions du RE. En effet, en général, ces protéines sont résistantes à la dégradation, ce qui conduit à une accumulation de protéines malconformées dans la lumière du RE à l'origine d'un stress pouvant mener à la mort de la cellule.

La mucoviscidose, une maladie génétique autosomale récessive mortelle, est l'exemple majeur d'une pathologie de classe IA. Cette pathologie est causée par des mutations dans le gène codant pour le CFTR (Riordan, Rommens et al. 1989). Le CFTR est un canal chlore qui est exprimé dans les cellules épithéliales de nombreux tissus, incluant le poumon, le pancréas, l'intestin et le rein (Anderson, Gregory et al. 1991; Drumm, Wilkinson et al. 1991). La fonction du CFTR est nécessaire pour l'homéostasie ionique et hydrique à travers les tissus épithéliaux. Environ mille mutations entraînant la pathologie ont été identifiées dans le gène du CFTR mais 70% des patients présentent une délétion d'une phénylalanine en position 508 ($\Delta F508$). Dans le RE, la glycoprotéine CFTR se replie de manière lente et il a été montré que jusqu'à 75% de la protéine était adressée au système de dégradation. Du fait de la présence de la mutation, la biogenèse du mutant $\Delta F508$ est inefficace et ralentie, et 100% de la protéine est retenue dans le RE par la machinerie de surveillance du RE et redirigée vers la dégradation, entraînant une absence totale du CFTR à la membrane plasmique (Ward and Kopito 1994; Jensen, Loo et al. 1995). De nombreuses études ayant démontrées que la protéine CFTR mutée est biologiquement active, la mucoviscidose a été qualifiée de pathologie de dégradation "hyperactive".

Un autre exemple caractéristique des pathologies de la classe I et certainement l'un des plus étudié est celui du déficit en $\alpha 1$ -antitrypsine (ATD) (Alpha 1 Antitrypsine Deficiency), un désordre génétique caractérisé par une production anormale d' $\alpha 1$ -antitrypsine (Carrell and Lomas 2002). Cette glycoprotéine monomérique est un inhibiteur de l'élastase leukocytaire, une protéase induite en cas d'infection pulmonaire ou d'irritation chronique. L' $\alpha 1$ -antitrypsine protège ainsi les tissus du système pulmonaire des dommages causés par l'activité protéolytique de l'élastase. Cet inhibiteur de l'élastase est majoritairement sécrété par les hépatocytes. Les malades atteints d'ATD présentent un faible niveau de sécrétion d' $\alpha 1$ -antitrypsine mutante qui a pour conséquence une perte de l'activité de la protéine à sa destination finale et des dommages importants au niveau des tissus, notamment pulmonaires, soumis à l'action des élastases (Rudnick and Perlmutter 2005). Plus de soixante-dix variants de l' $\alpha 1$ -antitrypsine ont été décrits et caractérisés. Environ 95% des patients sont

homozygotes pour l'allèle mutant autosomal nommé Z. Cet allèle présente une substitution d'une lysine en glutamate en position 342. Cette mutation altère la structure de la molécule d' α 1-antitrypsine entraînant un changement de conformation stimulant la formation de dimères puis d'oligomères. Ces agrégats forment des inclusions intrahépatocytaires insolubles (Lomas and Mahadeva 2002) qui provoquent la rétention de la majorité de l' α 1-antitrypsine dans la lumière du RE pouvant conduire à une altération du fonctionnement de l'organe voire de la cellule. De plus, il a aussi été mis en évidence que l'accumulation du mutant Z dans la lumière du RE entraîne une augmentation des risques d'apparition d'un phénotype cancéreux (Rudnick and Perlmutter 2005). En effet, l'étude du modèle de souris déficiente pour l' α 1-antitrypsine suggère que l'accumulation du mutant Z dans le RE des hépatocytes altère la régulation de différents gènes contrôlant la prolifération et la tumorigénèse.

D'autres mutants de l' α 1-antitrypsine à l'origine d'une ATD ont été étudiés. On peut citer notamment le mutant dit Null Hong Kong ou NHK (Sifers, Brashears-Macatee et al. 1988). Celui-ci a été découvert chez des patients présentant une totale absence d' α 1-antitrypsine circulante dans le sérum. Une étude moléculaire a permis de mettre en évidence que ces patients présentaient une délétion de deux nucléotides dans l'exon quatre du gène codant pour l' α 1-antitrypsine, induisant un changement du cadre de lecture et la production d'une protéine tronquée en amont du site actif inhibiteur. Des expériences de marquage métabolique ont permis de montrer que la protéine α 1-antitrypsine NHK n'était pas sécrétée mais était retenue dans le RE puis dégradée via le système ERAD (Liu, Choudhury et al. 1999). De manière intéressante, cette protéine représente à ce jour un outil moléculaire caractéristique dans l'étude du fonctionnement du système ERAD des protéines glycosylées et a permis d'identifier de nombreux composants impliqués dans la dégradation des glycoprotéines mal conformées du RE.

2- Les pathologies de classe II

Ce groupe de pathologies est aussi causé par une perte de fonction d'une protéine spécifique à sa destination finale. Cependant, à l'opposé des pathologies de classe I, ce sont des mutations dans des protéines de la machinerie de repliement et/ou de transport qui sont l'origine de la rétention de la protéine dans le RE.

L'exemple majeur de cette catégorie est un désordre sanguin autosomal récessif caractérisé par la réduction coordonnée du niveau plasmatique des facteurs V et VIII, deux facteurs de coagulation majoritairement sécrétés par les hépatocytes (Oeri, Matter et al. 1954). Des

analyses génétiques de patients ont identifié deux gènes pouvant être associés à ce désordre: pour 70% des cas, il s'agit d'une mutation dans le gène LMAN1 (Lectine Mannose-binding 1) codant pour la protéine de transport ERGIC53. Pour les 30% des cas restant, il s'agit d'une mutation dans le gène MCFD2 (Multiple Coagulation Factor Deficiency 2) qui code pour une protéine luminale du RE interagissant avec ERGIC53. Ces deux protéines forment un complexe qui permet le transport des facteurs V et VIII entre le RE et le compartiment ERGIC. Trente-deux et seize mutations différentes ont été respectivement dénombrées dans le gène LMAN1 et le gène MCFD2. Ces mutations sont à l'origine d'une absence de production de la protéine (ERGIC53 ou la protéine codée par MCFD2) ou de la production de protéines tronquées, non fonctionnelles ou instables. Néanmoins, ces mutations entraînent toutes un défaut de transport des facteurs V et VIII du RE vers l'appareil de Golgi, et par conséquent une rétention de ces facteurs dans le RE (Zhang, Spreafico et al. 2008).

D'autre part, des mutations dans des gènes codant pour des protéines participant à la machinerie de repliement du RE peuvent aussi être à l'origine de dysfonction du RE et de défauts de sécrétion de protéines. C'est le cas notamment de mutations dans le gène codant pour la protéine BAP, une NEF qui régule l'activité ATPase de la protéine BiP (voir **Chapitre II, paragraphe II.2a**), à l'origine du syndrome de Marinesco-Sjoegren (Chung, Shen et al. 2002). Ce syndrome autosomal récessif fait partie de la famille des ataxies cérébelleuses et est accompagné de retards de développement, de cataracte et de myopathie (Lagier-Tourenne, Tranebaerg et al. 2003). Près de 50% des patients atteints de ce syndrome présentent une mutation dans le gène codant pour BAP. Les différentes mutations identifiées sont prédites pour entraîner soit une absence de production de la protéine soit un défaut de liaison avec la protéine BiP induisant un dysfonctionnement de l'activité de BiP (rôle au cours de la translocation co-translationnelle, activité de chaperonnes...). Le défaut d'activité de BiP pourrait ainsi conduire à une diminution de l'entrée des protéines dans le RE ainsi qu'à des défauts de repliement de ses protéines substrats (Senderek, Krieger et al. 2005). On peut également citer dans cette catégorie les CDGs qui représentent un groupe de maladies affectant le processus de N-glycosylation. Deux types de CDGs sont répertoriés, les CDGs de type I qui sont la conséquence de mutations au niveau de gènes codant pour des protéines qui contrôlent la biosynthèse ou le transfert du précurseur oligosaccharidique, et les CDGs de type II qui sont la conséquence de mutations de gènes dont les produits assurent la maturation des N-glycoprotéines (par exemple une mutation dans l' α -glucosidase I (De Praeter, Gerwig et al. 2000)). Dans les deux cas, la maturation des glycoprotéines est défectueuse entraînant une altération majeure de leur sécrétion et de leur activité biologique. Bien que la présentation

clinique varie d'une CDG à l'autre, une atteinte neurologique sévère associée à un retard mental et à une hypotonie axiale est présente le plus souvent, auxquels peuvent s'ajouter des atteintes multi viscérales graves (Jaeken and Matthijs 2007).

3- Les pathologies de classe III

Les pathologies de classe III sont causées par une déficience de l'une des voies de signalisation émanant de l'UPR. L'exemple le plus caractéristique de cette catégorie de pathologies est le syndrome Wolcott-Rallison. Ce syndrome est une maladie autosomale récessive rare caractérisée par un diabète insulino-dépendant qui se développe très précocement après la naissance ou dans la petite enfance et qui mène à une forte susceptibilité aux fractures. Ce syndrome résulte de mutations dans le gène codant pour la protéine PERK entraînant une perte d'activité de son domaine kinase (Delepine, Nicolino et al. 2000). L'utilisation de modèle de souris déficientes pour le gène *Perk* a permis de fournir des avancées importantes sur la pathogénicité de ce syndrome. Comme cela a été présenté précédemment (voir **Chapitre IV, paragraphe II.6b**) les souris KO pour le gène *Perk* présentent un diabète précoce du à une accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE des cellules β pancréatiques induisant leur apoptose (Harding, Zeng et al. 2001).

4- Les pathologies de classe IV

Dans les pathologies de classe IV, les voies de signalisation émanant de l'UPR sont intactes mais les réponses cytoprotectrices régulées par l'UPR sont perturbées. Cette classe de pathologies comporte par exemple certaines maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson) et les maladies par expansion de polyglutamine (polyQ) (maladie de Huntington, ataxies spino-cérébelleuses). Ces pathologies se caractérisent par une accumulation anormale de protéines dans les neurones. De nombreuses études indiquent que la pathogénicité de ces maladies serait en partie due à des dysfonctions du système de dégradation ubiquitine/protéasome qui conduirait à l'accumulation de protéines destinées à être éliminées (à la fois dans le cytosol et dans le RE), à une activation de la réponse UPR et, à plus long terme, à la mort du neurone (Paul 2008). Pour exemple, les maladies par expansion polyQ sont des maladies autosomales causées par l'ajout répété dans un gène codant pour une protéine cytosolique, d'un motif CAG qui va conduire à la production d'une longue chaîne de polyglutamines dans la protéine codée. La présence de la chaîne de polyglutamines entraîne des défauts de repliement de la protéine et son clivage protéolytique

en fragments plus courts et potentiellement toxiques qui forment des agrégats cytosoliques et nucléaires, appelés corps d'inclusion (Lunkes, Lindenberg et al. 2002). Ainsi, dans la maladie de Machado-Joseph (ou ataxie spino-cerebelleuse de type III), l'accumulation cytoplasmique de la protéine codée par le gène MJD1 (Machado-Joseph Disease gene 1) inhibe l'activité du protéasome, interfère avec le système ERAD et déclenche une réponse UPR conduisant à l'activation de la caspase 12 et à l'apoptose de la cellule (Nishitoh, Matsuzawa et al. 2002).

II. Détournements des fonctions du RE par les pathogènes

Les virus et bactéries pathogènes manipulent les fonctions du RE pour permettre leur survie ou délivrer leurs produits toxiques dans le cytosol. En effet, d'une part, les infections virales sont souvent associées à une production massive de protéines virales qui monopolisent la voie de biosynthèse des protéines (Ploegh 1998; Land and Braakman 2001). D'autre part, différentes toxines (comme par exemple la toxine du choléra ou la ricin A) sont capables après endocytose de rejoindre le RE (via un mécanisme de transport rétrograde encore mal élucidé) et de détourner la machinerie du système ERAD dans le but d'atteindre le cytosol (Lord, Deeks et al. 2003). En effet, dans le RE, ces toxines se présentent sous une forme légèrement mal conformée afin d'être reconnues par le système ERAD et retrotransloquées dans le cytosol. Une faible composition en lysine de ces toxines leur permet ensuite d'éviter leur ubiquitination et ainsi d'échapper à la dégradation via le protéasome (Worthington and Carbonetti 2007). Une fois dans le cytosol, les toxines retrouvent une conformation fonctionnelle, résistante à la dégradation. Elles ont alors la possibilité d'agir sur leurs cibles et d'induire une toxicité cellulaire. Par exemple, certaines toxines comme la ricin A ont la capacité de se lier et d'inactiver les ribosomes entraînant une inhibition de la synthèse protéique (Lord, Deeks et al. 2003). Par ailleurs, certains virus ont aussi la capacité de détourner la machinerie du système ERAD afin d'assurer leur survie. C'est le cas notamment du CMV. En effet, les protéines US2 et US11 codées par le CMV sont impliquées dans la dégradation via le système ERAD des chaînes lourdes des molécules de CMH de classe I (Wiertz, Tortorella et al. 1996). Les molécules de CMH de classe I étant impliquées dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes T8 cytotoxiques, leur absence favorise l'échappement des cellules infectées par le virus à la réponse immunitaire (Hansen and Bouvier 2009).

III. Implication du stress du RE et de la réponse UPR dans les pathologies

Comme nous l'avons vu précédemment, le stress du RE de manière générale, la réponse UPR en particulier, interviennent dans un certain nombre de processus physiologiques. Cependant, ces dernières années une activation chronique du stress du RE a été détectée dans de nombreuses maladies chez l'Homme, notamment dans les cancers, les maladies inflammatoires intestinales, les maladies neurologiques et différentes pathologies métaboliques telles que l'obésité, le diabète ou la stéatose hépatique (accumulation de triglycérides dans les hépatocytes). Nous allons dans la suite de ce paragraphe faire une revue non exhaustive de la littérature reliant ces différentes pathologies et le stress du RE.

1- Stress du RE et cancer

Ces dernières années, les voies de la réponse UPR ont été décrites pour jouer des rôles importants dans le cancer (Ma and Hendershot 2004; Moenner, Pluquet et al. 2007). En effet, les fonctions du RE sont altérées à différents niveaux dans de nombreux types de cancer du fait notamment de la carence en oxygène et/ou nutritive à laquelle les cellules tumorales sont exposées. Dans ces conditions, l'activation des voies de stress du RE confère un avantage sélectif crucial aux cellules tumorales. Pour exemple, l'activation de PERK semble apporter un avantage prolifératif aux cellules tumorales en permettant leur adaptation à des stress ischémiques, comme l'hypoxie, en induisant notamment une réponse angiogénique via l'induction d'un facteur pro-angiogénique la protéine VCIP (Vascular Endothelial Growth Factor and type I collagen Inducible Protein) (Bi, Naczki et al. 2005). D'autre part, il a été mis en évidence que la perte d'expression de la protéine XBP-1 augmente la sensibilité des cellules transformées à des stress hypoxiques et entraîne une diminution importante de la croissance tumorale. A l'opposé de PERK, les défauts de la croissance tumorale dans les cellules déficientes pour XBP1 ne semblent pas être reliés à l'inhibition d'une réponse angiogénique (Romero-Ramirez, Cao et al. 2004). De plus, des études ont montré que l'inhibition de la signalisation d'IRE1 induisait une diminution de la croissance et de l'angiogénèse tumorale. IRE1 semble ainsi permettre l'adaptation des cellules tumorales à leur environnement ischémique en induisant entre autres la production de facteurs pro-angiogéniques tel que le VEGF-A (Vascular endothelial growth factor-A) (Drogat, Auguste et al. 2007). D'autre part, des mutations somatiques non silencieuses du gène de IRE1 sont fréquemment observées dans certains cancers humains, notamment dans les glioblastomes.

2- Stress du RE et maladies métaboliques

De nombreuses études visant à explorer les voies de signalisation de l'UPR ont permis de mettre en évidence une association étroite entre la voie UPR et les maladies métaboliques. Un certain nombre de données ont notamment montré un lien entre la voie UPR et les composantes majeures du diabète de type II : l'altération de la sécrétion d'insuline et le phénomène d'insulino-résistance périphérique. En effet, il a été montré par exemple que le stress du RE était activé dans le foie et le tissu adipeux de rongeurs obèses et insulino-résistants (Ozcan, Cao et al. 2004). L'implication du stress du RE dans le développement de l'insulino-résistance a aussi été démontrée par des études *in vivo* qui indiquent que l'inhibition de la voie UPR chez des animaux obèses et insulino-résistants aboutit à une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline (Nakatani, Kaneto et al. 2005). De plus, IRE1 a été identifié comme jouant un rôle important dans les phénomènes d'insulino-résistances périphériques. En effet, une altération de l'axe de signalisation IRE1/XBP1 semble corrélé à un défaut de la voie de signalisation dépendant du récepteur à l'insuline dans le foie (Ozcan, Cao et al. 2004). Plus récemment, il a été mis en évidence que les cellules β pancréatiques soumises à une hyperglycémie chronique présentent un stress du RE et une augmentation de la phosphorylation de IRE1. Ce stress du RE a pour conséquence une inhibition de l'expression et de la synthèse de l'insuline aggravant le phénotype diabétique (Fonseca, Lipson et al. 2007). De plus, la kinase JNK, qui est activée entre autres par la voie IRE1, semble réguler négativement la voie de signalisation dépendant de l'insuline en participant à la phosphorylation inhibitrice des résidus sérines d'IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1) (Hirosumi, Tuncman et al. 2002). D'autre part, l'équipe de Hotamisligil a mis en évidence des liens entre le stress du RE et l'obésité, notamment en démontrant l'activation de la voie PERK, de la kinase JNK et l'induction de l'expression de BiP dans les foies de souris ob/ob (souris obèses dues à une déficience en leptine) ou rendues obèses par un régime gras (Ozcan, Cao et al. 2004).

3- Stress du RE et maladies neurodégénératives

Les voies de signalisation de l'UPR et notamment, la protéine IRE1 semblent également intervenir dans les mécanismes de mort cellulaire observés au cours de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer.

La maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif caractérisé par un dépôt extracellulaire de substance amyloïde, conséquence du clivage anormal d'une glycoprotéine membranaire nommée APP (Amyloid Precursor Protein). Ce clivage est assuré par des γ secrétases appelés présénilines 1 et 2 (PS-1 et PS-2). Des mutations dans les gènes codant pour PS-1, PS-2 ou APP sont responsables des formes familiales juvéniles de la maladie d'Alzheimer. De manière intéressante, il a été montré que PS-1 est capable de se lier directement sur IRE1 au niveau de la membrane du RE et que différentes formes mutantes de PS-1 inhibent l'autophosphorylation de IRE1 et induisent une diminution de la réponse UPR, augmentant la vulnérabilité des neurones face à un stress du RE (Katayama, Imaizumi et al. 2004).

4- Stress du RE et maladies inflammatoires intestinales

Des données provenant des modèles de souris et des phénotypes humains de maladies inflammatoires intestinales ont permis de souligner l'importance du stress du RE dans ces pathologies (Zhang and Kaufman 2008). En effet, il a été mis en évidence qu'un défaut dans les voies de signalisation en réponse aux stress du RE peut conduire à une inflammation intestinale. C'est notamment ce qui a été observé chez les souris KO pour la protéine IRE1 β , qui est l'isoforme d'IRE1 exprimée dans les cellules épithéliales intestinales (Wang, Harding et al. 1998). L'absence d'expression d'IRE1 β induit une augmentation d'un facteur trois de l'expression de BiP indiquant une augmentation du stress du RE. Les souris KO pour IRE1 β ne développent pas spontanément une inflammation intestinale mais présentent une augmentation de la sensibilité au DSS, qui induit des colites (inflammation de l'épithélium du colon) (Bertolotti, Wang et al. 2001). De façon similaire, une déficience en XBP1 dans les cellules épithéliales intestinales a été montrée pour induire spontanément une iléite (inflammation de l'épithélium de l'ileum) (Kaser, Lee et al. 2008).

Hypothèses et Objectifs du Projet

Environ un tiers des produits du génome soient environ 30000 protéines transitent par la voie de sécrétion et mûrissent dans la lumière RE. Cependant, à ce jour, seul un petit nombre de protéines ont été décrites comme intervenant dans le système de surveillance du RE et le système de repliement/dégradation qui lui est associé.

La compréhension de ces mécanismes représente un enjeu primordial de la biologie. Il s'agit en effet d'un aspect essentiel à l'analyse des divers événements impliqués dans l'homéostasie cellulaire. Cependant, depuis une ou deux décennies, à la vue de l'importance grandissante des maladies dites "de repliement" et de leur impact sur la santé publique, l'intérêt pour les mécanismes de repliement et le système de surveillance a largement dépassé le cadre de la biologie. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre V, de très nombreuses pathologies humaines sont causées par un repliement inefficace, une dégradation prématurée, ou un défaut de dégradation de protéines dont les conséquences peuvent être dramatiques sur le fonctionnement des cellules et des organismes.

L'objectif de cette thèse était donc de mettre en place une stratégie expérimentale visant à identifier puis caractériser fonctionnellement de nouveaux constituants du système de surveillance du repliement des protéines dans le RE. Ce travail vise à apporter de nouvelles clés dans la compréhension de ce mécanisme qui, au-delà de la connaissance fondamentale, pourrait permettre à terme de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques de prévention, diagnostic ou traitement des pathologies associées à des repliements incorrects de protéines.

Résultats

Méthodologie utilisée

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le repliement des protéines, leur maturation et les premières étapes de surveillance de la configuration des protéines sont des étapes très précoces qui ont lieu de manière concomitante à la translocation de la protéine dans la lumière du RE. Sur la base de ces informations, nous avons émis l'hypothèse que l'isolation de protéines à proximité du canal de translocation permettrait d'isoler des protéines impliquées dans le système de surveillance du RE et pourrait amener à identifier de nouveaux membres de ce système. Le canal de translocation étant en étroite association avec divers partenaires et notamment le ribosome, nous avons utilisé une technique d'enrichissement des protéines associées aux ribosomes précédemment publiée (Chevet, Wong et al. 1999) afin d'isoler les protéines à proximité du canal de translocation. Nous avons ensuite, dans une première partie, identifié et classifié les protéines ainsi isolées à partir de microsomes de pancréas de chien, grâce à une analyse par spectrométrie de masse et à l'utilisation d'outils bioinformatiques. Dans une deuxième partie, nous avons sélectionné parmi les protéines identifiées un candidat potentiel pouvant répondre à notre objectif et exploré la fonction de ce dernier dans le RE grâce à une analyse fonctionnelle *in cellulo* dans une lignée cellulaire humaine dérivée de cancer du col de l'utérus (cellules HeLa).

Principaux résultats obtenus

1- Validation de la méthodologie utilisée

L'analyse par spectrométrie de masse des protéines associées aux ribosomes a permis d'identifier 213 protéines associées aux ribosomes, comprenant notamment les nombreuses protéines ribosomales et les protéines constitutives du translocon. La présence de la plupart des protéines identifiées a été confirmée par immunoblot. Parmi ces protéines, diverses protéines impliquées dans la surveillance du repliement des protéines et/ou le système ERAD ont été identifiées (calnexine, calréticuline, BiP, GRP94, p97, PDI...), ce qui nous a permis de valider l'approche méthodologique utilisée afin de répondre à notre objectif.

2- Identification des protéines associées aux ribosomes de fonctions non caractérisées : sélection et caractérisation de la protéine Anterior Gradient 2 (AGR2)

Dans le but de découvrir de nouveaux composants du système de surveillance, nous nous sommes intéressés aux douze protéines identifiées dans notre étude dont la fonction n'était pas clairement caractérisée. Parmi elles, nous avons sélectionné uniquement les protéines localisées exclusivement dans le RE et focalisé notre attention sur une nouvelle protéine du RE très récemment décrite, AGR2, une protéine qui contient un motif thioredoxine-like et qui est apparentée à la famille des Proteine Disulfide Isomerase (PDI). La présence de cette protéine associée aux ribosomes a été confirmée par immunoblot et nous avons mis en évidence que cette association était médiée par les chaînes polypeptidiques en voie de translocation.

3- L'expression de AGR2 est régulée par la réponse UPR dans les cellules mammifères

L'expression de nombreuses protéines résidentes du RE impliquées dans le système de surveillance/repliement/dégradation des protéines est induite en réponse à un stress du RE. Ainsi, afin d'évaluer si AGR2 joue un rôle dans le système de surveillance au sein du RE, nous avons dans un premier temps décidé d'étudier l'expression d'AGR2 en réponse à un stress du RE. Le suivi du niveau d'expression de l'ARNm et de la protéine AGR2 dans différentes lignées cellulaires humaines (HeLa, HuH6 et HuH7) à l'état basal, et en réponse à un traitement à la tunicamycine et au DTT (Dithiothréitol), (deux agents inducteurs de stress du RE bien caractérisés qui préviennent la N-glycosylation et la formation des ponts disulfures, respectivement), a permis de mettre en évidence que l'expression d'AGR2 était induite en réponse à un stress du RE. De plus nous avons montré que l'expression d'AGR2 était régulée par les voies de signalisation de l'UPR dépendante des protéines ATF6 et IRE1.

4- L'atténuation de l'expression d'AGR2 perturbe l'homéostasie basale du RE

Dans un second temps, afin d'explorer les fonctions potentielles d'AGR2 et notamment son implication dans la régulation de l'homéostasie du RE, nous avons utilisé une stratégie d'atténuation d'expression par ARN interférence dirigé contre AGR2. Nous avons ensuite caractérisé l'impact de cette atténuation d'expression sur l'homéostasie du RE dans la lignée cellulaire HeLa. Dans ce but, nous avons suivi l'expression de différents marqueurs du stress RE en présence ou en absence d'AGR2, à l'état basal ou en réponse à un traitement à la tunicamycine. Les résultats obtenus suggèrent que l'atténuation de l'expression d'AGR2 n'a que peu d'impact sur les capacités de la cellule à répondre à un stress du RE. Néanmoins, AGR2 semble jouer un rôle important dans l'homéostasie basale du RE, comme le prouve l'augmentation, à l'état basal en absence d'AGR2, de la phosphorylation d'eIF2 α , de l'épissage de XBP-1 et de la phosphorylation de JNK. De plus, nous avons observé dans ces mêmes conditions une augmentation importante de l'expression de l'ARNm de EDEM1.

5- AGR2 interagit avec le mutant définitivement mal conforme NHK de l' α 1-antitrypsine et régule sa dégradation

EDEM1 étant un composant clé du système ERAD des glycoprotéines, nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'AGR2 pouvait être impliqué dans la régulation de la dégradation des protéines via le système ERAD. Pour tester notre hypothèse et poursuivre dans l'exploration de la fonction d'AGR2 nous avons suivi la dégradation d'une glycoprotéine substrat caractéristique de l'ERAD (le mutant NHK de l' α 1-antitrypsine) dans des cellules HeLa en présence ou en absence d'AGR2. Des expériences de marquage métabolique avec de la méthionine/cystéine marquée au ^{35}S nous ont permis de mettre en évidence que l'atténuation de l'expression d'AGR2 induit une accélération de la disparition de NHK de la cellule, sans pour autant induire sa sécrétion, suggérant ainsi une augmentation de sa dégradation via le système ERAD. De plus des expériences classiques de co-immunoprécipitation ont permis de démontrer qu'AGR2 interagit avec le mutant NHK dans la cellule. A l'opposé, l'absence d'AGR2 n'a pas d'impact sur la sécrétion de la protéine α 1-antitrypsine sauvage, dont l'interaction avec AGR2 n'a pu être mise en évidence par co-immunoprécipitation.

Pour finir, nous avons souhaité étudier l'impact de l'inhibition de la voie ERAD dans notre système expérimental en atténuant l'expression d'EDEM1 par ARN interférence. Contrairement à nos attentes, l'atténuation de l'expression d'EDEM1 n'a que peu d'impact sur la dégradation de NHK. De plus, de manière surprenante, l'atténuation simultanée de l'expression d'AGR2 et d'EDEM1 entraîne une augmentation significative de la dégradation de NHK par rapport à l'atténuation seule de l'expression AGR2. Ces résultats suggèrent qu'AGR2 joue un rôle important dans le processus de stabilité/dégradation du mutant NHK potentiellement de manière indépendante au système ERAD.

Conclusion

Notre stratégie d'enrichissement de protéines associées au ribosome nous a permis d'identifier et de caractériser AGR2, une protéine localisée dans le RE, membre putatif de la famille des PDI dont l'expression est régulée par la réponse UPR et qui semble interagir très précocement avec les polypeptides en voie de synthèse. L'étude fonctionnelle d'AGR2 a suggéré que cette protéine joue un rôle dans la régulation de l'homéostasie basale du RE. De plus, nos résultats suggèrent qu'AGR2 intervient spécifiquement dans la régulation de la dégradation des protéines définitivement mal conformées. Des expériences complémentaires semblent nécessaires afin de caractériser plus en détail le rôle d'AGR2 dans le RE. Néanmoins, notre analyse a permis d'identifier un nouvel acteur du système de surveillance du RE et de progresser dans la compréhension de ce processus complexe et primordial pour le fonctionnement cellulaire.

Ce travail fait l'objet d'un article soumis pour publication dans la revue Traffic sous le nom :

"Role of the PDI-family member Anterior Gradient 2 in Endoplasmic quality control of Alpha-1 Antitrypsin."

Article

**Role of the PDI-family member Anterior Gradient 2 in
Endoplasmic Reticulum quality control of Alpha-1
Antitrypsine**



**Role of the PDI-family member Anterior Gradient 2 in
Endoplasmic Reticulum quality control of Alpha-1
Antitrypsin**

Journal:	<i>Traffic</i>
Manuscript ID:	TRA-10-0153
Manuscript Type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	28-Jul-2010
Complete List of Authors:	mulot, audrey; inserm delom, frederic; mcgill univ bouhecareilh, marion; inserm nguyen, duc thang; mcgill univ boismenu, daniel; mcgill univ wise, michael; UWA chevet, eric; INSERM, U889
Key Words:	endoplasmic reticulum, quality control, folding, stress signalling, proteomics, translocon

SCHOLARONE™
Manuscripts

Role of the PDI-family member Anterior Gradient 2 in Endoplasmic Reticulum quality control of Alpha-1 Antitrypsin

Audrey Mulot^{1,2*}, Frédéric Delom^{3,7*}, Marion Bouchecareilh^{1,2}, Duc Thang Nguyen³, Daniel Boismenu⁴, Michael J. Wise⁵ and Eric Chevet^{1,2,3,6}

¹Avenir, INSERM U889, Bordeaux, France. ²Université Bordeaux 2, Bordeaux, France. ³Dept of Surgery, McGill University, Montreal, Qc, Canada. ⁴McGill University and Génome Québec Innovation Centre, Montreal, Qc, Canada. ⁵Biomolecular, Biomedical & Chemical Sciences, University of Western Australia, Perth, Australia.

Running title: role of AGR2 in the endoplasmic reticulum

⁶Correspondance to: Eric Chevet, Avenir, Inserm U889, Université Bordeaux 2, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France. Email: eric.chevet@u-bordeaux2.fr; phone: +33 (0)557579253.

⁷Present address: Université Bordeaux 2, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, Bordeaux; and Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U885, Bordeaux, France

*Equal contribution

Summary

Using sub-organellar proteomics to identify rough endoplasmic reticulum (ER) proteins associated with ER membrane-bound ribosome, we uncovered a yet uncharacterized ER protein named Anterior Gradient 2 (AGR2) that participates in ER-associated folding and degradation. This protein was originally thought to belong to the protein disulfide isomerases family and found to be secreted by intestinal epithelial and cancer cells. Recently, AGR2 has been found to play an essential role in the production of intestinal mucus using germline *Agr2*^{-/-} mice. In this report, we confirm that AGR2 localizes to the lumen of the ER and indirectly associates to ER membrane-bound ribosomes through nascent chains. In addition, we show that AGR2 expression is up-regulated upon ER stress and controlled by the Unfolded Protein Response. Remarkably, we demonstrate that AGR2 knock-down significantly increases the expression of the ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein 1, a protein involved in retrotranslocation and degradation of misfolded ER protein in a process called ER-associated degradation. Moreover, attenuation of AGR2 expression accelerates the degradation of the terminally misfolded α 1-antitrypsin null-Hong-Kong mutant to which it binds

specifically. As a consequence, we propose that AGR2 could play a chaperone role and enhance quality control capacity of the ER near the translocon.

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) plays a major role in the biogenesis and folding of secretory proteins in eukaryotic cells. Nascent secretory and integral membrane proteins are targeted to and translocated into the ER lumen where they are folded and assembled (1, 2). To ensure that proteins entering this compartment are properly folded, the ER has evolved a quality control system (ERQC) achieving partial surveillance on the protein folding status (3, 4). Partially folded or misfolded proteins are not allowed to escape this compartment and remain in the ER where they accumulate (5). Proteins recognized as terminally misfolded are taken in charge by the ER-associated degradation (ERAD) machinery, retrotranslocated in the cytosol and degraded through proteasome dependent mechanisms (6).

About one third of the genome products mature in the ER, however thus far an apparently small number of quality control and ERAD actors have been identified as being responsible for the survey of these proteins' conformation.

This observation suggests that novel components of ERQC and ERAD remain to be identified, most likely to provide specificity to the existing molecular machines. The importance of understanding the principles regulating ERQC/ERAD is highlighted by the number of protein-misfolding human diseases known to be caused by inefficient protein folding, premature disposal, or defective removal of aberrant by-products of protein synthesis. As a consequence, we designed an experimental strategy aiming at discovering novel constituents of these pathways.

Protein folding and quality control takes place as early as newly synthesized proteins co-translationally translocate into the ER. We consequently postulated that isolating proteins in the vicinity of the translocation channel (translocon) would allow the identification of new component or new regulator of the quality control/ERAD systems. In the past 20 years a significant amount of studies have led to the characterization of the translocon using various approaches including classical membrane biochemistry (7), yeast genetics (8, 9) and structural biology (10, 11). In mammals, during co-translational import, the Sec61 complex consisting of Sec61 α , Sec61 β and Sec61 γ (12) binds to ribosomes at the ER membrane, which gives the ER its typical "rough" appearance (13). A Ribosome-Associated Protein (RAP) enrichment strategy has revealed the presence of ER membrane proteins in close proximity to the minimal/immature translocon leading to the concept of an extended/mature version of this molecular machine (14). In this version of the translocon, signal peptidases, the oligosaccharyl transferase complex, Bip, ERp57, the SRP-receptor and SRP, p34 and p180 (12) have been shown to associate stably or transiently with the translocation channel. The TRAP complex (α , β , δ , γ) has also been shown to be in close proximity to the translocon (15) but its role still remains unclear.

In the present work, we used a RAP enrichment strategy previously described (16) using dog pancreatic rough ER microsomes and analyzed this fraction by mass spectrometry. We identified 213

proteins among which various components previously identified as per se translocon components were found, thus confirming the validity of our approach. In addition, we identified components of the folding machinery, the ER quality control or the ERAD pathways. This approach also led to the identification of 12 proteins with uncharacterized function in the ribosomal pellet. We specifically focused our attention on a novel ER protein containing a single-cysteine thioredoxin-like motif and named Anterior Gradient 2 (AGR2). We demonstrate that AGR2 participates in the quality control capacity of the ER by specifically regulating the degradation of terminally misfolded proteins.

Results

The present study was initially carried out to dissect the mammalian translocon proteome. To this end, we isolated ribosome-associated proteins from dog pancreatic rough endoplasmic reticulum (ER) microsomes.

Proteomics analysis of Ribosome Associated Proteins in the ER

The use of rough ER microsomes necessitated an approach that would allow efficient solubilization of the ER membrane with minimal disruption of the binding interactions between ribosomes and Ribosome-Associated Proteins (RAPs). Consequently, dog pancreatic rough ER microsomes were purified as previously described (16) and their structure analyzed by electron microscopy (**Suppl. Figure 1A**). Our preparation showed the characteristic morphology of rough ER microsomes. Then, ribosomes/RAPs complexes were purified as schematically depicted in **Suppl. Figure 1B** and resolved by SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. The resulting bands from 4 independent experiments were compared and allowed us to establish an average profile of 31 bands (± 3). The bands identified ranged from 180 kDa to 4 kDa (**Figure 1A**). Of the 31 bands excised, 166 unique proteins were identified by mass spectrometry, database searches and subsequent gel/molecular mass matching. Four separate SDS-PAGE

followed by Coomassie blue staining were analyzed to ensure comprehensive protein identification and to minimize artefacts due to contaminants. The identified proteins are listed (**Suppl. Table 1**) with their respective classification in 12 functional categories, their NCBI Gi number, their predicted and/or published sub-cellular localization, the presence of predicted (as computed with TMHMM v2.0;(17)) or reported transmembrane domains, peptide numbers (unique, distinct and total) and finally the number of times the protein was found in the four experimental repeats. Also included are the Mascot score results quantifying the identification probability of the fragment match. Only statistically significant Mascot score results ($P < 0.05$) were included in the table.

The 213 candidate RAPs proteins were divided into 12 functional categories based on protein prediction analysis, including proteins involved in translocation, folding, translation and signalling. In addition, cargo proteins, mitochondrial, nuclear proteins, cytoskeletal, others and uncharacterized hits were also identified in the graph (**Figure 1B**). As expected, the largest proportion (38%) of the proteins found in the RAP fraction was of ribosomal origin and 7% belonged to the translation machinery. In addition, the RAP proteins comprised 8% cargo proteins, 8% nuclear or nucleic acid binding contaminants, 7% cytoskeletal proteins and 2% signalling proteins. Interestingly, 25% of the proteins belonged to the translocation/folding machinery, while the 5% remaining corresponded to proteins of uncharacterized function. Of the 213 unique proteins identified, 29 integral membrane proteins (RAMP) and twelve proteins of uncharacterized function (RAP1 to 12) were identified. Four of these uncharacterized proteins displayed at least one hydrophobic domain. When the RAMPs from the initial pool were re-clustered into the 12 functional groups, 34.5% of the proteins belonged to the translocation machinery, increasing to 55.2% when the folding machinery was included (**Figure 1C**). One major limitation of our approach is the presence of excessive amounts of ribosomal proteins

in the purified fraction which limits the detection of low abundance proteins migrating in the 45 kDa -10 kDa region of the SDS-gel. When the number of proteins identified in each functional cluster was plotted as a function of the band in which these proteins were found (not shown), it became obvious that the presence of large amounts of ribosomal proteins in bands 10 to 28 affected the identification of proteins from other functional clusters. To validate the proteins identified through the proteomic approach, a subset of those was selected based on 2 criteria: 1) their known ER localization and 2) their identification in the RAP fraction by MS sequencing. Some proteins were therefore included by chance, such as ER luminal proteins (UGGT, ERp72, and ORP150). Of these CRT and ORP150 were found in the RAP fraction by MS sequencing; integral membrane proteins (CNX, Gp25L and Ribophorin I (Ribi)) were found in the RAP fraction. Interestingly, only the proteins consistently found in the RAP fraction ($N \geq 2$) by MS were also identified in that fraction by immunoblot analysis thus validating our mass spectrometry sequencing approach (**Figure 1D**). Immunoblot analysis of the RAP fraction compared to the total ER extract revealed that Ribi, TRAP α , ORP150 and Gp25L (ordered by decreasing amount in the RAP fraction) were detected in the RAP fraction and were identified at least twice (out of four repeats) in the proteomics approach. In contrast UGGT and Glasell were neither identified by MS sequencing in the RAP fraction nor by immunoblot analysis. By comparison, ERp72 was found only once (out of four repeats) in the proteomics analysis and not detected by immunoblot (**Figure 1D**).

Computational analysis of the RAP fraction

To provide some functional significance to the list of proteins identified in the proteomics screen, we first generated a network using the String database (Snel, 2000) (www.string.embl.de) and the Medusa software (18). This analysis led to the constitution of a network bearing 143 nodes and 4733 edges (**Suppl. Figure**

2A). Notably a complex containing 69 ribosomal proteins was clearly identified (**Suppl. Figure 2A, white nodes**). The other most important machinery included proteins involved in translocation and folding (**Suppl. Figure 2A, purple and orange nodes**). This analysis revealed a highly functionally connected network including more than 60% of the proteins identified in the proteomics screen. Based on this analysis we aimed at analyzing the functions of uncharacterized/novel RAPs. Computer predictions can play a significant role in identifying the functions of unknown proteins, in this case the uncharacterized proteins isolated in the RAP fraction. We used a computational method called Protein or Oligonucleotide Probability Profile (POPP) analysis (19, 20) which allows proteins to be compared using profiles based on similarities in their amino acid, dipeptide, tripeptide, etc, compositions rather than similarity in their entire sequences. The power of the POPP approach lies in the ability to interrogate a database of POPPs for proteins of known function with similar peptide profiles to query proteins of unknown function, and to cluster similar profiles. By POPPing the RAPs of uncharacterized function against the 201 proteins found in our proteomics approach, we were able to cluster them into 6 functional families based on their POPP homology profile (**Suppl. Figure 2B**). Interestingly, all the RAPs of uncharacterized function showed some similarity with ribosomal proteins (ranging from [15-30%] to >45% for groups 1 and 4. This was most likely due to the high representation of ribosomal proteins in our RAP fraction (>35%). **Suppl. Figure 2C** provides a graphic representation of the RAP clusters that were generated. Even if few major proteins from other organelles were identified in the RAP fraction using proteomics, this fraction might still contain minimal amounts of contaminant from other cell compartments, and some proteins may also display dual localization.

Sub-cellular localization of the novel RAPs and characterization of RAP7

To further characterize the novel RAPs identified through the proteomics screen, we PCR amplified novel RAPs

encoding cDNAs from a human liver cDNA library (**Suppl. Figure 3A, left panel**) and the corresponding cDNA fragments were inserted into the pYFP-C vector using Gateway® recombinational cloning (**Suppl. Figure 3A, right panel**). We then assessed the localization of nine novel RAP proteins of uncharacterized function which were expressed as YFP-C-terminally tagged recombinant proteins in COS-7 cells (**Suppl. Figure 3B, C**) and HEK-293T cells (data not shown). A plasmid containing the ER marker Vip36-like fused Cyan Fluorescent fusion Protein (CFP-300 ER; <http://gfp-cdna.embl.de/>) was co-transfected with the RAP cDNA as co-localization marker. The results showed that four of nine RAP proteins localized exclusively to the ER in cos-7 cells (RAP 1, 6, 7 and 10) (**Suppl. Figure 3C**). In contrast, RAP3 displayed nuclear staining and RAP 2, 5, 8 and 12 were ambiguously localized (**Suppl. Figure 3B**). Similar results were obtained in HEK-293T cells, thus confirming the ER specific localization of RAP 1, 6, 7 and 10.

We selected RAP7 for further analyses as MS/MS analysis revealed that RAP-7 is identical to the Anterior Gradient 2 (AGR2) protein, the human homolog of the *Xenopus laevis* cement gland protein (XAG2). This protein, presenting a pseudo-thioredoxin site, is encoded by an oestrogen receptor-responsive gene known to be overexpressed in breast cancers (21) (22) (23) but whose function remains unclear. A recent study using germline *Agr2*^{-/-} mice showed that this gene plays an essential role in the production of intestinal mucus by goblet cells (24). Moreover, AGR2 was also recently involved in the regulation of ER homeostasis in Paneth and Goblet cells in mice (25). At the structural level, AGR2 contains a thioredoxin-like motif and is similar to the proteins ERp19 and ERp29, two members of the Protein Disulfide Isomerase (PDI) family involved in ER protein folding. AGR2 and ERp19 share 38% identity with major differences at their extremities. However, unlike ERp19 and ERp29, and thioredoxin proteins generally, AGR2 only has a single cysteine. Alignment of the amino acid sequences of human AGR2, ERp19 and ERp29 is

shown in **Figure 2A**. Each protein contains a putative NH₂-terminal signal sequence and a COOH-terminal ER retention motif (KTEL, EDEL, and KEEL, respectively). Despite only having the one cysteine residue, AGR2 is clearly homologous to the other two. **Figure 2B** shows a structural model of AGR2 created by 3D Jigsaw (26) and visualised using Chimera (27). The Matchmaker function has been used to align the model structure with 1SEN, the protein structure determined for ERp19. Notice that the AGR2 model cysteine, shown in mauve, very closely matches the first cysteine in 1SEN. **Figure 2C** depicts the ribbon model of the predicted structure overlaid with the hydrophobicity surface. The cysteine residue can be seen to lie near the surface of the molecule in a shallow, somewhat hydrophobic pocket (shown in orange). Note, however, that the size of the pocket could change markedly as it is bounded by loops.

To further confirm that AGR2 localized in the ribosome associated proteins fraction, ribosome pull-down (as carried out in Figure 1) was repeated and followed by immunoblot analysis (**Figure 2D, E**). ER microsomes were incubated in the presence or not of 5mM EDTA for 1 hour on ice to promote ribosome detachment from the ER membrane or following a treatment with puromycin (1 mM, 10 min at 30°C) to favour the detachment of translationally engaged ribosomes. As expected the ribosomal protein L4 was detected in the pellets collected after centrifugation through a 1.5M sucrose cushion in both experimental conditions. By contrast, AGR2 was not detected in the ribosomal pellet when microsomes were treated with EDTA, thus indicating that the association between AGR2 and the ribosome is dependent of an ER membrane component (**Figure 5E**). Even more interestingly, AGR2 was not detected in the ribosomal pellet following puromycin treatment, thus indicating that its association with the ribosomes occurred through nascent chains (**Figure 5E**). To evaluate AGR2 expression pattern in different human cell lines, RT-PCR analysis was carried out on total RNA and

immunoblot analysis with antibodies to AGR2 was performed on cultured human cells lysates. The data indicate that AGR2 is expressed in all the cell lines tested with a higher expression levels (at both mRNA and protein) in HuH6 cells (**Suppl. Figure 4A, B**). To further confirm the ER localization of endogenous AGR2, HuH6, HeLa and HuH7 cells were subjected to immunofluorescence analysis with antibodies against AGR2 and calnexin using confocal microscopy. The immunofluorescence data from HuH6 (top panel) and HuH7 (bottom panel) cells show that AGR2 was confined to the reticular structure around the nucleus and co-localized with the ER marker calnexin as illustrated in the merged image (**Figure 2F**).

AGR2 expression is regulated by the UPR in mammalian cells

Several ER-resident proteins, such as BiP, GRP94, PDI and ERp72 are stress inducible and thus participate to the restoration of ER homeostasis upon challenging environmental conditions. Considering the similarities between AGR2 and PDI-like proteins, we investigated whether AGR2 expression could be induced in response to ER stress. Three cell lines - HeLa, HepG2, HuH6 (data not shown) - were treated 8 or 16h with tunicamycin and DTT, two well characterized UPR inducers that prevent N-linked glycosylation and disulfide bond formation, respectively. RT-PCR analysis revealed that both tunicamycin and DTT significantly enhanced expression of AGR2 transcripts when normalized to the expression of GAPDH which did not vary throughout the treatment (**Figure 3A**). In addition, treatment with tunicamycin also increased AGR2 protein level (data not shown). These results indicate that AGR2 expression is up-regulated upon ER stress. To further dissect the regulation of AGR2 by the UPR pathway, HepG2 cells were silenced for IRE1, ATF6 or PERK and then treated with tunicamycin for 0 or 8h as it was the strongest AGR2 inducer (**Figure 3A**). AGR2 mRNA level was followed by RT-PCR. Our data indicate that knockdown of IRE1 and ATF6 decreased AGR2 mRNA basal expression

without preventing induction of AGR2 expression upon tunicamycin treatment (**Figure 3B** and quantitation **Figure 3C**). In contrast, PERK knock-down had no effect on AGR2 expression under basal condition or in acute ER stress induced by tunicamycin (**Figure 3B** and quantitation **Figure 3C**). The data indicating that AGR2 mRNA expression was regulated by the IRE1 pathway were confirmed by using HepG2 cells expressing dominant negative IRE1 (28) treated for 0, 8 or 16h with tunicamycin (**Figure 3D**).

Knock-down of AGR2 affects the ER stress response

To explore the biological function of AGR2, we used a siRNA knock-down strategy in cell culture. Given that AGR2 is an ER protein and that its expression is induced upon ER stress, we first examined the effects of AGR2 silencing on the ER stress response. Seventy-two hours after transfection of HeLa cells (selected as they do not express endogenous α -1 antitrypsin (α 1AT)) with a small interfering RNA specific for AGR2 mRNA, the abundance of AGR2 mRNA and protein was attenuated significantly (~80%) when compared with cells transfected with a siRNA control GL2 (**Figure 4A, B** respectively). Under similar experimental conditions, transfected HeLa cells were then treated with 5 μ g/mL tunicamycin for various periods of time and the expression of ER stress markers was then analyzed. The result obtained for 0, 8 and 16h of tunicamycin treatment are shown in **Figure 4** unless specified.

As shown in **Figure 4C**, under basal condition, transient AGR2 depletion increased by two fold the phosphorylation level of the translation initiation factor eIF2 α , which could lead to attenuated translation in AGR2 knocked-down cells. In contrast, no difference was observed upon tunicamycin treatment. We then assessed the expression of mRNA known to be specifically induced upon ER stress and mainly dependent on PERK activation, namely CHOP/GADD153 and GADD34, two genes belonging to the growth arrest DNA damage family. Using semi quantitative RT-PCR, we show that transient AGR2 depletion did not affect

CHOP and GADD34 mRNA expression in basal condition and upon ER stress induced by tunicamycin (**Figure 4D**). Next we investigated mRNA expression levels for other UPR markers such as HERPUD and ERO1L β , two ATF6 target genes upon tunicamycin treatment and in cells silenced or not for AGR2. The expression of these target genes was increased in response to tunicamycin in both cell types, however, it was significantly prolonged in cells knock-down for AGR2 (**Figure 4E**). Finally we examined the activation of the IRE1 arm of the UPR in AGR2 knockdown cells. To this end, we monitored XBP1 splicing under basal conditions and upon tunicamycin treatment using RT-PCR and JNK activation/phosphorylation using anti phospho-JNK antibodies and immunoblot. AGR2 silencing neither altered XBP-1 mRNA splicing nor JNK activation level upon tunicamycin treatment (**Figure 5A, B**). However under basal conditions, XBP-1s mRNA appeared more abundant in AGR2 silenced cells than in control cells (**Figure 5B**). In addition, we monitored the expression of ERdj4 and of the ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein 1 (EDEM1) mRNAs, two genes whose expression is in part under the control of the IRE1/XBP-1 signaling axis. ERdj4 expression was induced upon tunicamycin treatment in both control and AGR2 silenced cells. However, the induction was much less in the latter cells (**Figure 5C, right panel**). EDEM1 mRNA showed a 2.5 fold induction in AGR2 knockdown cells under basal condition but did not get further induced upon tunicamycin-mediated ER stress response in comparison with siGL2 transfected cells (**Figure 5C, left panel**). As EDEM1 is a key component of the ER Associated Degradation (ERAD) pathway, we postulated that AGR2 might be implicated in the connection between quality control and ERAD. To test this hypothesis, we monitored the expression of different genes encoding ERAD components in AGR2 knockdown cells compared to control cells under basal condition or upon tunicamycin treatment. OS-9, XTP3-B (two lectins of the ERAD system), HRD1, SEL1L and Derlin-1 mRNA expression was analyzed using qPCR. Only the

expression of OS-9 and XTP3-B was significantly altered in AGR2 knock-down cells. Indeed, whereas the expression of both mRNA was induced upon tunicamycin treatment, it was 30 to 50% lower in AGR2 knock-down cells than in control cells (**Figure 5D**). These data suggest that transient silencing of AGR2 impacts on the expression of ERAD components and may consequently affect the degradation of misfolded proteins at the ER.

AGR2 regulates the degradation of terminally misfolded Alpha-1 antitrypsin (α 1AT) null Hong Kong mutant but not of wild-type α 1AT

To test the hypothesis according to which AGR2 may be involved in a connection between quality control and ERAD in the ER, we monitored the degradation of the terminally misfolded α 1AT variant null Hong-Kong (NHK) (29). α 1AT is a plasma protein secreted by hepatocyte which belongs to the serine protease inhibitor superfamily. The NHK genetic variant is a truncated, folding defective form of α 1AT that is degraded through the ERAD pathway (30). Forty eight hours after transfection of HeLa cells with a siRNA against AGR2 or a siRNA control, the cells were transfected with a plasmid encoding either α 1AT-NHK or wild-type α 1AT. The expression levels of both proteins were monitored 24h later under control or AGR2 knock-down conditions using immunoblot. This indicated that attenuation of AGR2 expression did not affect α 1AT (WT and -NHK) expression (**Figure 6A**). Under similar conditions, α 1AT and AGR2 were co-immunoprecipitated using anti- α 1AT antibodies. The presence of AGR2 in the immune complex was revealed using immunoblotting with anti-AGR2 antibodies. These experiments demonstrate that AGR2 binds preferentially to α 1AT-NHK stably enough to be detected by co-immunoprecipitation (**Figure 6B**). Using the same experimental conditions, transfected cells were metabolically labeled for 15 min with 35 S-methionine. After various chase times in the presence of unlabeled methionine, α 1AT WT and -

NHK were immunoprecipitated from both cell lysates (intracellular) and culture media (secreted). Immunoprecipitates were then resolved by SDS-PAGE and radio-labeled material visualized by fluorography (**Figure 6C**). α 1AT-NHK was never detected in the medium. Quantification of the bands on X-Ray films was carried out by scanning densitometry. These experiments revealed that AGR2 knock-down enhanced disappearance of radio-labeled NHK α 1AT from the cell lysate (**Figure 6C, D**) and never led to the appearance of this protein in the medium, thus suggesting accelerated ER associated degradation. In contrast AGR2 silencing neither affected the intracellular fate of the folding-competent α 1AT (**Figure 6C, D**) nor its secretion in the extracellular milieu (**Figure 6C, D**). Protein intracellular half-life was calculated for both α 1AT WT and -NHK under control or siAGR2 conditions. This analysis revealed that only α 1AT-NHK half-life was reduced upon AGR2 silencing (**Figure 6E**) thus indicating the selectivity of AGR2 for folding incompetent polypeptides.

Epistatic interaction between AGR2 and EDEM1 in the degradation of α 1AT null Hong Kong mutant

As we showed that AGR2 knock-down i) enhanced the expression of EDEM1 mRNA and increased that of XTP3-B under basal conditions and ii) accelerated the degradation of α 1AT-NHK, we next monitored the impact of co-silencing AGR2, and EDEM1, XTP3-B or OS-9 on the degradation of α 1AT-NHK. First, we designed siRNAs against EDEM1, XTP3-B and OS-9 (**Supplementary Table 2**; (31)). The efficiency of these siRNA was first tested in HeLa cells either alone or in combination with the siRNA targeting AGR2 and the effect on mRNA expression monitored by RT-PCR (**Figure 7A**). This showed that the OS-9 siRNA reduced the expression of OS-9 by 75%, XTP3-B siRNA reduced the expression of XTP3-B by 50% and EDEM1 siRNA reduced the expression of EDEM1 mRNA by 95% (**Figure 7A**). These experiments were carried out under conditions where AGR2

mRNA was also knocked down. Using these experimental conditions, cells were also transfected with the α 1AT-NHK cDNA as shown above and the amount of newly synthesized α 1AT-NHK was monitored across time. This confirmed that AGR2 silencing accelerated the degradation of α 1AT-NHK and this phenomenon was even further enhanced when AGR2 and EDEM1 were co-silenced, suggesting that these two proteins may functionally interact in ERAD (**Figure 7B**). Interestingly no effect of OS-9 or XTP3-B silencing was observed on the degradation of α 1AT-NHK under AGR2 knock-down conditions (**Figure 7B**).

Discussion

In this study, we have used a sub-organellar proteomics approach to identify rough endoplasmic reticulum proteins associated with ER membrane-bound ribosomes that may be involved in ER quality control. This led us to identify and characterize a yet poorly characterized protein named Anterior Gradient 2 (AGR2). We confirm that AGR2 localized to the lumen of the ER and associated to ribosomes through nascent translocating polypeptides.

AGR-2 and protein misfolding in the ER

In this report we also show that AGR2 expression is up-regulated upon ER stress and that its basal expression levels are mainly regulated by the IRE1 and ATF6 arms of the Unfolded Protein Response (UPR). In addition, the POPP analysis of AGR2 (RAP-7) suggests its links to the ER folding machinery. More interestingly, we demonstrate that when AGR2 expression is attenuated using siRNA in Hela cells, the expression of EDEM1, a protein involved in ERAD, is significantly increased under non stressed conditions. These experiments suggested that AGR2 may be an ER localized protein, closely associated to the translocon and may function in ERAD regulation. To test this hypothesis, we used a well characterized ERAD substrate, the Null Hong Kong variant (NHK) of α 1-antitrypsin (α 1AT), a serine protease

inhibitor protein (29). α 1AT-NHK is a mutant protein presenting frame-shift at its carboxy-terminal region and is recognized as terminally misfolded by the ER quality control machinery, and subsequently targeted to ERAD for degradation (30). 35 S-Methionine pulse-chase experiment revealed the enhancement of α 1AT-NHK degradation upon siRNA-mediated attenuation of AGR2 expression, thus indicating the involvement of AGR2 in ERAD of α 1AT-NHK. RNAi of AGR2 did not affect the rates of cellular clearance and secretion into the medium of wild-type α 1AT, consequently indicating the selectivity of AGR2 for misfolded α 1AT. This observation was coherent with the altered expression of both OS-9 and XTP3-B in AGR2 knocked-down cells, these two lectins being specifically involved in glycoproteins ERAD. Our co-silencing approach demonstrates that AGR2 and EDEM1 functionally interact in α 1AT-NHK degradation process as they may participate to improving the quality control step. Based on the model proposed by Christianson et al. (31), it would be conceivable to add AGR2 to existing the ER luminal surveillance machinery. As no association was detected between endogenous AGR2 and calnexin using co-immunoprecipitation (data not shown), we may postulate that AGR2 could associate to nascent chains as emerging from the translocon, most likely in a glycan independent manner, and carry them to the EDEM1 dependent checkpoint when misfolded (**Figure 7C**).

A previous report using germline and inducible *Agr2*^{-/-} mice demonstrated that AGR2 was involved in intestinal homeostasis and ER stress (25). In this study, the authors showed that BiP protein levels, XBP-1 spliced form, CHOP, PDIA33 and PERK mRNA expression were dramatically increased in germline *Agr2*^{-/-} small intestine. However, another study using germline *Agr2*^{-/-} mice (24) demonstrated that there was only modest evidence for activation of the ER stress response in this model. In our experimental system, siRNA-mediated knockdown of AGR2 induces a modest perturbation of the expression of ER stress

markers under basal conditions (XBP-1 mRNA splicing and EDEM1 expression). In addition, we observed only minor differences in the expression of UPR markers upon tunicamycin-induced ER stress. The differences observed in these three reports could be due to the cell line/model used, the kinetics of the experiments, and the capacity of the cells to adapt or compensate for AGR2 knockdown. Interestingly, the two recent studies using *Agr2*^{-/-} mice showed that AGR2 may play an essential role for *in vivo* production of the intestinal mucus protein mucin 2 (MUC2), a large cysteine-rich glycoprotein. Park et al., showed that AGR2 co-immunoprecipitated with MUC2 and that this association depended on a conserved cysteine residue in the AGR2 thioredoxin-like domain. However, our data suggest that AGR2 cysteine residue is not directly accessible to be engaged in a disulfide bond under an unbound configuration.

In our work, we demonstrate that in the absence of AGR2, ERAD of NHK, a terminally misfolded protein that also interacts with AGR2 (data not shown), is enhanced. This indicates that AGR2 is involved in the degradation of misfolded secretory proteins. We hypothesize that AGR2 might delay the degradation of such protein by engaging its free cysteine and consequently slowing down folding/misfolding and the subsequent recognition by the ERQC/ERAD machinery (**Figure 7C**). In the light of these results, the data presented by Park et al (24) may also indicate an accelerated ERAD, combined with other factors such as regulatory mechanisms taking place at the level of MUC2 expression and translation, and perhaps lack of misfolded MUC2 antibody recognition.

Relevance of AGR-2 functions to other diseases

Recently, numerous studies demonstrated the elevated expression of AGR2 in various human cancers including esophagus(32), prostate (33) (34, 35), pancreas (36) (37), lung (38), and breast (23) (39) (40) (21, 22), thus showing that it is a widely overexpressed protein in human carcinomas. AGR2 has also been

proposed as a novel putative metastasis marker in breast, prostate and colorectal cancers and it can be detected in the blood of ovarian cancer patients (41) (22) (21, 42). Furthermore, *in vivo* and *in vitro* studies in cancer model systems revealed that overexpression or suppression of AGR2 can affect cell proliferation, adhesion and migration, metastasis and tumor growth (36, 43). The molecular mechanisms at the origin of these phenotypes are not yet clearly understood. However, our work might therefore provide indications on how AGR2 expression could correlate with, and impact on cancer phenotypes. As shown for other ER resident proteins (44), increased AGR2 expression, as a member of the PDI chaperone family involved in ER quality control, could be predicted to enhance ER folding capacity and allow cancer cells to cope with increased protein production and secretion, participating in cancer aggressiveness. This phenomenon correlates with the observed increased mucin secretion observed in the above cancers, and reflects a potential role of AGR2 and more extensively of ER folding in the development and progression of cancers.

Materials and Methods

Antibodies, cell lines and reagents - Antibodies to calnexin and gp25L were described previously (16), anti-UDP-Glucose Glucosyl-transferase, anti-ERp72 and anti-calreticulin were from Stressgen (Assay Design Inc., Ann Arbor, Michigan, USA), anti-Shc was kindly provided by John Bergeron (McGill University, Montreal, Canada), anti-ribophorin-I and anti Trap-alpha were kindly provided by Dr Kreibich (NYU, NY, USA), anti-ORP150 was a kind gift from Dr Ozawa (Kanazawa University, Japan), anti Sec61 antibodies were kindly provided by Dr Nicchitta (Duke university Medical Centre, USA). Anti JNK and anti ERK-1 were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA; sc-571, sc-93 respectively). Anti phospho-JNK (thr183/tyr185) and anti-eiF2 α were from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). Anti AAT was from DAKO (Glostrup,

Denmark) and anti phospho-eIF2 α was from Invitrogen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). AGR2 monoclonal antibody was from Abnova (Abnova Corporation, Taiwan). ER stress inducers, including tunicamycin, and DTT were obtained from Calbiochem (EMD Biosciences Inc., Darmstadt, Germany) and Sigma respectively. COS-7, HEK 293-T, HeLa, HuH6, HuH7 and HepG2 cells lines were cultured in DMEM supplemental with 10% fetal bovine serum and antibiotics in a 37°C incubator containing 5% CO₂.

Preparation of ribosome-associated ER proteins and immunoblot analyses

Dog pancreatic microsomes were prepared as described previously (16). Ribosome-associated ER proteins (RAP) were purified as previously reported (16) except that the CHAPS concentration was kept at 1.5% in the 1.5M sucrose cushion. For MS analyses, 4 different preparations were used and the RAP fraction isolated from 500 μ g of total ER proteins was analysed. Total ER microsomes (20 μ g) and RAP fraction (purified from 200 μ g of total ER microsomes) were separated by SDS-PAGE prior to transferring onto nitrocellulose membrane. Membranes were blocked for 45 min at room temperature with PBS containing 5% skim milk and 0.1% tween20, followed by incubation overnight at 4°C with the indicated primary antibodies. Proteins were detected using the appropriate secondary antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP; Dako, Glostrup, Denmark). Blots were revealed using the Chemiluminescent substrate system (ECL reagent, KPL).

Mass spectrometry analyses - Following resolution of the RAP fraction by 1D PAGE, and Coomassie R-250 staining, each band was excised, dehydrated in acetonitrile and washed by two cycles of 10 min in 100mM (NH₄)₂CO₃ before the addition of an equal volume of acetonitrile. The destained gel slices were then treated for 30 min with 10mM dithiothreitol to reduce cystinyl residues and for 20 min with 55 mM iodoacetamide to effect

alkylation. After an additional round of (NH₄)₂CO₃ and acetonitrile washes, the slices were extracted with acetonitrile at 37°C. they were then incubated with trypsin (6ng/ μ l in 50mM NH₄CO₃) for 5h at 37°C and the peptides were first extracted in 1% formic acid / 2% acetonitrile followed by two further extractions with additions of acetonitrile. All treatments were performed robotically using a MassPrep Worstation (MicroMass-Waters, Milford, MA, USA). Extracted peptides were applied to a reverse phase guard column and then eluted in-line on a 10 cm by 75 μ m PicoFrit column filled with BioBasic C18. Samples were eluted with a linear gradient of 5-70% acetonitrile / 0.1% formic acid. A 2,000-V charge was applied to the PicoFrit column such that the eluted peptides were electrosprayed into a cap liquid chromatography quadrupole time of flight MS (MicroMass-Waters, Milford, MA, USA). When doubly or triply charged ions were detected, the quadrupole was used to select the precursor ion, which was passed into a collision cell where fragmentation was induced by collision with argon gas. For peptide matching analyses, a definition of the Mascot score can be found online at <http://www.matrix-science.com>.

Complementary DNA cloning and plasmid construction - RAP cDNA PCR amplification products were inserted in pDONR201 by BP recombination (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The resulting ORF clones were transferred by LR recombination in Gateway® compatible destination vectors (pdEYFP) (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). All constructs were analysed by DNA sequencing.

Cell imaging analyses - Human embryonic kidney 293T (HEK 293) cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT, USA) and antibiotics and maintained at an atmosphere of 5% CO₂. For transfection, HEK 293 cells were plated 24h prior to transfection onto ionized glass coverslips to achieve 80% confluency. Each EYFP fusion plasmid (pdEYFP vector) (0.8 μ g) and a CFP-300 ER control

construct (a kind gift from Dr J. Simpson, UCD, Dublin) were co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The cells were cultured for a further 24h prior to be fixed in 4% para-formaldehyde. Next the cells were imaged by confocal microscopy as described previously (45). HuH6 cells were grown in 24-wells plates, fixed with 3.7% formaldehyde for 10 minutes, permeabilized with 0.1% Triton-X 100 for 5 minutes, incubated with anti-AGR2 or anti-Calnexin antibodies for 1 hour at room temperature followed by incubation with anti-rabbit or anti-mouse conjugated antibodies. Protein immuno-localization was carried out either using epifluorescence microscopy - with a Zeiss 63x 1.4 oil immersion objective, recorded with a digital camera (DVC) and analyzed with Northern Eclipse software (Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada), or confocal microscopy with a LEICA SP5 confocal microscope.

RNA isolation, reverse-transcriptase polymerase reaction, semi-quantitative RT-PCR and qPCR - Total RNA was prepared using the Trizol reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Semi-quantitative analyses were carried out as previously described (46). The primers used are listed in Supplementary Table 3. The PCR products were separated by 1-3% agarose gels. For real-time quantitative PCR, all reactions were performed with a Stratagene X4000 thermocycler (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) and the SYBR Green PCR Core reagents kit (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). The primers used are listed in Supplementary Table 3. Each sample was normalized using GAPDH mRNA expression as reference.

Small interference RNA - SiRNA against AGR2 was designed using Greg Hannon's webtool (<http://katahdin.cshl.org:9331/homepage/siRNA/RNAi.cgi?type=siRNA>). All others siRNA used in this study are listed in Supplementary table 2. Cells were

transfected by using the siRNAi Max Lipofectamine reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

³⁵S-Methionine Metabolic labelling and pulse-chase experiments - For metabolic radio-labelling, HeLa cells were pre-incubated for 120 min in methionine/cysteine-free medium (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), followed by a 15 min metabolic pulse-radiolabeling with ³⁵S-EXPRESS protein labelling mixture (Perkin Elmer, Life and Analytical Sciences Inc., Wellesley, MA, USA) and then chased for various times in normal DMEM/10% fetal bovine serum containing an excess of non-radio-labelled methionine/cysteine. At the end of the chase period the cells were placed on ice and the media collected. Cells were lysed in 2% CHAPS (Calbiochem, EMD Biosciences Inc., Darmstadt, Germany). Supernatants were recovered following centrifugation at 13000 rpm for 15 min at 4°C and incubated over night at 4°C with rabbit polyclonal antibody to AAT (DAKO, Glostrup, Denmark). Protein A sepharose beads were added for 45 min at 4°C with rotation, pelleted and then washed five times with lysis buffer containing 0.5% CHAPS. Beads were resuspended in Laemmli sample buffer. Metabolically radio-labelled proteins were resolved on 10% SDS-polyacrylamide gels, processed for fluorography, dried and exposed to autoradiography film. Bands on the radioautograms were quantified by scanning densitometry.

Statistical analyses - Data are presented as mean ± SD. Statistical significance (p<0.05 or less) was determined using Student's t test, two tailed distribution, assuming equal variance for the samples.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Inserm (Avenir) and Institut National du Cancer (INCa) to EC. FD and mass spectrometry sequencing were supported in part by an operating grant from Genome Quebec/Canada to the Montreal Proteomics Network – the Cell Map

Project. AM was supported by a PhD scholarship from the French government.

References

1. Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000;101(5):451-454.
2. Chevet E, Cameron PH, Pelletier MF, Thomas DY, Bergeron JJ. The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation. *Curr Opin Struct Biol* 2001;11(1):120-124.
3. Kleizen B, Braakman I. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 2004;16(4):343-349.
4. Ruddock LW, Molinari M. N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* 2006;119(Pt 21):4373-4380.
5. Maattanen P, Gehring K, Bergeron JJ, Thomas DY. Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins. *Semin Cell Dev Biol*.
6. Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(12):944-957.
7. Walter P, Gilmore R, Blobel G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 1984;38(1):5-8.
8. Deshaies RJ, Sanders SL, Feldheim DA, Schekman R. Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 1991;349(6312):806-808.
9. Deshaies RJ, Schekman R. A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1987;105(2):633-645.
10. Beckmann R, Spahn CM, Frank J, Blobel G. The active 80S ribosome-Sec61 complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2001;66:543-554.
11. Beckmann R, Spahn CM, Eswar N, Hermers J, Penczek PA, Sali A, Frank J, Blobel G. Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* 2001;107(3):361-372.
12. Johnson AE, van Waes MA. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:799-842.
13. Kalies KU, Gorlich D, Rapoport TA. Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol* 1994;126(4):925-934.
14. Dejgaard K, Theberge JF, Heath-Engel H, Chevet E, Tremblay ML, Thomas DY. Organization of the Sec61 translocon, studied by high resolution native electrophoresis. *J Proteome Res*;9(4):1763-1771.
15. Hartmann E, Gorlich D, Kostka S, Otto A, Kraft R, Knäspel S, Burger E, Rapoport TA, Prehn S. A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem* 1993;214(2):375-381.
16. Chevet E, Wong HN, Gerber D, Cochet C, Fazel A, Cameron PH, Gushue JN, Thomas DY, Bergeron JJ. Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes. *Embo J* 1999;18(13):3655-3666.
17. Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 2001;305(3):567-580.
18. Hooper SD, Bork P. Medusa: a simple tool for interaction graph analysis. *Bioinformatics* 2005;21(24):4432-4433.
19. Wise MJ. The POPPs: clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics* 2002;18 Suppl 1:S38-45.
20. Wise MJ, Tunnacliffe A. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci* 2004;9(1):13-17.
21. Thompson DA, Weigel RJ. hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251(1):111-116.
22. Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R. Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with

- breast carcinomas. *Cancer Res* 2005;65(9):3796-3805.
23. Fritzsche FR, Dahl E, Pahl S, Burkhardt M, Luo J, Mayordomo E, Gansukh T, Dankof A, Knuechel R, Denkert C, Winzer KJ, Dietel M, Kristiansen G. Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(6):1728-1734.
 24. Park SW, Zhen G, Verhaeghe C, Nakagami Y, Nguyenvu LT, Barczak AJ, Killeen N, Erle DJ. The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(17):6950-6955.
 25. Zhao F, Edwards R, Dizon D, Afrasiabi K, Mastroianni JR, Geyfman M, Ouellette AJ, Andersen B, Lipkin SM. Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*^{-/-} mice. *Dev Biol*;338(2):270-279.
 26. Bates PA, Kelley LA, MacCallum RM, Sternberg MJ. Enhancement of protein modeling by human intervention in applying the automatic programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins* 2001;Suppl 5:39-46.
 27. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* 2004;25(13):1605-1612.
 28. Cameron PH, Chevet E, Pluquet O, Thomas DY, Bergeron JJ. Calnexin phosphorylation attenuates the release of partially misfolded alpha1-antitrypsin to the secretory pathway. *J Biol Chem* 2009;284(50):34570-34579.
 29. Sifers RN, Brashears-Macatee S, Kidd VJ, Muensch H, Woo SL. A frameshift mutation results in a truncated alpha 1-antitrypsin that is retained within the rough endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1988;263(15):7330-7335.
 30. Liu Y, Choudhury P, Cabral CM, Sifers RN. Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J Biol Chem* 1999;274(9):5861-5867.
 31. Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol* 2008;10(3):272-282.
 32. Hao Y, Triadafilopoulos G, Sahbaie P, Young HS, Omary MB, Lowe AW. Gene expression profiling reveals stromal genes expressed in common between Barrett's esophagus and adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2006;131(3):925-933.
 33. Kristiansen G, Pilarsky C, Wissmann C, Kaiser S, Bruemmendorf T, Roepcke S, Dahl E, Hinzmann B, Specht T, Pervan J, Stephan C, Loening S, Dietel M, Rosenthal A. Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival. *J Pathol* 2005;205(3):359-376.
 34. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, Berriz GF, Gibbons FD, Dreze M, Ayivi-Guedehoussou N, Klitgord N, Simon C, Boxem M, Milstein S, Rosenberg J, *et al.* Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature* 2005;437(7062):1173-1178.
 35. Zhang Y, Forootan SS, Liu D, Barraclough R, Foster CS, Rudland PS, Ke Y. Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007;10(3):293-300.
 36. Ramachandran V, Arumugam T, Wang H, Logsdon CD. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. *Cancer Res* 2008;68(19):7811-7818.
 37. Missiaglia E, Blaveri E, Terris B, Wang YH, Costello E, Neoptolemos JP, Crnogorac-Jurcevic T, Lemoine NR. Analysis of gene expression in cancer cell lines identifies candidate markers for pancreatic tumorigenesis and metastasis. *Int J Cancer* 2004;112(1):100-112.
 38. Zhu H, Lam DC, Han KC, Tin VP, Suen WS, Wang E, Lam WK, Cai WW, Chung LP, Wong MP. High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumour genes in lung cancer cell lines. *Cancer Lett* 2006.
 39. Innes HE, Liu D, Barraclough R, Davies MP, O'Neill PA, Platt-Higgins A, de

- Silva Rudland S, Sibson DR, Rudland PS. Significance of the metastasis-inducing protein AGR2 for outcome in hormonally treated breast cancer patients. *Br J Cancer* 2006;94(7):1057-1065.
40. Zweitzig DR, Smirnov DA, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM, Moran E. Physiological stress induces the metastasis marker AGR2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2007;306(1-2):255-260.
41. Fletcher GC, Patel S, Tyson K, Adam PJ, Schenker M, Loader JA, Daviet L, Legrain P, Parekh R, Harris AL, Terrett JA. hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan. *Br J Cancer* 2003;88(4):579-585.
42. Smirnov DA, Zweitzig DR, Foulk BW, Miller MC, Doyle GV, Pienta KJ, Meropol NJ, Weiner LM, Cohen SJ, Moreno JG, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res* 2005;65(12):4993-4997.
43. Wang Z, Hao Y, Lowe AW. The adenocarcinoma-associated antigen, AGR2, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation. *Cancer Res* 2008;68(2):492-497.
44. Moenner M, Pluquet O, Bouchecareilh M, Chevet E. Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer. *Cancer Res* 2007;67(22):10631-10634.
45. Jenna S, Caruso ME, Emadali A, Nguyen DT, Dominguez M, Li S, Roy R, Reboul J, Vidal M, Tzimas GN, Bosse R, Chevet E. Regulation of membrane trafficking by a novel Cdc42-related protein in *Caenorhabditis elegans* epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2005;16(4):1629-1639.
46. Nguyen DT, Kebache S, Fazel A, Wong HN, Jenna S, Emadali A, Lee EH, Bergeron JJ, Kaufman RJ, Larose L, Chevet E. Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 2004;15(9):4248-4260.

Figure Legends

Figure 1: Isolation of Ribosome-Associated ER Proteins (RAP). **A)** Representative Coomassie blue stained gel of rough ER microsome fractions: total rough ER microsomes solubilized (TOT, 50µg) and RAP (corresponding to 500µg of starting rough ER microsomes). Each individual stained band was excised and trypsin digested before mass spectrometry sequencing. Results are the representative of four independent experiments. **B)** Distribution of functional groups of proteins identified in the Ribosome-Associated Proteins (RAP) fractions. **C)** Distribution of functional groups of proteins identified in the Ribosome-Associated Membrane Protein fraction. **D)** Validation of the proteins found in the RAP fraction: total rough ER microsomes solubilized (20µg) and RAP fraction (from 200µg total rough ER microsomes solubilized) were resolved by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose prior to immunoblot analysis using the indicated antibodies. Ib, immunoblot. Results are representative of three independent experiments.

Figure 2: Characterization of AGR2. **A)** Amino-acid sequence alignment of AGR2 with two members of the PDI super-family ERp19 and ERp29 (GenBank Accession #: NM 006408; NM015913; NM006817 respectively). Amino-acid sequence comparison was performed using the clustalW algorithm. Vertical alignments between the sequences for identical and similar amino-acids are highlighted in different colors. Gaps were introduced as represented by dots to optimize the alignment. Green boxes indicate the signal peptide, red boxes indicate thioredoxin-like domains and yellow boxes indicate putative ER retrieval motifs. **B)** Comparison of a predicted model for AGR2 structure version 1SEN (the structure determined for ERp19). **C)** Superposition of the hydropobicity surface on the predicted structure for AGR2. **D)** Validation by immunoblot analysis of AGR2 in the RAP fraction as it is

described in Figure 2C. **E)** Evaluation of the presence of AGR2 in ribosomal pellet in condition where the ribosome pull down was carried out under control conditions (top blot), in the presence of 5mM EDTA (middle blot) or following puromycin treatment (bottom blot). **F)** Confocal microscopy analysis of endogenous AGR2 immuno-localization: HuH6 (top panels) and HuH7 (bottom panels) cells were double labelled using anti-AGR2 monoclonal antibodies (middle panel) and anti calnexin anti-serum as ER marker (CNX, left panel). A merge image is shown on the right panel.

Figure 3: AGR2 expression is controlled by the UPR in mammalian cells. RT-PCR analysis of AGR2 and GAPDH mRNA expression. **A)** In HeLa cells untreated (0) and treated for 8h and 16h using two ER stressors: tunicamycin (5µg/mL) and DTT (1mM). **B)** In HepG2 cells transfected with a siRNA ctl (GL2) (si Ctl) or a siRNA directed towards IRE1, ATF6 or PERK (siIRE1, siATF6, siPERK respectively) untreated (-) or treated (+) for 8h with tunicamycin (5µg/mL). **C)** Quantitation of the data presented in B. Three independent experiments were quantified and data are presented as means $\pm$ SD. **D)** In HepG2 control cells (HepG2 Ctl) or in HepG2 expressing a dominant negative IRE1 (HepG2 DN IRE1) untreated (0) or treated for 8h or 16h with tunicamycin (5µg/mL). The results are representative of 3 independent experiments.

Figure 4: AGR2 knock-down affects the ER stress response. **A)** RTPCR analysis of AGR2 mRNA expression and **B)** immunoblot analysis of AGR2 protein expression in HeLa cells, 72h after transfection using a control siRNA (GL2) or a siRNA directed towards AGR2. GAPDH mRNA expression was used as internal control for RTPCR analysis and ERK1/2 was used as a protein loading control for immunoblot analysis. **Ib** = immunoblot **C)** HeLa cells transfected with GL2 or AGR2 siRNA were incubated, 72h after transfection, with tunicamycin 5µg/mL for the indicated periods of time. Cells

extracts were directly immunoblotted using anti phospho-eIF2 α then eIF2 α antibodies. The blot is representative of three independent experiments. **D).** HeLa cells transfected with GL2 (control, black bars) or AGR2 (grey bars) siRNA were incubated, 72h after transfection, with tunicamycin 5µg/mL for the indicated periods of time. Total RNA extracted was subjected to semi-quantitative RTPCR analysis using primers for CHOP, GADD34 and **E)** to real-time PCR analysis using primers for ERO1L β and HERPUD. Quantification of mRNA expression was performed using three independent experiments relative to GAPDH mRNA levels. All values are mean $\pm$ SD. Statistical significance was determined using the Student's t-test.

Figure 5: AGR2 knock-down perturbs IRE1 signalling and impacts on the expression of ERAD components. **A)** Immunoblot analysis of AGR2 protein expression levels 72h after transfection in control HeLa cells (siGL2) or HeLa cells silenced for AGR2 (siAGR2) (top panel). ERK1/2 is used as protein loading control. Time course analysis of JNK phosphorylation in control HeLa cells (siGL2) or HeLa cells silenced for AGR2 (siAGR2) and treated 72h after transfection with tunicamycin (5µg/mL) for the indicated periods of time. **B)** RTPCR analysis of XBP-1 splicing (top panel) and quantification of three independent experiments (bottom panel). **C)** RT-PCR analysis of EDEM1 mRNA expression and qRT-PCR analysis of ERdj4. **D)** qRT-PCR analysis of OS-9, XTP3-B, HRD1, SEL1L and Derlin-1 mRNA in HeLa control cells (siGL2, black bars) or HeLa cells silenced for AGR2 (grey bars) and treated, 72h after transfection, with tunicamycin (5µg/mL) for the indicated periods of time (0, 8 and 16h). The quantification of mRNA expression of three independent experiments is shown and represented as histograms. All values are mean $\pm$ SD. GAPDH mRNA expression was used as internal control. Statistical significance was determined using the Student's t-test.

Figure 6: AGR2 regulates the degradation of terminally misfolded

Alpha-1 antitrypsin (α 1AT) null Hong-Kong mutant. Control HeLa cells (si ctrl (GL2)) or HeLa cells silenced for AGR2 (siAGR2) were transiently transfected with a plasmid to express α 1AT-NHK or α 1AT-WT, then pulse labelled for 15 min with ^{35}S methionine/cysteine, and then chased for the period indicated as it is described in material and methods. **A)** Immunoblot analysis of AGR2, α 1AT (NHK or WT) and Calnexin (CNX), used as a loading control. **B)** Co-immunoprecipitation of α 1AT and AGR2 in HeLa cells non transfected, transfected with pCDNA6-AGR2 cDNA, or co-transfected with pCDNA6-AGR2 and pcDNA3- α 1AT or pRap9- α 1AT-NHK cDNAs. Cell lysates were immunoprecipitated using anti- α 1AT antibodies and the immunoprecipitates immunoblotted using anti-AGR2 antibodies. **C)** Radioautograms of newly synthesized ^{35}S -methionine radiolabelled intracellular and secreted α 1AT-WT and α 1AT-NHK immunoprecipitated from HeLa cells lysates from cells subjected to siRNA with irrelevant siRNA (siCTL, GL2) or against AGR2 (siAGR2). **D)** Quantification of C) Representative data from one out of three independent experiments are plotted as a percentage of α 1AT at zero time for intracellular proteins and of maximal amount for secreted proteins, respectively. **E)** Quantification of the impact AGR2 knock-down on intracellular α 1AT (wild-type and NHK) half-life. Data are represented as percentage of α 1AT (wild-type and NHK) $t_{1/2}$ in control cells.

OS9 or combinations of these siRNA. **C)** Schematic representation of the function of AGR2 near the translocon and in the ER quality control/ERAD machinery.

Figure 7: The genetic interaction between AGR2 and EDEM1 regulates the degradation of α 1AT-NHK mutant.

A) Effects of siRNA against AGR2, EDEM1, XTP-3B and OS9 on the expression of their respective target mRNAs as monitored by RT-PCR, agarose gel electrophoresis and fluorography. Experiments were carried out in triplicate, a representative image is shown. **B)** Percentage of newly synthesized ^{35}S -methionine radiolabelled α 1AT-NHK remaining intracellularly following 6h of chase compared to zero time in HeLa cells transfected with siRNA against GL2, AGR2, EDEM1, XTP-3B,

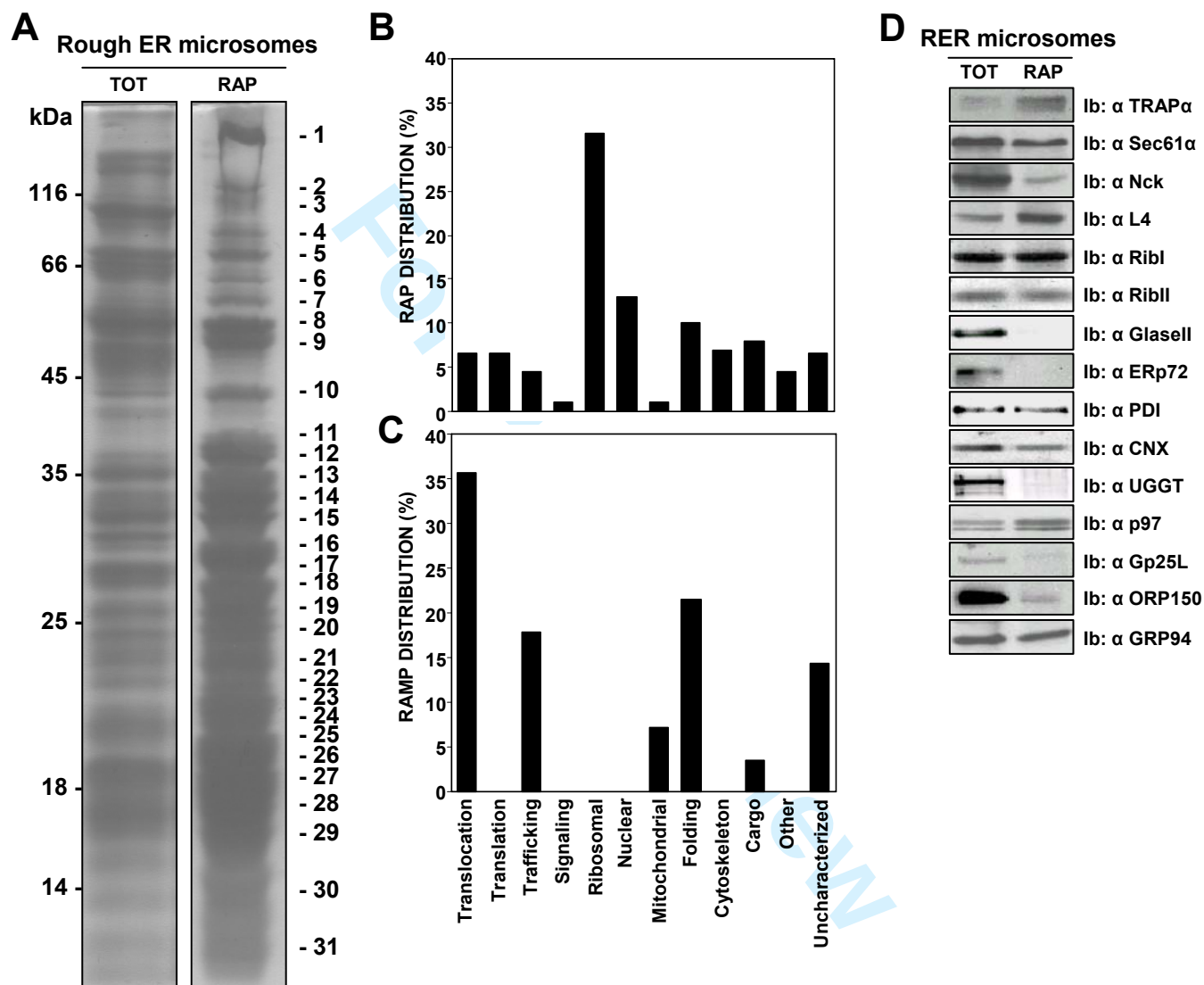


Figure 1

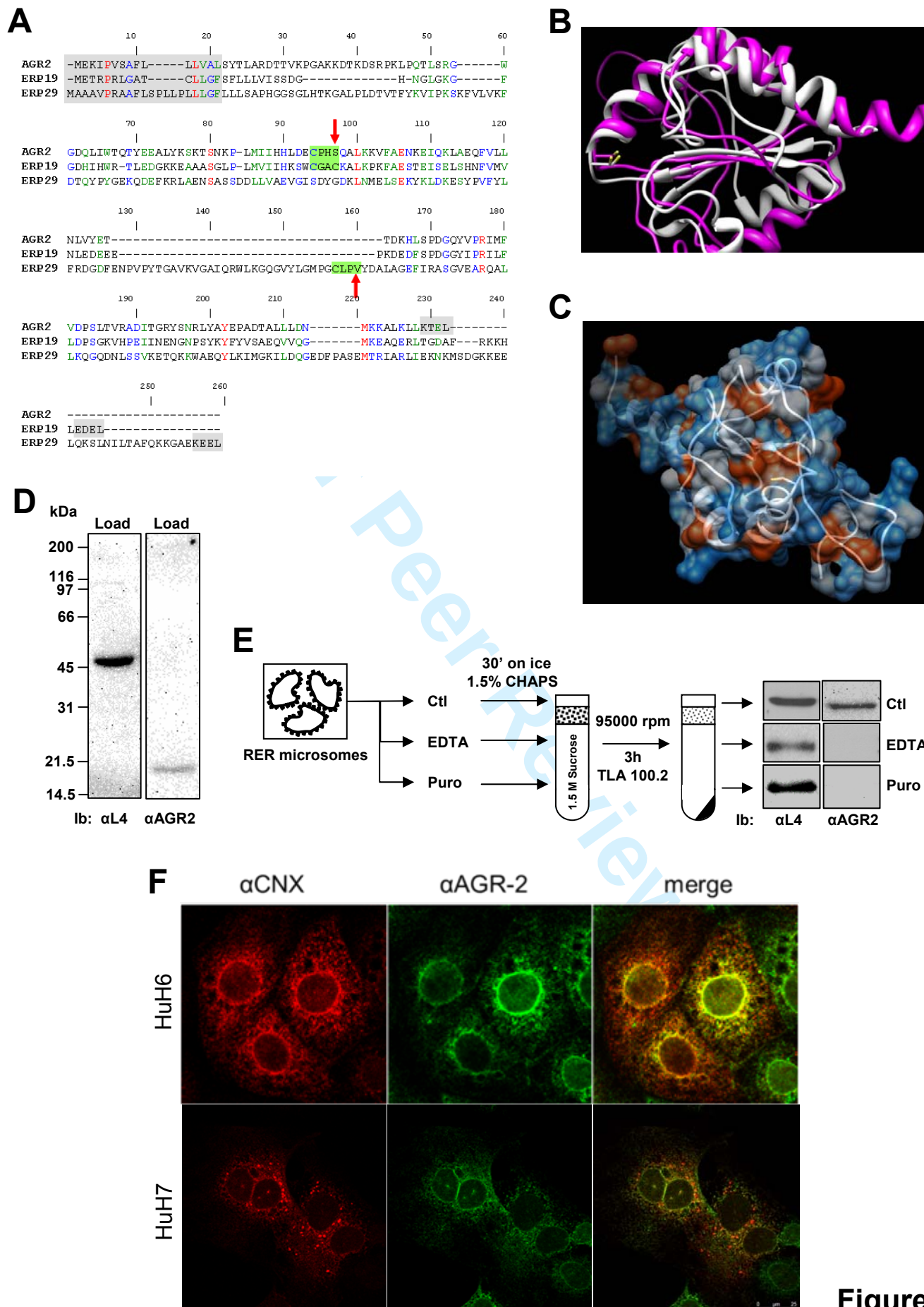


Figure 2

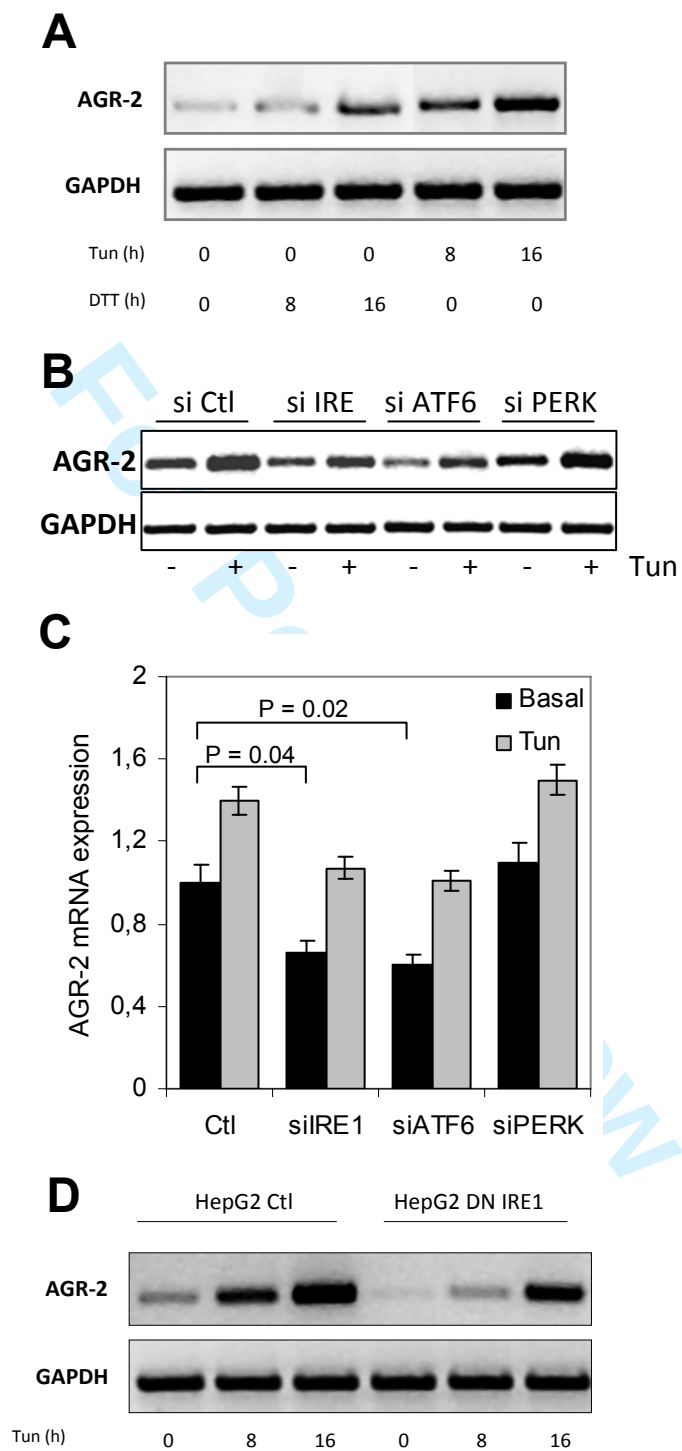


Figure 3

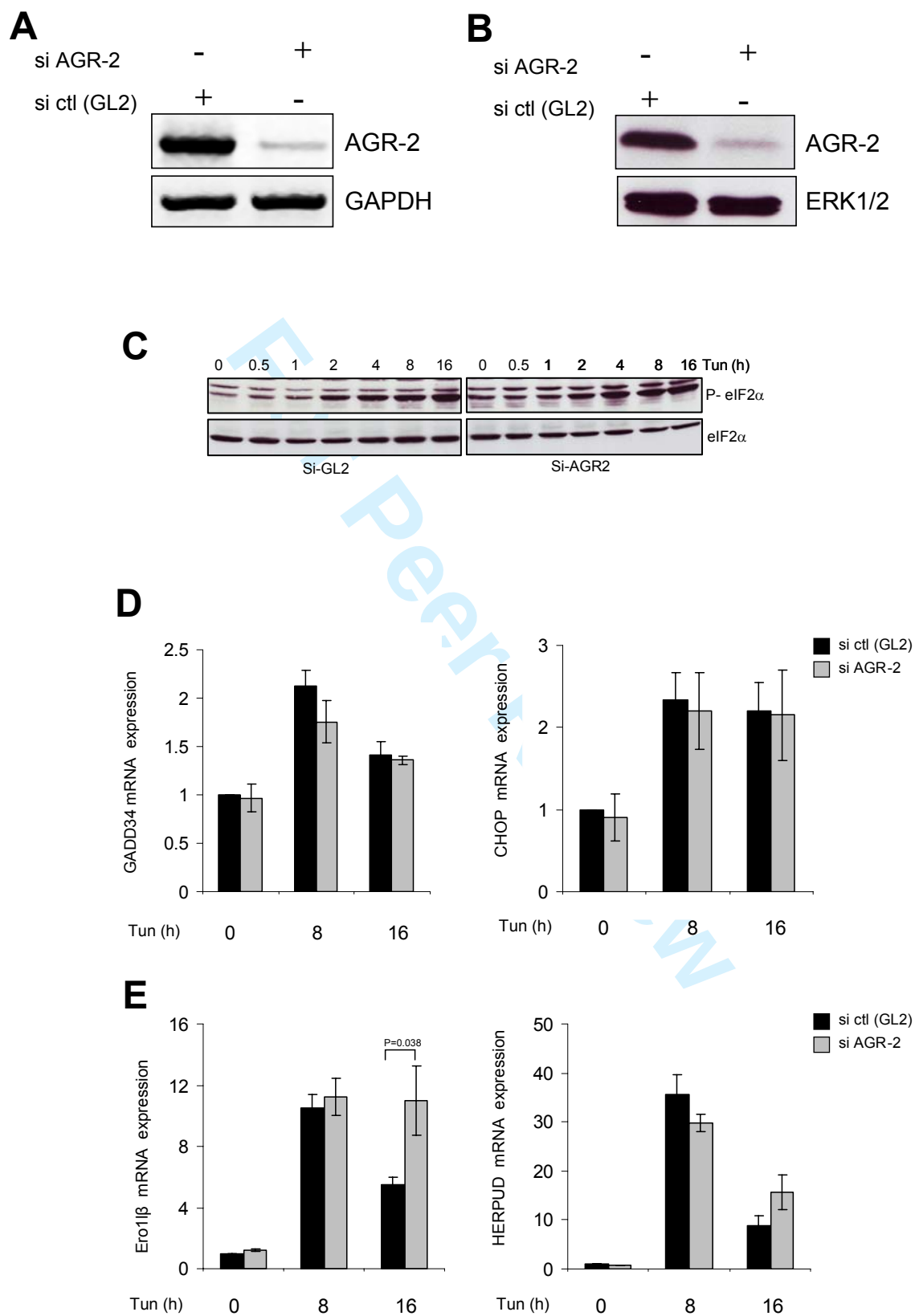
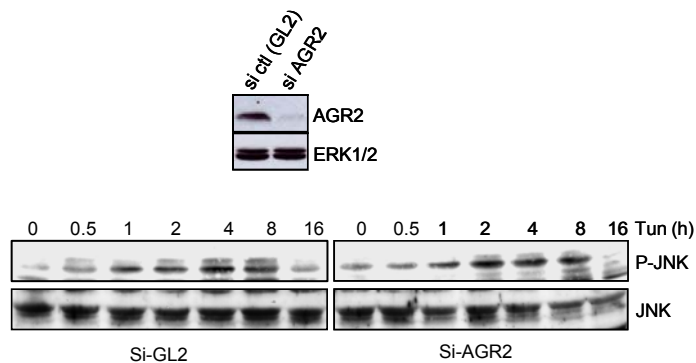
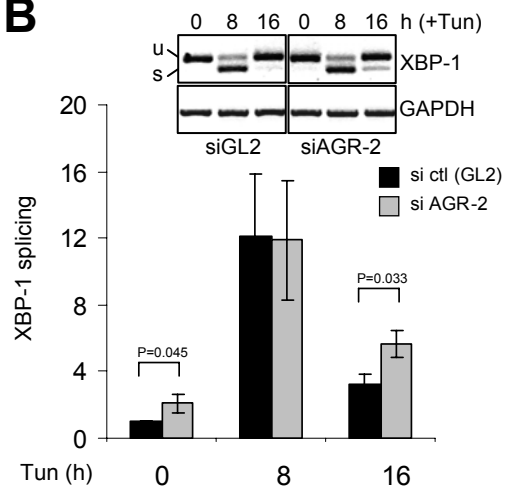
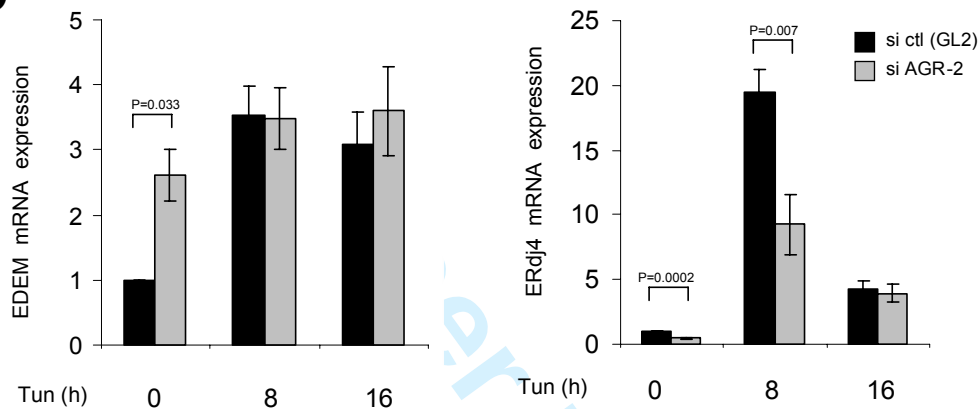
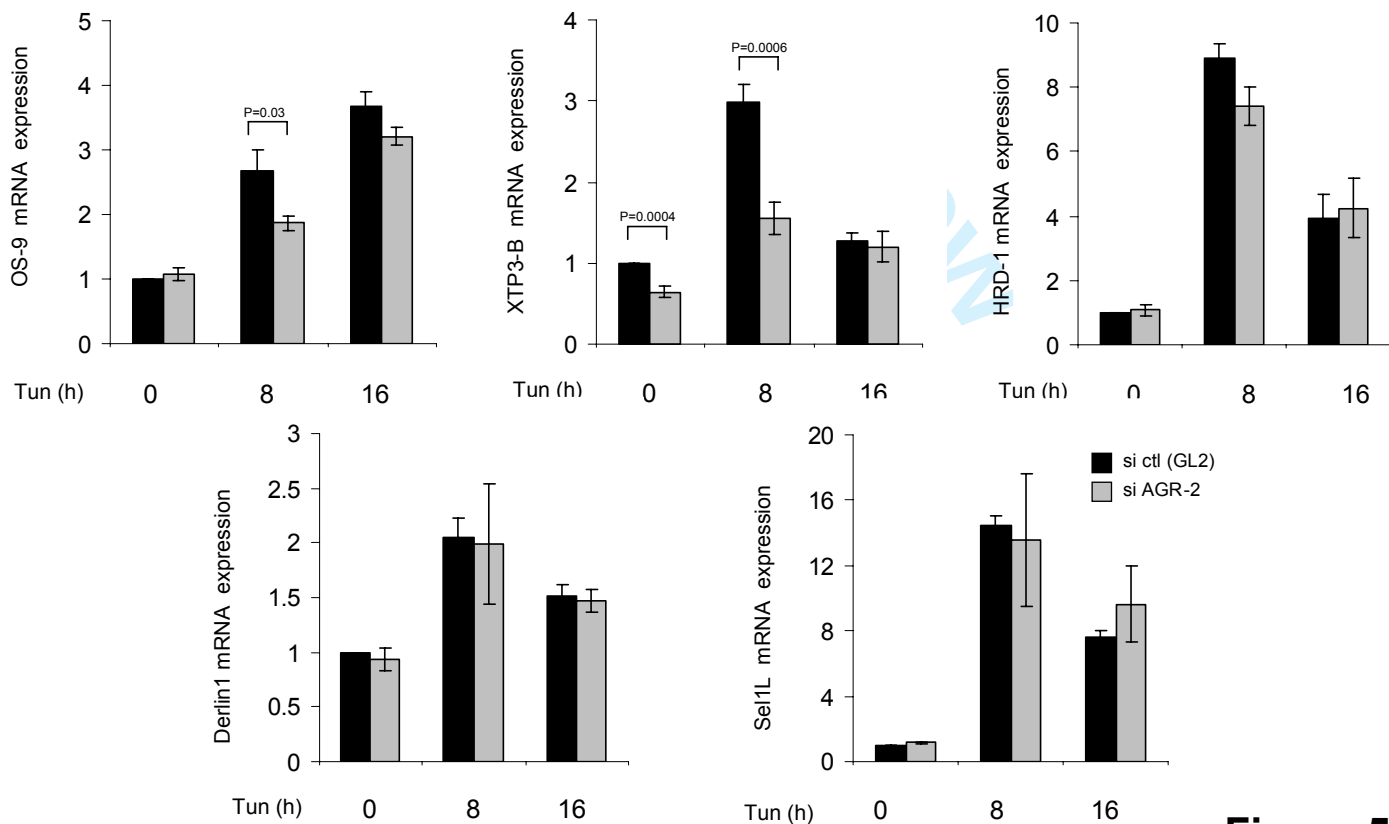


Figure 4

A**B****C****D****Figure 5**

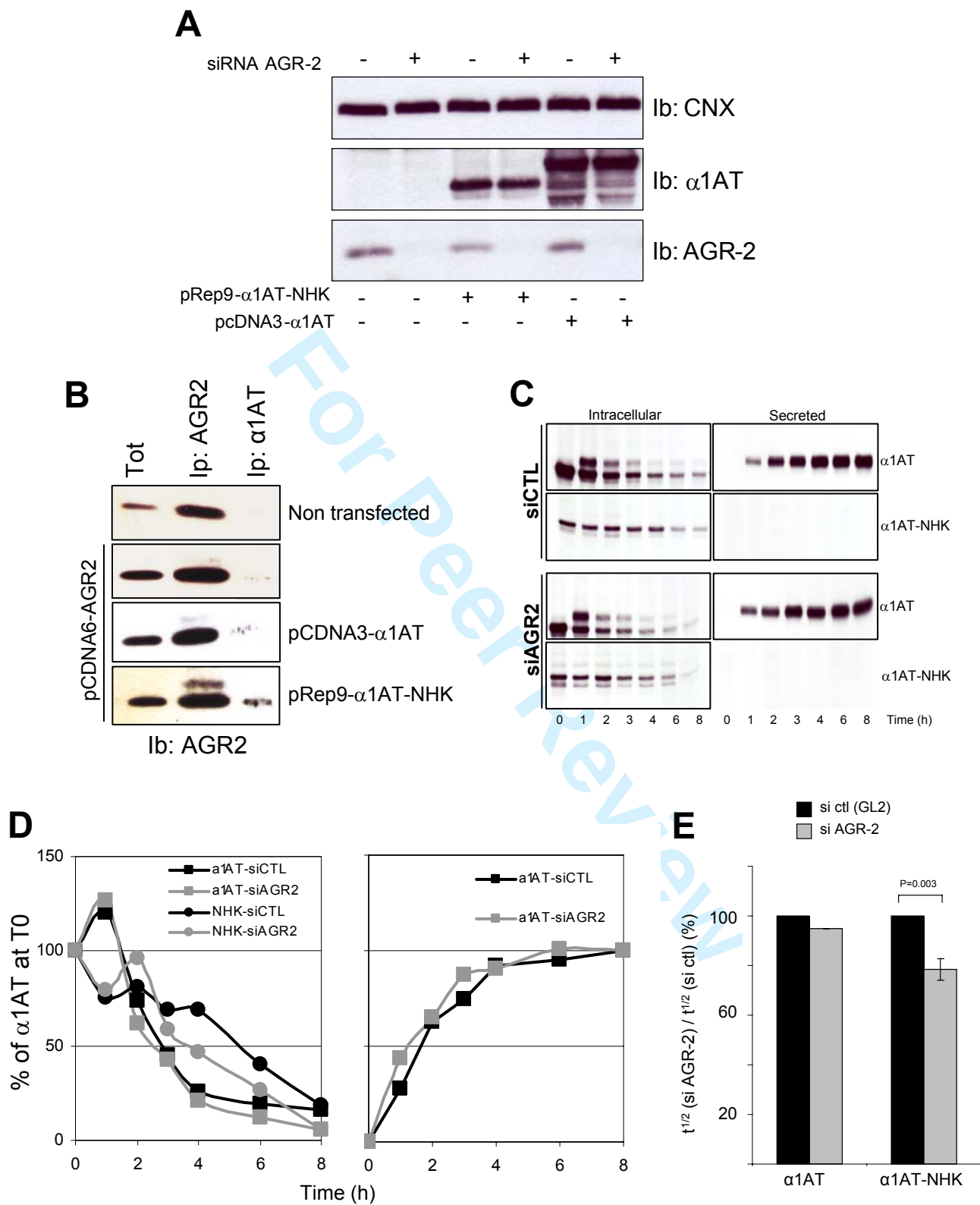


Figure 6

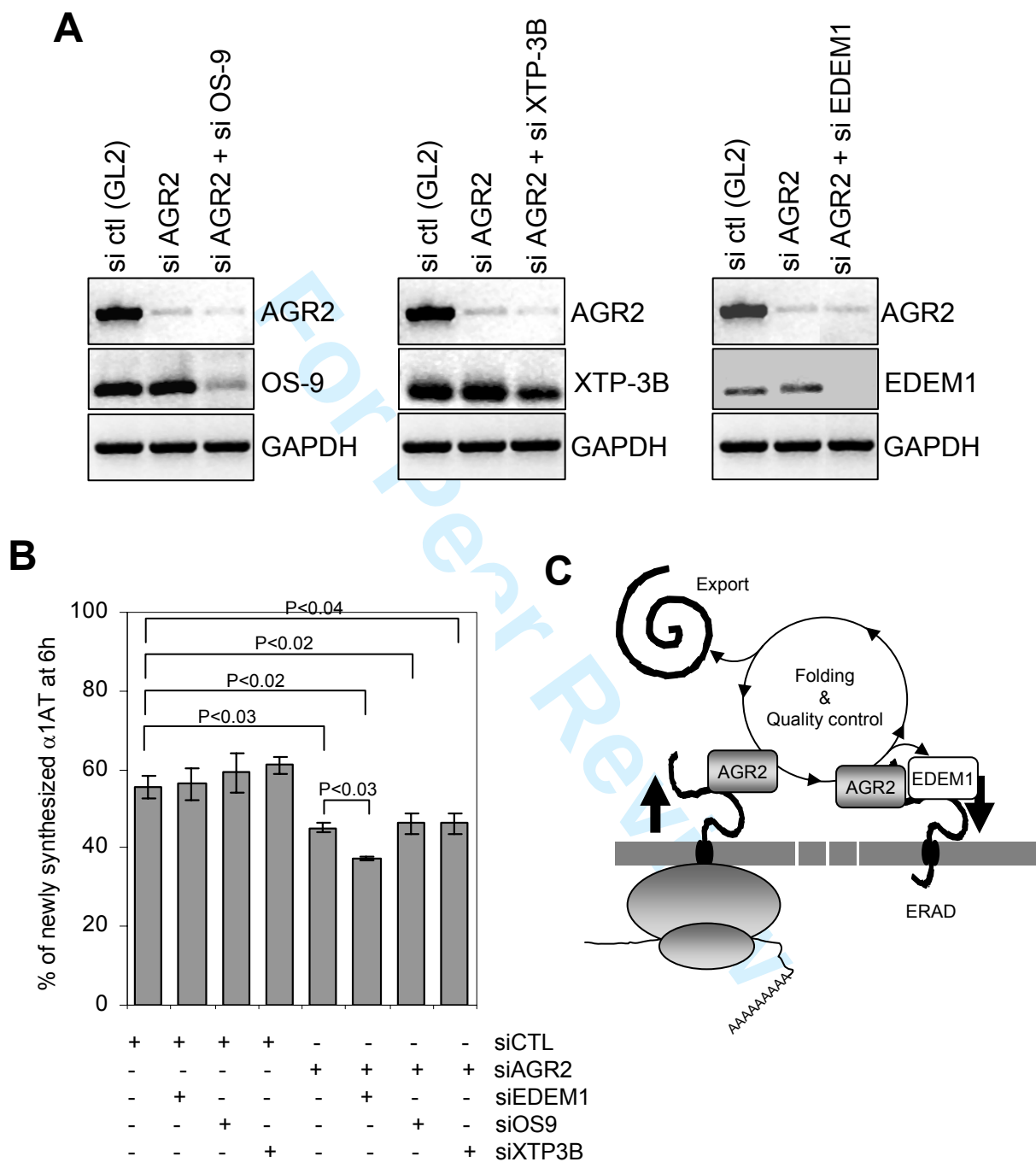


Figure 7

Mulot et al., Supplementary Material

TABLE S1

Function	GI	Description	Loc	TM	Score	Unique	Distinct	Total	N
Translocation	5803165	Protein transport protein SEC61 beta subunit [Homo sapiens]	ER	y	38	1	1	2	2
Translocation	585957	Protein transport protein Sec61 alpha subunit isoform 1 (Sec61 alpha-1)	ER	y	94	2	2	4	3
Translocation	23822071	Ribosome binding protein 1 (180 kDa ribosome receptor)	ER	y	259	5	5	4	3
Translocation	6005872	SEC63, ER translocon component (S. cerevisiae) like [Homo sapiens]	ER	y	36	1	1	2	2
Translocation	88606	signal recognition particle 19K protein - human	Cyt	n	75	1	1	2	2
Translocation	134889	Signal recognition particle 68 kDa protein (SRP68)	ER	n	160	3	3	4	3
Translocation	464806	SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 72 KD PROTEIN (SRP72)	Cyt	n	98	2	2	4	2
Translocation	997	signal recognition particle receptor [Canis sp.]	ER	y	142	2	2	3	2
Translocation	6394364	signal sequence receptor, delta [Rattus norvegicus]	ER	y	102	2	2	4	3
Translocation	401208	Translocation associated membrane protein 1	ER	y	36	1	1	2	2
Translocation	1673433	translocon-associated protein delta subunit precursor [Homo sapiens]	ER	y	149	2	2	4	3
Translocation	134930	TRANSLOCON-ASSOCIATED PROTEIN, ALPHA SUBUNIT PRECURSOR	ER	y	100	1	1	2	2
Translocation	13592091	TRAP-complex gamma subunit [Rattus norvegicus]	ER	y	80	1	1	3	2
Translation	468209	18 kDa Alu RNA binding protein	Cyt	n	71	1	1	1	2
		HSPC025 and HSPC021 (similar to C. elegans FAT-3 alcohol dehydrogenase)							
Translation	6572248	[Homo sapiens]	Cyt	n	71	1	1	1	2
Translation	15805031	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 2 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	84	2	2	2	2
Translation	4503483	eukaryotic translation elongation factor 2 [Homo sapiens]	Cyt	n	1812	2	27	41	4
Translation	4885409	high density lipoprotein binding protein; vitellin [Homo sapiens]	Cyt	n	1356	2	19	23	4
Translation	18041977	hypothetical RNA binding protein RDA288 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	74	1	1	2	2
Translation	124231	IF5A_RABIT Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) (eIF-4D)	Cyt	n	87	1	1	1	2
Translation	4503521	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 (48kD) [Homo sapiens]	Cyt	n	69	1	1	1	2
Translation	189597	pancreatic tumor-related protein [Homo sapiens] elongation factor 1g	Cyt	n	204	4	4	5	3
Translation	53754	poly(A) binding protein [Mus musculus]	Cyt	n	188	3	3	4	3
Translation	27710456	similar to alpha NAC1.9.2. protein [Rattus norvegicus]	Cyt	n	216	3	3	4	3
Translation	27672918	similar to Eukaryotic initiation factor 4A-I [Rattus norvegicus]	Cyt	n	119	2	2	3	3
Translation	496902	translation initiation factor [Homo sapiens]	Cyt	n	37	1	1	1	2
Translating	1237029	alpha-cop protein [Bos primigenius]	Cyt	n	105	2	2	2	2
Translating	9845234	calpactin I heavy chain [Rattus norvegicus] Annexin 2	Cyt	y	47	1	1	1	2
Translating	9506497	clathrin, heavy polypeptide (Hc) [Rattus norvegicus]	Cyt	n	180	3	3	3	3
Translating	13929014	coated vesicle membrane protein [Rattus norvegicus]	ERGIC	y	50	1	1	2	2
Translating	16758214	integral membrane protein Tmp21-I (p23) [Rattus norvegicus]	ERGIC	y	56	1	1	1	2
Translating	479303	P63 protein - human	ERGIC	y	88	1	1	1	2
Translating	624704	putative transmembrane protein precursor	ERGIC	y	184	4	4	4	3
Translating	8394502	ubiquitin C [Rattus norvegicus]	Cyt	n	71	1	1	1	2
Translating	4704417	WS beta-transducin repeats protein [Homo sapiens]	Cyt	n	58	1	1	1	2
Signaling	5174447	guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2-like 1 [Homo sapiens]	Cyt	n	644	10	10	21	4
Signaling	4758808	RAS protein activator like 2 isoform 1 [Homo sapiens]	Cyt	n	36	1	1	1	2
Ribosomal	227229	1617101C ribosomal protein S4	Cyt	n	294	5	5	9	3
Ribosomal	2500494	40S RIBOSOMAL PROTEIN S19	Cyt	n	118	2	2	4	3
Ribosomal	133053	60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P1	Cyt	n	46	1	1	3	2
Ribosomal	3914781	60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P2	Cyt	n	253	4	4	9	3
Ribosomal	6174950	60S RIBOSOMAL PROTEIN L15	Cyt	n	173	3	3	3	3
Ribosomal	1172982	60S ribosomal protein L18a	Cyt	n	117	2	2	2	2
Ribosomal	2833359	60S RIBOSOMAL PROTEIN L35	Cyt	n	69	1	1	4	2
Ribosomal	132936	60S ribosomal protein L38	Cyt	n	76	1	1	1	2
Ribosomal	2500343	60S RIBOSOMAL PROTEIN L4 (L1)	Cyt	n	319	1	6	9	2
Ribosomal	133033	60S RIBOSOMAL PROTEIN L9	Cyt	n	227	4	4	8	3
Ribosomal	11693176	acidic ribosomal protein P0 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	157	4	4	5	3
Ribosomal	4007097	dJ1118D24.2 (60S Ribosomal Protein L10 LIKE) [Homo sapiens]	Cyt	n	87	1	1	1	2
Ribosomal	6969165	dJ475N16.3 (novel protein similar to L7A) [Homo sapiens]	Cyt	n	36	1	1	1	2
Ribosomal	31062	Ribosomal L22 [Homo sapiens]	Cyt	n	192	4	4	7	3
Ribosomal	306549	homology to rat ribosomal protein L23	Cyt	n	274	5	5	6	4
Ribosomal	619788	L21 ribosomal protein	Cyt	n	189	3	3	6	4
Ribosomal	1263104	ORF [Bos taurus] Ribosomal L15/L27	Cyt	n	213	4	4	8	4
Ribosomal	2136462	PC4158 ribosomal protein S3a - cat (fragment)	Cyt	n	426	7	7	13	4
Ribosomal	423071	ribosomal protein HL6, cytosolic - human	Cyt	n	157	3	3	4	3
Ribosomal	36142	ribosomal protein homologous to yeast S24 [Homo sapiens]	Cyt	n	74	1	1	1	2
Ribosomal	13592053	ribosomal protein L10 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	309	5	5	9	3
Ribosomal	13592009	ribosomal protein L10a [Rattus norvegicus]	Cyt	n	470	8	8	12	4
Ribosomal	71106	ribosomal protein L11, cytosolic [validated] - rat	Cyt	n	98	1	1	2	2
Ribosomal	4506597	ribosomal protein L12; 60S ribosomal protein L12 [Homo sapiens]	Cyt	n	295	4	4	11	3
Ribosomal	542770	ribosomal protein L13, cytosolic - human	Cyt	n	136	1	2	2	2
Ribosomal	27545438	ribosomal protein L13A [Rattus norvegicus]	Cyt	n	63	1	1	2	2
Ribosomal	12621122	ribosomal protein L14 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	103	2	2	4	3
Ribosomal	4506607	ribosomal protein L18; 60S ribosomal protein L18 [Homo sapiens]	Cyt	n	214	3	3	9	3
Ribosomal	1154899	ribosomal protein L19 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	131	2	2	3	3
Ribosomal	13592059	ribosomal protein L22 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	141	2	2	3	3
Ribosomal	4506619	60S ribosomal protein L24; ribosomal protein L30 [Homo sapiens]	Cyt	n	123	2	2	2	2
Ribosomal	226411	ribosomal protein L26	Cyt	n	49	1	1	2	2
Ribosomal	4506623	ribosomal protein L27; 60S ribosomal protein L27 [Homo sapiens]	Cyt	n	113	2	2	3	3
Ribosomal	337580	ribosomal protein L3	Cyt	n	467	4	8	25	4
Ribosomal	4506631	ribosomal protein L30; 60S ribosomal protein L30 [Homo sapiens]	Cyt	n	173	2	2	3	2
Ribosomal	57115	ribosomal protein L31 (AA 1-125) [Rattus norvegicus]	Cyt	n	104	2	2	4	2
Ribosomal	71335	ribosomal protein L32 - human	Cyt	n	215	4	4	8	3
Ribosomal	854422	ribosomal protein L34 [Rattus rattus]	Cyt	n	36	1	1	1	2
Ribosomal	11968074	ribosomal protein L36 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	89	2	2	2	2
Ribosomal	13592051	ribosomal protein L5 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	282	5	5	6	3
Ribosomal	5441521	Ribosomal protein L6 [Canis familiaris]	Cyt	n	104	1	1	3	2
Ribosomal	35903	ribosomal protein L7 [Homo sapiens]	Cyt	n	284	0	5	7	3
Ribosomal	57704	ribosomal protein L8 [Rattus rattus]	Cyt	n	270	4	4	6	4
Ribosomal	15431303	ribosomal protein L9; 60S ribosomal protein L9 [Homo sapiens]	Cyt	n	425	7	7	10	4
Ribosomal	4506671	ribosomal protein P2; 60S acidic ribosomal protein P2 [Homo sapiens]	Cyt	n	176	2	3	4	4
Ribosomal	4506679	ribosomal protein S10; 40S ribosomal protein S10 [Homo sapiens]	Cyt	n	214	3	3	4	3
Ribosomal	13592071	ribosomal protein S11 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	61	1	1	1	2
Ribosomal	13928992	ribosomal protein S12 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	36	1	1	1	2
Ribosomal	479483	ribosomal protein S13, cytosolic [validated] - human	Cyt	n	348	6	6	13	4
Ribosomal	12083607	ribosomal protein S14 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	295	6	6	7	4
Ribosomal	70918	ribosomal protein S16, cytosolic [validated] - human	Cyt	n	226	4	4	7	4
Ribosomal	8394215	ribosomal protein S17 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	222	3	3	8	4
Ribosomal	70965	ribosomal protein S18, cytosolic [validated] - rat	Cyt	n	186	4	4	5	4
Ribosomal	2293579	ribosomal protein S2 [Bos taurus]	Cyt	n	398	1	7	13	4
Ribosomal	70925	ribosomal protein S20, cytosolic [validated] - rat	Cyt	n	80	2	2	3	3
Ribosomal	3088341	ribosomal protein S21 [Homo sapiens]	Cyt	n	45	1	1	1	2
Ribosomal	4506701	ribosomal protein S23 [Homo sapiens]	Cyt	n	141	2	2	3	2
Ribosomal	71038	ribosomal protein S24, cytosolic [validated] - rat	Cyt	n	264	5	5	12	4
Ribosomal	71047	ribosomal protein S25, cytosolic [validated] - rat	Cyt	n	137	2	2	6	4
Ribosomal	6981488	ribosomal protein S26 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	119	1	1	2	2
Ribosomal	4506715	ribosomal protein S28; 40S ribosomal protein S28 [Homo sapiens]	Cyt	n	103	1	1	1	2
Ribosomal	70850	ribosomal protein S3, cytosolic [validated] - rat	Cyt	n	443	8	8	15	4
Ribosomal	550021	ribosomal protein S5	Cyt	n	241	3	3	7	4
Ribosomal	54010	ribosomal protein S6 [Mus musculus]	Cyt	n	203	4	4	11	4
Ribosomal	70907	ribosomal protein S8, cytosolic [validated] - rat	Cyt	n	466	7	7	11	4
Ribosomal	1096943	ribosomal protein S9	Cyt	n	145	3	3	7	3
Ribosomal	262391	Rig homolog [human, brain, Peptide Partial, 135 aa] S15	Cyt	n	178	3	3	13	4
Ribosomal	18585452	similar to 40S ribosomal protein SA [Homo sapiens]	Cyt	n	53	1	1	1	2
Ribosomal	27679110	similar to 60S RIBOSOMAL PROTEIN L17 (L23) [Rattus norvegicus]	Cyt	n	297	5	5	9	4
Ribosomal	17456110	similar to ribosomal protein L7 [Homo sapiens]	Cyt	n	305	1	4	5	3

Nuclear	3915658	ATP-dependent RNA helicase A (Nuclear DNA helicase II)	Nuc	n	176	3	3	3	3
Nuclear	18959218	H1 histone family, member 4 [Rattus norvegicus]	Nuc	n	196	3	3	4	3
Nuclear	122026	H2BN_HUMAN Histone H2B.n (H2B/n) (H2B.2)	Nuc	n	144	1	3	25	4
Nuclear	484531	H3.3 like histone MH321 - mouse	Nuc	n	91	1	1	2	2
Nuclear	9818	H4 protein (AA 1 - 103) [Platynereis dumerilii]	Nuc	n	248	4	4	4	3
Nuclear	4826760	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F [Homo sapiens]	Nuc	n	153	1	2	3	3
Nuclear	18266700	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 [Rattus norvegicus]	Nuc	n	126	1	2	2	3
Nuclear	12025526	histone 2b [Rattus norvegicus]	Nuc	n	124	2	2	12	4
Nuclear	6981004	histone H1-0 [Rattus norvegicus]	Nuc	n	81	1	1	2	2
Nuclear	122009	Histone H2A.1	Nuc	n	126	2	2	6	3
Nuclear	31973	histone H2A.X [Homo sapiens]	Nuc	n	56	1	1	2	2
Nuclear	223096	histone H2B	Nuc	n	146	1	3	26	2
Nuclear	70749	histone H3 - bovine	Nuc	n	84	1	1	3	2
Nuclear	13489069	lamin A; lamin C2 [Rattus norvegicus]	Nuc	n	268	4	4	7	3
Nuclear	16758782	lamin B1 [Rattus norvegicus]	Nuc	n	73	1	1	1	2
Nuclear	345758	lamin B2 - human (fragment)	Nuc	n	37	1	1	1	2
Nuclear	16124253	M4 protein [Rattus norvegicus] Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	Nuc	n	98	1	1	1	2
Nuclear	25742629	muscle Y-box protein YB2 [Rattus norvegicus]	Nuc	n	83	1	1	1	2
Nuclear	5453794	nucleolar protein 5A (56kDa with KKE/D repeat) [Homo sapiens]	Nuc	n	148	2	2	2	3
Nuclear	70844	nucleolin - mouse	Nuc	n	62	1	1	1	2
Nuclear	12018306	nucleolin-related protein NRP [Rattus norvegicus]	Nuc	n	132	2	2	2	2
Nuclear	34228	put. lamin A precursor (aa 1-702) [Homo sapiens]	Nuc	n	307	5	5	5	3
Nuclear	3387899	putative nuclear protein [Homo sapiens]	Nuc	n	55	1	1	1	2
Nuclear	1363226	RNA helicase (ERH) - mouse	Nuc	n	44	1	1	1	2
Nuclear	542850	S41766 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G - human	Nuc	n	63	1	1	1	2
Mitochondrial	114402	ATP synthase alpha chain heart isoform, mitochondrial precursor	Mitoch.	y	107	2	2	3	3
Mitochondrial	6729935	Chain B, Rat Liver F1-ATPase	Mitoch.	y	41	1	1	1	2
Folding	49728	3.4J polypeptide [Mus musculus] Erp72	ER	n	59	1	1	1	2
Folding	6470150	AF188611_1 BiP protein [Homo sapiens]	ER	n	622	9	10	14	4
Folding	543922	Calnexin precursor	ER	y	82	1	1	1	2
Folding	109186	calreticulin, uterine - rabbit (fragment)	ER	n	69	1	1	1	2
Folding	68401	CSBOAB peptidylprolyl isomerase (EC 5.2.1.8) A - bovine	ER	n	68	1	1	2	2
Folding	849127	defender against death 1 protein	ER	y	60	1	1	1	2
Folding	464319	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase 48 kDa	ER	y	431	7	7	11	3
Folding	119360	Endoplasmic precursor (94 kDa glucose-regulated protein) (GRP94))	ER	y	89	2	2	2	2
Folding	7385135	ER-associated Hsp40 co-chaperone [Homo sapiens]	ER	n	91	1	1	1	2
Folding	7706131	FK506 binding protein 11 (19 kDa) [Homo sapiens]	ER	n	108	2	2	2	2
Folding	25742763	heat shock 70kD protein 5 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	1022	15	16	19	4
Folding	13242237	Heat shock cognate protein 70; heat shock 70kD protein 8 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	211	3	4	5	3
Folding	20302024	oxygen regulated protein (150kD) [Rattus norvegicus]	ER	n	190	3	3	3	3
Folding	6981324	Protein disulfide isomerase [Rattus norvegicus]	ER	n	77	1	1	1	2
Folding	2501206	Protein disulfide isomerase A6 precursor	ER	n	103	2	2	2	2
Folding	1710248	protein disulfide isomerase-related protein 5 [Homo sapiens]	ER	n	113	1	2	3	2
Folding	9857227	ribophorin I [Sus scrofa]	ER	y	433	3	9	14	3
Folding	88567	ribophorin II precursor - human	ER	y	71	1	1	1	2
Folding	8393057	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1	ER	n	43	1	1	1	2
Folding	17865351	valosin-containing protein [Rattus norvegicus]	Cyt	n	185	4	4	4	2
Cytosk.	111332	actin gamma, cytoskeletal - rat	Cyt	n	460	2	7	10	4
Cytosk.	13591902	actinin, alpha 1; non-muscle alpha-actinin 1 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	173	3	3	3	3
Cytosk.	8850209	actin-like [Mus musculus]	Cyt	n	413	2	6	9	4
Cytosk.	49870	alpha-actin (AA 27-375) [Mus musculus]	Cyt	n	222	0	4	5	2
Cytosk.	13516471	beta-actin FE-3 [Rattus norvegicus]	Cyt	n	180	1	2	3	3
Cytosk.	202229	beta-tubulin	Cyt	n	211	0	3	3	3
Cytosk.	531148	myosin	Cyt	n	40	1	1	1	2
Cytosk.	2842665	Myosin light chain alkali, smooth-muscle isoform (MLC3SM)	Cyt	n	45	1	1	1	2
Cytosk.	223556	tubulin alpha	Cyt	n	314	2	5	8	2
Cytosk.	90217	tubulin alpha-3 chain - Chinese hamster	Cyt	n	327	6	6	6	4
Cytosk.	109431	tubulin beta chain (clone 16T) - Chinese hamster	Cyt	n	313	0	5	5	3
Cytosk.	224839	tubulin T beta15	Cyt	n	285	1	5	7	3
Cytosk.	340219	vimentin	Cyt	n	227	3	3	4	3
Cargo	113578	ALBU_PIG Serum albumin precursor	Sec	n	51	1	1	1	2
Cargo	49907	alpha-2 collagen type VI, subunit [Mus musculus]	Sec	n	78	1	1	1	2
Cargo	191765	alpha-fetoprotein	Sec	n	51	1	1	1	2
Cargo	115654	Alpha-S2 casein precursor [Contains: Casocidin-I]	Sec	n	34	1	1	1	2
Cargo	10280622	amylase, alpha 2B; pancreatic [Homo sapiens]	Sec	n	234	4	4	6	3
Cargo	3915607	Apolipoprotein A-I precursor (Apo-AI)	Sec	n	35	1	1	1	2
Cargo	1211	beta casein [Ovis aries]	Sec	n	38	1	1	2	2
Cargo	8393183	Carboxypeptidase A1 (pancreatic) [Rattus norvegicus]	Sec	n	40	1	1	1	2
Cargo	1705666	Carboxypeptidase B precursor	Sec	n	64	1	1	1	2
Cargo	115646	CAS1_BOVIN Alpha-S1 casein precursor	Sec	n	133	3	3	5	2
Cargo	180482	cholesterol esterase	Sec	n	54	1	1	1	2
Cargo	117612	Chymotrypsinogen 2 precursor	Sec	n	82	1	1	1	2
Cargo	18202926	Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (Diglyceride acyltransferase)	Sec	n	40	1	1	1	2
Cargo	219600	dipeptidase precursor [Homo sapiens]	Sec	n	49	1	1	1	2
Cargo	31183	eosinophil preperoxidase (AA -127 to 575) [Homo sapiens]	Sec	n	41	1	1	1	2
Cargo	1730202	L-arginine:glycine amidinotransferase	Sec	n	223	1	3	6	3
Cargo	5733829	heart pancreatic lipase [Spermophilus tridecemlineatus]	Sec	n	116	1	2	2	3
Cargo	115667	Kappa casein precursor	Sec	n	62	1	1	1	2
Cargo	2497599	Laminin beta-2 chain precursor (S-laminin) (S-LAM)	Sec	n	39	1	1	1	2
Cargo	8393693	laminin receptor 1 [Rattus norvegicus]	Sec	y	507	7	7	13	4
Cargo	1085329	L-arginine-glycine amidinotransferase - human	Sec	n	329	1	5	5	4
Cargo	126316	Pancreatic lipase related protein 1 precursor	Sec	n	139	2	2	2	4
Cargo	4885555	pancreatic lipase-related protein 2 [Homo sapiens]	Sec	n	59	1	1	1	2
Cargo	6981420	pancreatic trypsin 1 [Rattus norvegicus]	Sec	n	37	1	1	1	2
Cargo	11120720	progesterone receptor membrane component 1 [Rattus norvegicus]	Sec	y	56	1	1	1	2
Cargo	9910522	retinoic acid early transcript delta [Mus musculus]	Sec	n	40	1	1	1	2
Cargo	67162	triacylglycerol lipase (EC 3.1.1.3) precursor, pancreatic - dog	Sec	n	58	1	1	1	2
Uncharacterized	12835374	unnamed protein product [Mus musculus]	ND	y	65	1	1	1	2
Uncharacterized	7662078	KIAA0372 gene product [Homo sapiens]	ND	n	70	1	1	1	2
Uncharacterized	18088244	Unknown (protein for MGC:21447) [Homo sapiens]	ND	n	58	1	1	1	2
Uncharacterized	14044070	hypothetical protein MGC2592 [Homo sapiens]	ND	y	44	1	1	1	2
Uncharacterized	5453541	anterior gradient 2 homolog [Homo sapiens]	ND	y	57	1	1	1	2
Uncharacterized	13027602	chromosome 20 open reading frame 116 [Homo sapiens]	ND	n	58	1	1	1	2
Uncharacterized	5410296	homeobox prox 1 [Homo sapiens] CGI-99	ND	n	57	1	1	1	2
Uncharacterized	6841264	HSPC307 [Homo sapiens]	ND	n	35	1	1	1	2
Uncharacterized	5531849	SURF-4 isoform [Homo sapiens]	ND	y	88	1	1	3	3
Uncharacterized	3882183	KIAA0731 protein [Homo sapiens]	ND	n	239	4	4	4	3
Uncharacterized	1083448	p38-2G4 protein - mouse	ND	n	97	2	2	2	3
Other	87303	cytokeratin 8 (version 1) - human	i	n	552	0	7	13	4
Other	186772	keratin 1	i	n	192	3	3	5	3
Other	88045	keratin K7, type II, epithelial, 55K - human	i	n	116	1	2	6	3
Other	435476	cytokeratin 9 [Homo sapiens]	i	n	39	1	1	1	2
Other	88054	keratin, 67K type II cytoskeletal - human	i	n	59	1	1	1	2
Other	28317	Keratin 10 [Homo sapiens]	i	n	66	1	1	1	2

Table S2: SiRNA sequences

Gene ID	Sequence
AGR2	5'-CUG AUU AGG UUA UGG UUU ATT-3'
GL2	5'-CGU ACG CGG AAU ACU UCG ATT-3'
PERK	5'-CACCCGGGCAUUGUUAGAUAU-3'
ATF6	5'-GGCAGGACUACGAAGUGAUGA-3'
IRE1	5'-UUACUGGCUUCUGAUAGGA-3'
EDEM1	5'-GUACUAGGGAACUACUCAUUG-3'
OS-9	5'-GGAGGAGGAAACACCUGCUUACCAA-3'
XTP3-B	5'-UUUCCAUGACAUAUCGUAAGUCC-3'

Table S3: Primer Pairs used for PCR and qPCR studies.

<i>Gene ID</i>	<i>FWD</i>	<i>REV</i>
<i>RT-PCR</i>		
CHOP	5'-attgaccgaatggtgaatctgc-3'	5'-agctgagaccttctctttgtcta-3'
GADD34	5'-gtggaagcagtaaaaggagca-3'	5'-cagcaactccctcttctcg-3'
XBP-1	5'-ggaacagcaagtggtaga-3'	5'-ctggaggggtgacaac-3'
EDEM1	5'-gcctaaccatccactgcc-3'	5'-ccaggaggaacgggtccc-3'
AGR2	5'-ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt gat gga gaa aat tcc agt gtc ag-3'	5'-ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtc cta tta caa ttc agt ctt cag caa-3'
GAPDH	5'-accaccatggagaaggctgg-3'	5'-ctcagtgtagcccaggatgc-3'
<i>qPCR</i>		
OS-9	5'-ggaggagctgagtgatgc-3'	5'-gtctggctgtgtagcggtt-3'
XTP3-B	5'-gtgacaagtggggatgaggaa-5'	5'-atggtactgccgaatgtgtt-3'
HRD1	5'-gcttgtgcactctcactcttc-3'	5'-gagatgttggggtgcgttc-3'
SEL1L	5'-caatgctcctgtgccgt-3'	5'-aggacccttgatcagtggtc-3'
ERO1L β	5'-ggtttaggaactgccctgaag-3'	5'-caactattcctgtcgggtga-3'
HERPUD	5'-tcctcctcctgacgttgtaa-3'	5'-tgctcgccatctagtacatcc-3'
Derlin-1	5'-ctacgcgactgaaacaggag-3'	5'-tccattgctaagccagtaacac-3'

Supplementary Figure Legends

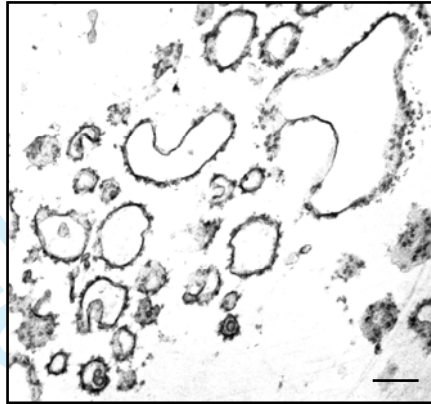
Figure S1: **A)** Electron micrograph of dog pancreatic rough endoplasmic reticulum (ER) microsomes purified from dog pancreas. **B)** Representation of the experimental scheme: rough ER microsomes were solubilized with 1.5% of CHAPS for 30 min on ice. The resulting lysates were then centrifuged and the protein content in the supernatant was spun through a 1.5M sucrose cushion for 3hr at 95,000 rpm in a Beckman TLA100.2 rotor. Ribosome-Associated ER Proteins (RAP) pellets were then collected.

Figure S2: **Computational analysis of the proteomics data - A)** Network representation of the proteins identified in our proteomics analysis. This functional network was built using the STRING (<http://string.embl.de/>) program suite and contains 143 nodes and 4733 edges. White nodes: ribosomal; orange nodes: ER translocation and Folding; yellow nodes: translation; green nodes: export (light) and cargo (dark). **B)** POPP analysis of the RAPs of uncharacterized function against the 213 proteins found in our proteomics approach. **C)** Cluster analysis of the RAPs of uncharacterized functions into 6 functional families based on their POPP homology profile

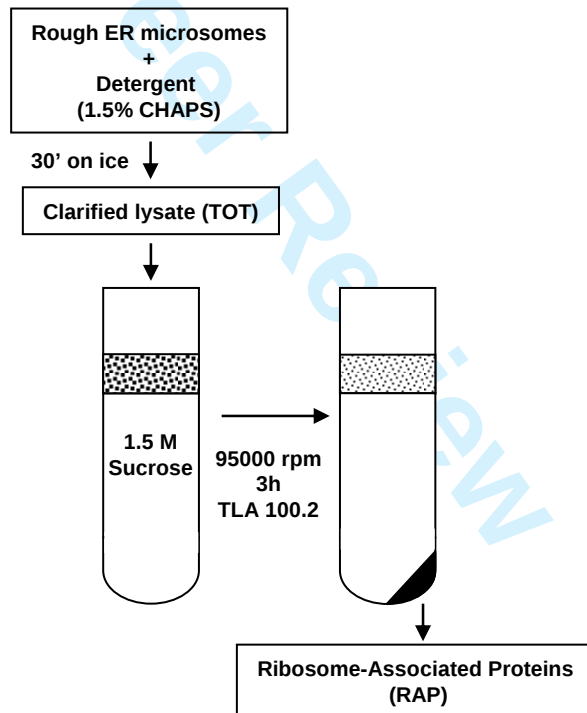
Figure S3: **Localization of RAP with uncharacterized function. A)** Representation of our experimental cloning scheme: cDNA encoding the 12 RAPs of uncharacterized function were amplified by PCR and were cloned using the Gateway recombinational cloning approach in pEYFP vectors. **B)** and **C)** Confocal analysis showing the localization of 9 RAPs of uncharacterized function expressed as EYFP fusion proteins in COS-7 cells (middle panel). Cells were co-transfected along with cyan-fluorescent-protein-labelled CFP-Vip36 used as an ER marker (left panel). A merged image is shown on the right-hand panel.

Figure S4: **Expression profile of AGR2. A)** RT-PCR analysis of AGR2 mRNA expression in different human cell lines. The normalization was carried out using GAPDH mRNA expression. **B)** Immunoblot analysis of AGR2 protein level in different human cell lines. ERK1/2 is used as a protein loading control.

A

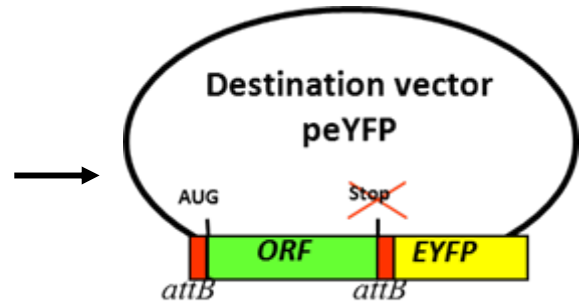
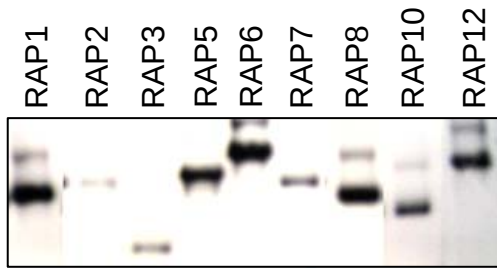
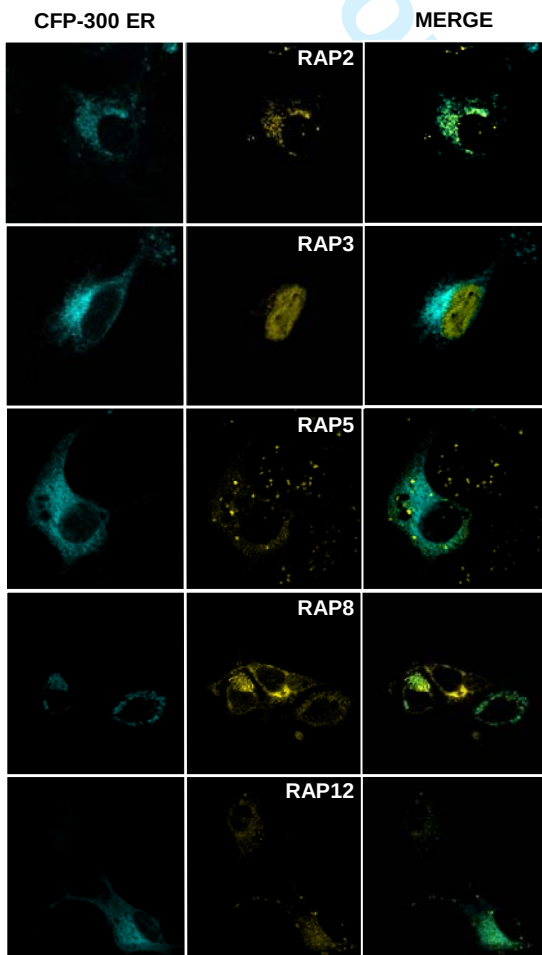
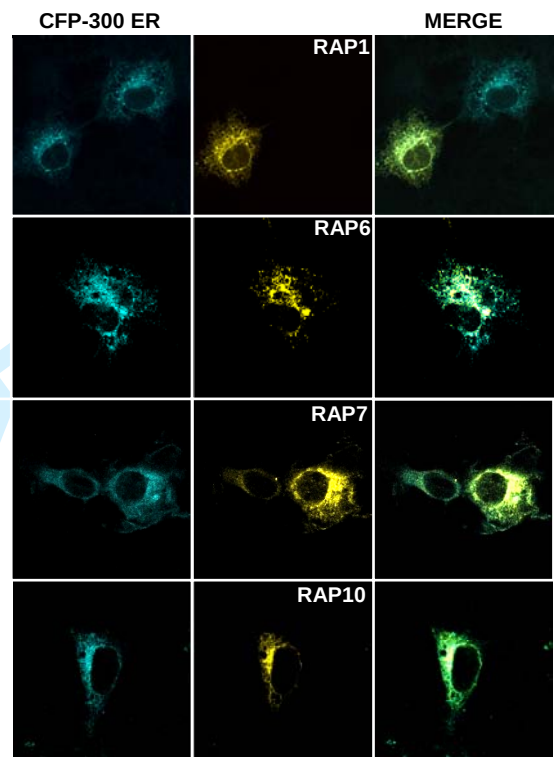


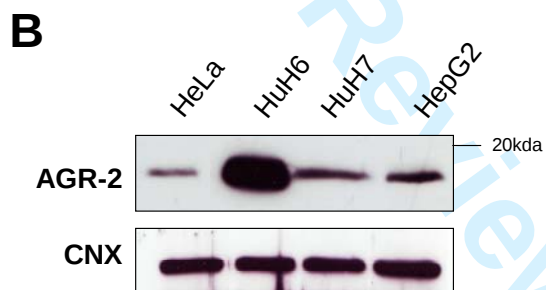
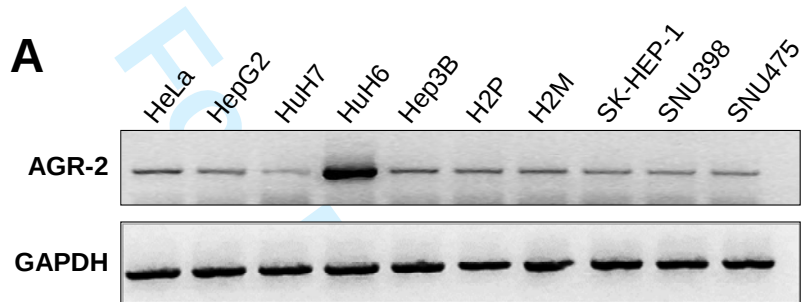
B



GO Category	RAP10 RAP9	RAP11 RAP2 RAP5	RAP11 RAP7	RAP2 RAP5 RAP6	RAP1 RAP10	RAP3	RAP12 RAP4 RAP8
Ribosomal	12	4	4	12	2	4	4
Other	2	2	2	2	2	2	2
Cargo	4	2	2	2	2	2	4
Cytoskeleton	2	2	2	4	2	2	2
Folding	2	4	6	2	2	6	2
Mitochondrial	2	2	2	2	2	2	2
Nuclear	2	6	4	4	6	2	6
Signalling	2	2	2	2	2	2	2
Trafficking	4	2	2	2	2	2	2
Translation	2	4	2	4	2	2	2
Translocation	6	2	2	2	2	4	4

POPP RAP

A**B****C**



Conclusion générale

Le réticulum endoplasmique (RE) est le premier compartiment intracellulaire traversé par la voie de sécrétion des protéines. A l'intérieur du RE, les protéines destinées à la sécrétion, à la membrane ou les protéines résidentes de la voie de sécrétion sont repliées suivant une conformation tridimensionnelle très précisément définie, dite native, et subissent une multitude de modifications post-traductionnelles incluant la N-glycosylation et la formation de ponts disulfures intra et intermoléculaires. Le RE fournit un cadre particulièrement propice à cette maturation des protéines grâce à un environnement très oxydant et à la présence de nombreuses chaperonnes et enzymes (notamment les oxydoréductases responsables de la formation des ponts disulfures) qui facilitent le repliement protéique. Généralement, seules les protéines bien conformées sont véhiculées hors du RE. Il existe en effet au sein du RE, un système de surveillance très fin dont le rôle est de vérifier la conformation correcte des protéines, de retenir les protéines mal conformées jusqu'à ce qu'elles atteignent une conformation tridimensionnelle adéquate ou de les adresser à la dégradation. L'efficacité de ce système de surveillance doit être optimum afin de limiter l'export du RE de protéines mal conformées potentiellement toxiques pour l'organisme, mais aussi d'éviter l'accumulation dans la lumière du RE de protéines n'ayant pas atteint une conformation correcte ce qui pourrait perturber l'homéostasie et le fonctionnement de l'organite, de la cellule, voire de l'organisme.

Près de un tiers des produits du génome transitent par la voie de sécrétion, se replient et mûrissent dans le RE avant d'atteindre leur destination finale. Néanmoins, à ce jour, seul un petit nombre d'acteurs a été identifié pour jouer un rôle dans le système de surveillance et le système de repliement/dégradation qui lui est associé. De plus, de très nombreuses pathologies humaines, telles que certaines maladies neurodégénératives ou certains diabètes, sont dues à un repliement inefficace, une dégradation trop précoce ou à l'inverse à un défaut de dégradation de protéines dont les conséquences sur l'organisme peuvent être critiques.

Basé sur ces informations, nous avons souhaité mettre en place une stratégie expérimentale visant à identifier et caractériser de nouveaux acteurs/régulateurs du système de surveillance du repliement des protéines dans le RE afin d'apporter de nouvelles clés dans la compréhension de ce mécanisme aussi complexe qu'indispensable.

Le mécanisme de repliement/maturation étant un mécanisme très précoce, intervenant au fur et à mesure de l'entrée des protéines dans la lumière du RE, nous avons émis l'hypothèse que de nombreux acteurs de ce système de surveillance se trouvent à proximité du canal de translocation des protéines, et de ce fait à proximité du ribosome. Sur la base de cette hypothèse nous avons utilisé une approche d'enrichissement des protéines associées aux

ribosomes précédemment publiée, afin d'identifier de nouveaux acteurs potentiels du système de surveillance du repliement des protéines dans le RE.

Cette approche nous a permis d'identifier une protéine du RE dont la fonction reste encore peu caractérisée, la protéine Anterior Gradient 2 (AGR2). AGR2 est une protéine principalement exprimée dans les tissus épithéliaux glandulaires qui a été initialement décrite comme étant surexprimée dans le cancer du sein (Thompson and Weigel 1998; Liu, Rudland et al. 2005). Notre étude a permis de mettre en évidence qu'AGR2 est une protéine luminale du RE qui s'associe aux ribosomes via les polypeptides naissants. Nous avons aussi montré que l'expression d'AGR2 est induite en réponse à un stress du RE et que son expression basale est majoritairement régulée par les voies de signalisation de l'UPR dépendante des protéines IRE1 et ATF6. De manière intéressante, nous avons également démontré que l'atténuation de l'expression d'AGR2 entraîne une perturbation de l'homéostasie basale du RE, mise en évidence par la dérégulation de l'expression de différents marqueurs de stress du RE, et notamment par une forte augmentation de l'expression de l'ARNm de EDEM1. Ces premiers résultats suggèrent un rôle d'AGR2 dans le maintien de l'homéostasie basale du RE. Par ailleurs, EDEM1 étant une protéine jouant un rôle clé dans la reconnaissance et l'adressage des protéines mal conformées au système de dégradation ERAD, nous avons émis l'hypothèse qu'AGR2 pouvait jouer un rôle dans la régulation du système ERAD. Afin de tester cette hypothèse, nous avons suivi la dégradation d'un substrat décrit comme étant spécifique du système ERAD (Liu, Choudhury et al. 1999), le mutant NHK de l' α 1-antitrypsine. Nous avons ainsi démontré qu'en absence d'AGR2, la dégradation du mutant NHK était accélérée suggérant une augmentation de l'activité du système ERAD. De plus des expériences classiques de co-immunoprécipitation ont permis de démontrer qu'AGR2 interagit avec le mutant NHK dans la cellule. A l'opposé, l'absence d'AGR2 n'a pas d'impact sur la sécrétion de la protéine α 1-antitrypsine sauvage, dont l'interaction avec AGR2 n'a pu être mise en évidence par co-immunoprécipitation. L'ensemble de nos résultats suggère qu'AGR2 joue spécifiquement un rôle régulateur de la dégradation des protéines définitivement mal conformées du RE et qu'il pourrait participer aux mécanismes de surveillance du passage des protéines d'un état non structuré à un état structuré.

Nous avons ensuite étudié l'impact de l'inhibition de la voie ERAD dans notre système expérimental en atténuant l'expression d'EDEM1 par ARN interférence. Contrairement à nos prédictions, l'atténuation de l'expression d'EDEM1 n'a que peu d'impact sur la dégradation

de NHK comme cela a été précédemment publié (Hosokawa, Wada et al. 2001). De plus, de manière surprenante, l'atténuation simultanée de l'expression d'AGR2 et d'EDEM1 entraîne une augmentation significative de la dégradation de NHK par rapport à l'atténuation seule de l'expression AGR2. Ces résultats suggèrent ainsi que l'augmentation de dégradation de NHK observée en absence d'AGR2 n'est potentiellement pas due à une augmentation d'activité du système ERAD mais pourrait être médiée par une voie de dégradation alternative encore à identifier.

De manière intéressante, une étude précédente utilisant des souris *Agr2*^{-/-} a montré qu'AGR2 était impliqué dans l'homéostasie du RE des cellules épithéliales intestinales. Dans cette étude, les auteurs ont montré que le niveau de l'expression protéique et de l'ARNm de la forme épissée de XBP1, CHOP, PDIA3 et PERK est fortement augmenté dans le petit intestin des souris *Agr2*^{-/-} (Zhao, Edwards et al.). Cependant, une autre étude utilisant aussi des souris *Agr2*^{-/-} (d'une souche différente) (Park, Zhen et al. 2009) démontre une faible activation de la réponse UPR dans leur modèle. Néanmoins, outre les différences observées entre ces deux études (qui peuvent être dues au modèle utilisé, à la cinétique des expérimentations ou encore à la capacité des cellules à s'adapter et compenser l'absence d'AGR2) toutes deux ont pu mettre en évidence que AGR2 était localisée dans le RE des cellules épithéliales intestinales et jouait un rôle essentiel dans la production de la Mucine2 (MUC2), une grosse glycoprotéine composant le mucus intestinal. Park et al., ont ainsi démontré que AGR2 co-immunoprécipite avec MUC2 et qu'en absence d'AGR2 la sécrétion de MUC2 est annihilée, suggérant que AGR2 joue un rôle de chaperonne indispensable à la production de MUC2.

Basé sur nos observations et les données fournies grâce aux études sur les souris *Agr2*^{-/-}, nous suggérons le modèle suivant en ce qui concerne le rôle d'AGR2 au sein du RE: AGR2 semble pouvoir s'associer aux chaînes polypeptidiques naissantes aussitôt qu'elles émergent du translocon et ainsi jouer un rôle de chaperonne sur ces protéines en favorisant leur repliement, comme cela semble être le cas pour la protéine MUC2. Néanmoins, AGR2 semble aussi impliquer dans la régulation de la dégradation des protéines mal conformées comme cela semble être suggéré par l'augmentation de la dégradation d'une protéine définitivement mal conformée NHK, dans notre modèle, en absence d'AGR2. Nous suggérons ainsi que l'absence d'AGR2, bien qu'elle n'induit pas un stress du RE sévère dans les cellules, induit l'activité d'une voie de dégradation des protéines mal conformées qui pourrait être indépendante de l'activité du système ERAD. A ce jour, au moins un autre système de

dégradation permettant la clairance des protéines mal conformées dans la lumière du RE a été identifié. Il s'agit du processus de macro-autophagie, qui permet d'adresser à la dégradation lysosomale des morceaux de RE enrichis en protéines mal conformées. Les perspectives directes de ce travail seront donc d'évaluer l'importance respective du système ERAD et du processus d'autophagie dans la dégradation du mutant NHK en absence d'AGR2, afin de caractériser plus précisément le rôle d'AGR2 dans la dégradation des protéines définitivement mal conformées.

En accord avec cette hypothèse, on peut donc supposer que les données présentées par Park et al., indiquent que l'absence de sécrétion de MUC2 est due à une augmentation de l'activité des systèmes de dégradation des protéines mal conformées du RE induite en réponse à l'absence d'AGR2.

Par ailleurs, ces cinq dernières années, de nombreuses études ont démontré une expression élevée de AGR2 dans divers cancers humains incluant le cancer de l'œsophage, la prostate le pancréas, le poumon et le sein (Thompson and Weigel 1998; Kristiansen, Pilarsky et al. 2005; Liu, Rudland et al. 2005; Fritzsche, Dahl et al. 2006; Innes, Liu et al. 2006; Zhang, Forootan et al. 2007; Zhu, Lam et al. 2007; Zweitzig, Smirnov et al. 2007; Ramachandran, Arumugam et al. 2008), mettant en évidence que AGR2 est une protéine communément sur exprimé dans les adénocarcinomes humains. Différentes études suggèrent aussi qu'AGR2 pourrait représenter un nouveau marqueur de métastases des cancers du sein et de la prostate. De plus, des études *in vivo* et *in vitro* dans des modèles de systèmes cancéreux démontrent que la surexpression d'AGR2 stimule la prolifération, l'adhésion, et la migration des cellules et favorise la croissance des tumeurs (Ramachandran, Arumugam et al. 2008; Wang, Hao et al. 2008). Le mécanisme moléculaire à l'origine de ces phénotypes n'est pas clairement élucidé. Néanmoins, notre travail pourrait fournir quelques éléments de réponse afin de comprendre comment l'expression d'AGR2 peut corrélérer et influencer sur le phénotype cancéreux. Ainsi, comme cela a été montré pour d'autres protéines résidentes du RE, une augmentation de l'expression d'AGR2, en tant que PDI à activité chaperonne impliquée dans le système de surveillance de repliement des protéines dans le RE, pourrait permettre d'augmenter les capacités de repliement du RE et permettre aux cellules de s'adapter à la hausse de la demande en production/sécrétion de protéines, participant ainsi à l'agressivité du phénotype cancéreux.

Parallèlement, différentes études démontrant le niveau élevé de l'expression d'AGR2 dans divers adénocarcinomes ont aussi indiqué qu'AGR2 était sécrétée par les cellules tumorales

(Chen, Pan et al.; Edgell, Barraclough et al.). Les auteurs de ces études ont ainsi supposé qu'AGR2 jouait un rôle à l'extérieur de la cellule. Ces données semblent s'opposer aux résultats de notre étude, et notamment aux résultats de localisation par immunofluorescence dans différentes lignées cellulaires humaines qui mettent en évidence qu'AGR2 est exclusivement localisée dans le RE. Nos observations corrélerent avec l'étude par homologie de séquence qui suggère qu'AGR2 est un membre de la famille des protéines disulfides isomérases, et sont cohérentes avec la présence dans la partie N-terminale de la protéine d'une séquence d'adressage au RE et la présence en C-terminale d'un motif de rétention dans le RE de type KDEL-like. Basé sur ces informations, on peut donc supposer que la sécrétion d'AGR2 observée dans certaines cellules tumorales serait plutôt une sécrétion par défaut. En effet, comme cela a déjà été rapporté dans la littérature, l'expression de nombreuses protéines chaperonnes résidentes du RE, dont AGR2, est augmentée dans les cellules cancéreuses afin de répondre à la hausse de la demande de production/sécrétion de protéines. Cette augmentation d'expression peut alors entraîner une saturation du système de recyclage des protéines résidentes dans le RE (via les récepteurs au motif KDEL-like présents au niveau de la face cis de l'appareil de Golgi) et aboutir à la sécrétion de certaines protéines résidentes du RE et notamment AGR2. Néanmoins, notre étude qui semble imputer un rôle à AGR2 au sein du RE, n'exclut pas que cette protéine ait un rôle à l'extérieur de la cellule une fois sécrétée, comme cela a été démontré pour d'autres protéines résidentes du RE, telles que la calreticuline ou BiP.

Pour finir, il est néanmoins important de noter que l'approche méthodologique que nous avons sélectionnée ici, en nous focalisant sur les protéines associées aux ribosomes, permet d'identifier majoritairement des facteurs précoces du système de surveillance du repliement des protéines, limitant quelque peu la portée de notre étude. Afin d'obtenir une vision plus globale du fonctionnement du système de surveillance du RE, cette approche sélective pourrait être combinée avec d'autres approches touchant d'autres critères dans la sélection d'un acteur potentiel du système de surveillance. On peut par exemple citer une approche utilisée par Nagasawa et al., en 2007 qui, dans le but d'explorer plus en détail les mécanismes moléculaires du système de surveillance du RE et du système de dégradation associé, ont réalisé une étude par hybridation soustractive sélective afin d'identifier toutes les protéines du RE dont l'expression est induite en réponse à un stress du RE (Nagasawa, Higashi et al. 2007).

Ainsi, notre étude peut présenter une base de travail qui complétée par d'autres méthodologies, déjà existantes ou encore à mettre en place, pourrait permettre à terme d'apporter des informations cruciales à la compréhension des mécanismes de repliement des protéines dans le RE, un des challenges actuels de la recherche scientifique touchant la biologie mais aussi la médecine et les biotechnologies.

Bibliographie

- Achleitner, G., B. Gaigg, et al. (1999). "Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact." Eur J Biochem 264(2): 545-53.
- Adachi, Y., K. Yamamoto, et al. (2008). "ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum." Cell Struct Funct 33(1): 75-89.
- Adelman, M. R., D. D. Sabatini, et al. (1973). "Ribosome-membrane interaction. Nondestructive disassembly of rat liver rough microsomes into ribosomal and membranous components." J Cell Biol 56(1): 206-29.
- Aebi, M., R. Bernasconi, et al. "N-glycan structures: recognition and processing in the ER." Trends Biochem Sci 35(2): 74-82.
- Anderson, M. P., R. J. Gregory, et al. (1991). "Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity." Science 253(5016): 202-5.
- Andrews, D. W., P. Walter, et al. (1985). "Structure of the signal recognition particle by electron microscopy." Proc Natl Acad Sci U S A 82(3): 785-9.
- Andrews, P. G. and R. Kole (1987). "Alu RNA transcribed in vitro binds the 68-kDa subunit of the signal recognition particle." J Biol Chem 262(6): 2908-12.
- Appenzeller, C., H. Andersson, et al. (1999). "The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins." Nat Cell Biol 1(6): 330-4.
- Appenzeller-Herzog, C. and L. Ellgaard (2008). "The human PDI family: versatility packed into a single fold." Biochim Biophys Acta 1783(4): 535-48.
- Arnaudeau, S., M. Frieden, et al. (2002). "Calreticulin differentially modulates calcium uptake and release in the endoplasmic reticulum and mitochondria." J Biol Chem 277(48): 46696-705.
- Arnold, S. M., L. I. Fessler, et al. (2000). "Two homologues encoding human UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase differ in mRNA expression and enzymatic activity." Biochemistry 39(9): 2149-63.
- Avezov, E., Z. Frenkel, et al. (2008). "Endoplasmic reticulum (ER) mannosidase I is compartmentalized and required for N-glycan trimming to Man5-6GlcNAc2 in glycoprotein ER-associated degradation." Mol Biol Cell 19(1): 216-25.
- Babour, A., A. A. Bicknell, et al. "A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance." Cell 142(2): 256-69.
- Bailey, D. and P. O'Hare (2007). "Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response." Antioxid Redox Signal 9(12): 2305-21.
- Balch, W. E., J. M. McCaffery, et al. (1994). "Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum." Cell 76(5): 841-52.
- Bannykh, S. I., T. Rowe, et al. (1996). "The organization of endoplasmic reticulum export complexes." J Cell Biol 135(1): 19-35.
- Batey, R. T., R. P. Rambo, et al. (2000). "Crystal structure of the ribonucleoprotein core of the signal recognition particle." Science 287(5456): 1232-9.
- Baumann, O. and B. Walz (2001). "Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains." Int Rev Cytol 205: 149-214.
- Bays, N. W., S. K. Wilhovsky, et al. (2001). "HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins." Mol Biol Cell 12(12): 4114-28.
- Beckmann, R., D. Bubeck, et al. (1997). "Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex." Science 278(5346): 2123-6.
- Beckmann, R., C. M. Spahn, et al. (2001). "The active 80S ribosome-Sec61 complex." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 66: 543-54.

- Bernales, S., K. L. McDonald, et al. (2006). "Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response." PLoS Biol 4(12): e423.
- Bernasconi, R., T. Pertel, et al. (2008). "A dual task for the Xbp1-responsive OS-9 variants in the mammalian endoplasmic reticulum: inhibiting secretion of misfolded protein conformers and enhancing their disposal." J Biol Chem 283(24): 16446-54.
- Berridge, M. J. (2002). "The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle." Cell Calcium 32(5-6): 235-49.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol 4(7): 517-29.
- Bertolotti, A., X. Wang, et al. (2001). "Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice." J Clin Invest 107(5): 585-93.
- Bertolotti, A., Y. Zhang, et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." Nat Cell Biol 2(6): 326-32.
- Bi, M., C. Naczki, et al. (2005). "ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth." Embo J 24(19): 3470-81.
- Bi, X., R. A. Corpina, et al. (2002). "Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat." Nature 419(6904): 271-7.
- Biederer, T., C. Volkwein, et al. (1997). "Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface." Science 278(5344): 1806-9.
- Blom, D., C. Hirsch, et al. (2004). "A glycosylated type I membrane protein becomes cytosolic when peptide: N-glycanase is compromised." Embo J 23(3): 650-8.
- Boisrame, A., M. Chasles, et al. (2002). "Sbh1p, a subunit of the Sec61 translocon, interacts with the chaperone calnexin in the yeast *Yarrowia lipolytica*." J Cell Sci 115(Pt 24): 4947-56.
- Boisrame, A., M. Kabani, et al. (1998). "Interaction of Kar2p and Sls1p is required for efficient co-translational translocation of secreted proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*." J Biol Chem 273(47): 30903-8.
- Borgese, N., W. Mok, et al. (1974). "Ribosomal-membrane interaction: in vitro binding of ribosomes to microsomal membranes." J Mol Biol 88(3): 559-80.
- Brewer, J. W. and J. A. Diehl (2000). "PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response." Proc Natl Acad Sci U S A 97(23): 12625-30.
- Brewer, J. W., L. M. Hendershot, et al. (1999). "Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression." Proc Natl Acad Sci U S A 96(15): 8505-10.
- Breyton, C., W. Haase, et al. (2002). "Three-dimensional structure of the bacterial protein-translocation complex SecYEG." Nature 418(6898): 662-5.
- Brodsky, J. L., J. Goeckeler, et al. (1995). "BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A 92(21): 9643-6.
- Buck, T. M., C. M. Wright, et al. (2007). "The activities and function of molecular chaperones in the endoplasmic reticulum." Semin Cell Dev Biol 18(6): 751-61.
- Budnik, A. and D. J. Stephens (2009). "ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation." FEBS Lett 583(23): 3796-803.
- Bulleid, N. J. and R. B. Freedman (1988). "Defective co-translational formation of disulphide bonds in protein disulphide-isomerase-deficient microsomes." Nature 335(6191): 649-51.
- Burda, P., C. A. Jakob, et al. (1999). "Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases." Glycobiology 9(6): 617-25.

- Cai, H., C. C. Wang, et al. (1994). "Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds." J Biol Chem 269(40): 24550-2.
- Calfon, M., H. Zeng, et al. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." Nature 415(6867): 92-6.
- Caramelo, J. J. and A. J. Parodi (2008). "Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles." J Biol Chem 283(16): 10221-5.
- Carrell, R. W. and D. A. Lomas (2002). "Alpha1-antitrypsin deficiency--a model for conformational diseases." N Engl J Med 346(1): 45-53.
- Carvalho, P., V. Goder, et al. (2006). "Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins." Cell 126(2): 361-73.
- Chen, R., S. Pan, et al. "Elevated level of anterior gradient-2 in pancreatic juice from patients with pre-malignant pancreatic neoplasia." Mol Cancer 9: 149.
- Chen, X., J. Shen, et al. (2002). "The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi." J Biol Chem 277(15): 13045-52.
- Cheng, Z., Y. Jiang, et al. (2005). "Identification of cytoplasmic residues of Sec61p involved in ribosome binding and cotranslational translocation." J Cell Biol 168(1): 67-77.
- Chevet, E., H. N. Wong, et al. (1999). "Phosphorylation by CK2 and MAPK enhances calnexin association with ribosomes." Embo J 18(13): 3655-66.
- Christianson, J. C., T. A. Shaler, et al. (2008). "OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD." Nat Cell Biol 10(3): 272-82.
- Christis, C., N. H. Lubsen, et al. (2008). "Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol." Febs J 275(19): 4700-27.
- Chung, K. T., Y. Shen, et al. (2002). "BAP, a mammalian BiP-associated protein, is a nucleotide exchange factor that regulates the ATPase activity of BiP." J Biol Chem 277(49): 47557-63.
- Coe, H. and M. Michalak (2009). "Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum." Gen Physiol Biophys 28 Spec No Focus: F96-F103.
- Collins, P. G. and R. Gilmore (1991). "Ribosome binding to the endoplasmic reticulum: a 180-kD protein identified by crosslinking to membrane-bound ribosomes is not required for ribosome binding activity." J Cell Biol 114(4): 639-49.
- Cormier, J. H., T. Tamura, et al. (2009). "EDEMI recognition and delivery of misfolded proteins to the SEL1L-containing ERAD complex." Mol Cell 34(5): 627-33.
- Cosson, P. and F. Letourneur (1994). "Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs." Science 263(5153): 1629-31.
- Credle, J. J., J. S. Finer-Moore, et al. (2005). "On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A 102(52): 18773-84.
- Cribb, A. E., M. Peyrou, et al. (2005). "The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity." Drug Metab Rev 37(3): 405-42.
- Crowley, K. S., S. Liao, et al. (1994). "Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore." Cell 78(3): 461-71.
- Crowley, K. S., G. D. Reinhart, et al. (1993). "The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation." Cell 73(6): 1101-15.
- Cruciat, C. M., C. Hassler, et al. (2006). "The MRH protein Erlectin is a member of the endoplasmic reticulum synexpression group and functions in N-glycan recognition." J Biol Chem 281(18): 12986-93.

- Cullinan, S. B. and J. A. Diehl (2004). "PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress." J Biol Chem 279(19): 20108-17.
- Cullinan, S. B., D. Zhang, et al. (2003). "Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival." Mol Cell Biol 23(20): 7198-209.
- Cyr, D. M., T. Langer, et al. (1994). "DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70." Trends Biochem Sci 19(4): 176-81.
- Dai, R. M. and C. C. Li (2001). "Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation." Nat Cell Biol 3(8): 740-4.
- De Praeter, C. M., G. J. Gerwig, et al. (2000). "A novel disorder caused by defective biosynthesis of N-linked oligosaccharides due to glucosidase I deficiency." Am J Hum Genet 66(6): 1744-56.
- Degen, E. and D. B. Williams (1991). "Participation of a novel 88-kD protein in the biogenesis of murine class I histocompatibility molecules." J Cell Biol 112(6): 1099-115.
- Dejgaard, K., J. F. Theberge, et al. "Organization of the Sec61 translocon, studied by high resolution native electrophoresis." J Proteome Res 9(4): 1763-71.
- Delepine, M., M. Nicolino, et al. (2000). "EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome." Nat Genet 25(4): 406-9.
- Denzel, A., M. Molinari, et al. (2002). "Early postnatal death and motor disorders in mice congenitally deficient in calnexin expression." Mol Cell Biol 22(21): 7398-404.
- Drogat, B., P. Auguste, et al. (2007). "IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth in vivo." Cancer Res 67(14): 6700-7.
- Drumm, M. L., D. J. Wilkinson, et al. (1991). "Chloride conductance expressed by delta F508 and other mutant CFTRs in *Xenopus* oocytes." Science 254(5039): 1797-9.
- Easton, D. P., Y. Kaneko, et al. (2000). "The hsp110 and Grp1 70 stress proteins: newly recognized relatives of the Hsp70s." Cell Stress Chaperones 5(4): 276-90.
- Edgell, T. A., D. L. Barraclough, et al. "Increased plasma concentrations of anterior gradient 2 protein are positively associated with ovarian cancer." Clin Sci (Lond) 118(12): 717-25.
- Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." Nat Rev Mol Cell Biol 4(3): 181-91.
- Ellgaard, L., M. Molinari, et al. (1999). "Setting the standards: quality control in the secretory pathway." Science 286(5446): 1882-8.
- Ellgaard, L., R. Riek, et al. (2001). "NMR structure of the calreticulin P-domain." Proc Natl Acad Sci U S A 98(6): 3133-8.
- Evans, E. A., R. Gilmore, et al. (1986). "Purification of microsomal signal peptidase as a complex." Proc Natl Acad Sci U S A 83(3): 581-5.
- Fagone, P. and S. Jackowski (2009). "Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function." J Lipid Res 50 Suppl: S311-6.
- Fang, S., M. Ferrone, et al. (2001). "The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A 98(25): 14422-7.
- Fawcett, T. W., J. L. Martindale, et al. (1999). "Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response." Biochem J 339 (Pt 1): 135-41.

- Fernandez, F., C. D'Alessio, et al. (1998). "A misfolded protein conformation is not a sufficient condition for in vivo glucosylation by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Embo J 17(20): 5877-86.
- Fischer, G. and H. Bang (1985). "The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl cis-trans isomerase." Biochim Biophys Acta 828(1): 39-42.
- Flanagan, J. J., J. C. Chen, et al. (2003). "Signal recognition particle binds to ribosome-bound signal sequences with fluorescence-detected subnanomolar affinity that does not diminish as the nascent chain lengthens." J Biol Chem 278(20): 18628-37.
- Fletcher, G. C., S. Patel, et al. (2003). "hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan." Br J Cancer 88(4): 579-85.
- Fliegel, L., K. Burns, et al. (1989). "Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum." J Biol Chem 264(36): 21522-8.
- Flynn, G. C., J. Pohl, et al. (1991). "Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP." Nature 353(6346): 726-30.
- Fonseca, S. G., K. L. Lipson, et al. (2007). "Endoplasmic reticulum stress signaling in pancreatic beta-cells." Antioxid Redox Signal 9(12): 2335-44.
- Freeze, H. H. and M. Aebi (2005). "Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation." Curr Opin Struct Biol 15(5): 490-8.
- Frickel, E. M., R. Riek, et al. (2002). "TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain." Proc Natl Acad Sci U S A 99(4): 1954-9.
- Fritzsche, F. R., E. Dahl, et al. (2006). "Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer." Clin Cancer Res 12(6): 1728-34.
- Gardai, S. J., K. A. McPhillips, et al. (2005). "Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte." Cell 123(2): 321-34.
- Gavel, Y. and G. von Heijne (1990). "Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering." Protein Eng 3(5): 433-42.
- Gething, M. J. (1999). "Role and regulation of the ER chaperone BiP." Semin Cell Dev Biol 10(5): 465-72.
- Ghaemmighami, S., W. K. Huh, et al. (2003). "Global analysis of protein expression in yeast." Nature 425(6959): 737-41.
- Glickman, M. H. and A. Ciechanover (2002). "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction." Physiol Rev 82(2): 373-428.
- Gonzalez-Gronow, M., M. A. Selim, et al. (2009). "GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface." Antioxid Redox Signal 11(9): 2299-306.
- Gorlich, D., E. Hartmann, et al. (1992). "A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation." Nature 357(6373): 47-52.
- Gorlich, D., S. Prehn, et al. (1992). "A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation." Cell 71(3): 489-503.
- Gorlich, D. and T. A. Rapoport (1993). "Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane." Cell 75(4): 615-30.
- Gupta, S., A. Deepti, et al. "HSP72 protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of IRE1alpha-XBP1 signaling through a physical interaction." PLoS Biol 8(7): e1000410.

- Haas, I. G. and M. Wabl (1983). "Immunoglobulin heavy chain binding protein." Nature 306(5941): 387-9.
- Halic, M., T. Becker, et al. (2004). "Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome." Nature 427(6977): 808-14.
- Hamman, B. D., J. C. Chen, et al. (1997). "The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane." Cell 89(4): 535-44.
- Hamman, B. D., L. M. Hendershot, et al. (1998). "BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation." Cell 92(6): 747-58.
- Hammond, A. T. and B. S. Glick (2000). "Dynamics of transitional endoplasmic reticulum sites in vertebrate cells." Mol Biol Cell 11(9): 3013-30.
- Hammond, C., I. Braakman, et al. (1994). "Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control." Proc Natl Acad Sci U S A 91(3): 913-7.
- Han, D., J. P. Upton, et al. (2008). "A kinase inhibitor activates the IRE1α RNase to confer cytoprotection against ER stress." Biochem Biophys Res Commun 365(4): 777-83.
- Hanein, D., K. E. Matlack, et al. (1996). "Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation." Cell 87(4): 721-32.
- Hansen, T. H. and M. Bouvier (2009). "MHC class I antigen presentation: learning from viral evasion strategies." Nat Rev Immunol 9(7): 503-13.
- Harada, Y., H. Li, et al. (2009). "Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site." Proc Natl Acad Sci U S A 106(17): 6945-9.
- Harding, H. P., H. Zeng, et al. (2001). "Diabetes mellitus and exocrine pancreatic dysfunction in perk^{-/-} mice reveals a role for translational control in secretory cell survival." Mol Cell 7(6): 1153-63.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (2000). "Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response." Mol Cell 5(5): 897-904.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." Nature 397(6716): 271-4.
- Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (2003). "An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress." Mol Cell 11(3): 619-33.
- Hayashi-Nishino, M., N. Fujita, et al. (2009). "A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation." Nat Cell Biol 11(12): 1433-7.
- Haze, K., T. Okada, et al. (2001). "Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response." Biochem J 355(Pt 1): 19-28.
- Haze, K., H. Yoshida, et al. (1999). "Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress." Mol Biol Cell 10(11): 3787-99.
- Hebert, D. N., R. Bernasconi, et al. "ERAD substrates: which way out?" Semin Cell Dev Biol 21(5): 526-32.
- Hebert, D. N., B. Foellmer, et al. (1996). "Calnexin and calreticulin promote folding, delay oligomerization and suppress degradation of influenza hemagglutinin in microsomes." Embo J 15(12): 2961-8.
- Hebert, D. N. and M. Molinari (2007). "In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases." Physiol Rev 87(4): 1377-408.

- Hebert, D. N., J. F. Simons, et al. (1995). "Calnexin, calreticulin, and Bip/Kar2p in protein folding." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 60: 405-15.
- Heinrich, S. U., W. Mothes, et al. (2000). "The Sec61p complex mediates the integration of a membrane protein by allowing lipid partitioning of the transmembrane domain." Cell 102(2): 233-44.
- Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." Science 291(5512): 2364-9.
- Hendershot, L. M. (2004). "The ER function BiP is a master regulator of ER function." Mt Sinai J Med 71(5): 289-97.
- Herscovics, A., P. A. Romero, et al. (2002). "The specificity of the yeast and human class I ER alpha 1,2-mannosidases involved in ER quality control is not as strict previously reported." Glycobiology 12(4): 14G-15G.
- Hessa, T., H. Kim, et al. (2005). "Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon." Nature 433(7024): 377-81.
- Hettkamp, H., G. Legler, et al. (1984). "Purification by affinity chromatography of glucosidase I, an endoplasmic reticulum hydrolase involved in the processing of asparagine-linked oligosaccharides." Eur J Biochem 142(1): 85-90.
- Hetz, C., P. Bernasconi, et al. (2006). "Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha." Science 312(5773): 572-6.
- Hetz, C. and L. H. Glimcher (2009). "Fine-tuning of the unfolded protein response: Assembling the IRE1alpha interactome." Mol Cell 35(5): 551-61.
- High, S., B. Martoglio, et al. (1993). "Site-specific photocross-linking reveals that Sec61p and TRAM contact different regions of a membrane-inserted signal sequence." J Biol Chem 268(35): 26745-51.
- Hirao, K., Y. Natsuka, et al. (2006). "EDEM3, a soluble EDEM homolog, enhances glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation and mannose trimming." J Biol Chem 281(14): 9650-8.
- Hirosumi, J., G. Tuncman, et al. (2002). "A central role for JNK in obesity and insulin resistance." Nature 420(6913): 333-6.
- Hobman, T. C., B. Zhao, et al. (1998). "Immunoisolation and characterization of a subdomain of the endoplasmic reticulum that concentrates proteins involved in COPII vesicle biogenesis." Mol Biol Cell 9(6): 1265-78.
- Hollien, J., J. H. Lin, et al. (2009). "Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells." J Cell Biol 186(3): 323-31.
- Hollien, J. and J. S. Weissman (2006). "Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response." Science 313(5783): 104-7.
- Hoseki, J., R. Ushioda, et al. "Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation." J Biochem 147(1): 19-25.
- Hosokawa, N., Y. Kamiya, et al. (2009). "Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans." J Biol Chem 284(25): 17061-8.
- Hosokawa, N., L. O. Tremblay, et al. "EDEM1 accelerates the trimming of alpha1,2-linked mannose on the C branch of N-glycans." Glycobiology 20(5): 567-75.
- Hosokawa, N., I. Wada, et al. (2001). "A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation." EMBO Rep 2(5): 415-22.
- Hosokawa, N., I. Wada, et al. (2008). "Human XTP3-B forms an endoplasmic reticulum quality control scaffold with the HRD1-SEL1L ubiquitin ligase complex and BiP." J Biol Chem 283(30): 20914-24.
- Hosokawa, N., I. Wada, et al. (2006). "EDEM accelerates ERAD by preventing aberrant dimer formation of misfolded alpha1-antitrypsin." Genes Cells 11(5): 465-76.

- Hosokawa, N., Z. You, et al. (2007). "Stimulation of ERAD of misfolded null Hong Kong alpha1-antitrypsin by Golgi alpha1,2-mannosidases." Biochem Biophys Res Commun 362(3): 626-32.
- Hwang, C., A. J. Sinskey, et al. (1992). "Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum." Science 257(5076): 1496-502.
- Ichimura, T., T. Ohsumi, et al. (1992). "Isolation and some properties of a 34-kDa-membrane protein that may be responsible for ribosome binding in rat liver rough microsomes." FEBS Lett 296(1): 7-10.
- Ikawa, M., T. Nakanishi, et al. (2001). "Calmegin is required for fertilin alpha/beta heterodimerization and sperm fertility." Dev Biol 240(1): 254-61.
- Ikeda, J., S. Kaneda, et al. (1997). "Cloning and expression of cDNA encoding the human 150 kDa oxygen-regulated protein, ORP150." Biochem Biophys Res Commun 230(1): 94-9.
- Imperiali, B. and S. E. O'Connor (1999). "Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure." Curr Opin Chem Biol 3(6): 643-9.
- Innes, H. E., D. Liu, et al. (2006). "Significance of the metastasis-inducing protein AGR2 for outcome in hormonally treated breast cancer patients." Br J Cancer 94(7): 1057-65.
- Ireland, B. S., M. Niggemann, et al. (2006). "In vitro assays of the functions of calnexin and calreticulin, lectin chaperones of the endoplasmic reticulum." Methods Mol Biol 347: 331-42.
- Ishida, Y. and K. Nagata (2009). "Autophagy eliminates a specific species of misfolded procollagen and plays a protective role in cell survival against ER stress." Autophagy 5(8): 1217-9.
- Itin, C., R. Schindler, et al. (1995). "Targeting of protein ERGIC-53 to the ER/ERGIC/cis-Golgi recycling pathway." J Cell Biol 131(1): 57-67.
- Iwakoshi, N. N., A. H. Lee, et al. (2003). "Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1." Nat Immunol 4(4): 321-9.
- Jaeken, J. and G. Matthijs (2007). "Congenital disorders of glycosylation: a rapidly expanding disease family." Annu Rev Genomics Hum Genet 8: 261-78.
- Jager, M. and A. Pluckthun (1997). "The rate-limiting steps for the folding of an antibody scFv fragment." FEBS Lett 418(1-2): 106-10.
- Janen, S. B., H. Chaachouay, et al. "Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes." Glia 58(14): 1766-74.
- Jarosch, E., R. Geiss-Friedlander, et al. (2002). "Protein dislocation from the endoplasmic reticulum--pulling out the suspect." Traffic 3(8): 530-6.
- Jarosch, E., U. Lenk, et al. (2003). "Endoplasmic reticulum-associated protein degradation." Int Rev Cytol 223: 39-81.
- Jensen, T. J., M. A. Loo, et al. (1995). "Multiple proteolytic systems, including the proteasome, contribute to CFTR processing." Cell 83(1): 129-35.
- Jessop, C. E., S. Chakravarthi, et al. (2004). "Oxidative protein folding in the mammalian endoplasmic reticulum." Biochem Soc Trans 32(Pt 5): 655-8.
- Jessop, C. E., T. J. Tavender, et al. (2009). "Substrate specificity of the oxidoreductase ERp57 is determined primarily by its interaction with calnexin and calreticulin." J Biol Chem 284(4): 2194-202.
- Jessop, C. E., R. H. Watkins, et al. (2009). "Protein disulphide isomerase family members show distinct substrate specificity: P5 is targeted to BiP client proteins." J Cell Sci 122(Pt 23): 4287-95.
- Jiang, H. Y., S. A. Wek, et al. (2004). "Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response." Mol Cell Biol 24(3): 1365-77.

- Jin, Y., M. Zhuang, et al. (2009). "ERdj3, a luminal ER DnaJ homologue, binds directly to unfolded proteins in the mammalian ER: identification of critical residues." Biochemistry 48(1): 41-9.
- Johnson, A. E. and M. A. van Waes (1999). "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane." Annu Rev Cell Dev Biol 15: 799-842.
- Kalies, K. U., D. Gorlich, et al. (1994). "Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex." J Cell Biol 126(4): 925-34.
- Kalies, K. U., T. A. Rapoport, et al. (1998). "The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation." J Cell Biol 141(4): 887-94.
- Kamimoto, T., S. Shoji, et al. (2006). "Intracellular inclusions containing mutant alpha1-antitrypsin Z are propagated in the absence of autophagic activity." J Biol Chem 281(7): 4467-76.
- Kamiya, Y., D. Kamiya, et al. (2008). "Molecular basis of sugar recognition by the human L-type lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36." J Biol Chem 283(4): 1857-61.
- Kappeler, F., D. R. Klopfenstein, et al. (1997). "The recycling of ERGIC-53 in the early secretory pathway. ERGIC-53 carries a cytosolic endoplasmic reticulum-exit determinant interacting with COPII." J Biol Chem 272(50): 31801-8.
- Kaser, A., A. H. Lee, et al. (2008). "XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease." Cell 134(5): 743-56.
- Katayama, T., K. Imaizumi, et al. (2004). "Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease." J Chem Neuroanat 28(1-2): 67-78.
- Katiyar, S., S. Joshi, et al. (2005). "The retrotranslocation protein Derlin-1 binds peptide:N-glycanase to the endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell 16(10): 4584-94.
- Kebache, S., E. Cardin, et al. (2004). "Nck-1 antagonizes the endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of translation." J Biol Chem 279(10): 9662-71.
- Kemmink, J., N. J. Darby, et al. (1996). "Structure determination of the N-terminal thioredoxin-like domain of protein disulfide isomerase using multidimensional heteronuclear ¹³C/¹⁵N NMR spectroscopy." Biochemistry 35(24): 7684-91.
- Kemmink, J., N. J. Darby, et al. (1997). "The folding catalyst protein disulfide isomerase is constructed of active and inactive thioredoxin modules." Curr Biol 7(4): 239-45.
- Kikkert, M., R. Doolman, et al. (2004). "Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem 279(5): 3525-34.
- Kim, P. S. and P. Arvan (1998). "Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones." Endocr Rev 19(2): 173-202.
- Kimata, Y., D. Oikawa, et al. (2004). "A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1." J Cell Biol 167(3): 445-56.
- Klappa, P., P. Koivunen, et al. (2000). "Mutations that destabilize the a' domain of human protein-disulfide isomerase indirectly affect peptide binding." J Biol Chem 275(18): 13213-8.
- Klappa, P., L. W. Ruddock, et al. (1998). "The b' domain provides the principal peptide-binding site of protein disulfide isomerase but all domains contribute to binding of misfolded proteins." Embo J 17(4): 927-35.
- Klappa, P., T. Stromer, et al. (1998). "A pancreas-specific glycosylated protein disulphide-isomerase binds to misfolded proteins and peptides with an interaction inhibited by oestrogens." Eur J Biochem 254(1): 63-9.
- Knop, M., A. Finger, et al. (1996). "Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast." Embo J 15(4): 753-63.

- Krieg, U. C., A. E. Johnson, et al. (1989). "Protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane: identification by photocross-linking of a 39-kD integral membrane glycoprotein as part of a putative translocation tunnel." J Cell Biol 109(5): 2033-43.
- Kristiansen, G., C. Pilarsky, et al. (2005). "Expression profiling of microdissected matched prostate cancer samples reveals CD166/MEMD and CD24 as new prognostic markers for patient survival." J Pathol 205(3): 359-76.
- Kruse, K. B., J. L. Brodsky, et al. (2006). "Characterization of an ERAD gene as VPS30/ATG6 reveals two alternative and functionally distinct protein quality control pathways: one for soluble Z variant of human alpha-1 proteinase inhibitor (A1PiZ) and another for aggregates of A1PiZ." Mol Biol Cell 17(1): 203-12.
- Kuglstatter, A., C. Oubridge, et al. (2002). "Induced structural changes of 7SL RNA during the assembly of human signal recognition particle." Nat Struct Biol 9(10): 740-4.
- Kukuruzinska, M. A. and K. Lennon (1998). "Protein N-glycosylation: molecular genetics and functional significance." Crit Rev Oral Biol Med 9(4): 415-48.
- Lagier-Tourenne, C., L. Tranebaerg, et al. (2003). "Homozygosity mapping of Marinesco-Sjogren syndrome to 5q31." Eur J Hum Genet 11(10): 770-8.
- Lal, A., P. Pang, et al. (1998). "Substrate specificities of recombinant murine Golgi alpha1, 2-mannosidases IA and IB and comparison with endoplasmic reticulum and Golgi processing alpha1,2-mannosidases." Glycobiology 8(10): 981-95.
- LaMantia, M. L. and W. J. Lennarz (1993). "The essential function of yeast protein disulfide isomerase does not reside in its isomerase activity." Cell 74(5): 899-908.
- Land, A. and I. Braakman (2001). "Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum." Biochimie 83(8): 783-90.
- Lavoie, C. and J. Paiement (2008). "Topology of molecular machines of the endoplasmic reticulum: a compilation of proteomics and cytological data." Histochem Cell Biol 129(2): 117-28.
- Lavoie, S. B., A. L. Albert, et al. (2003). "[Unexpected roles of the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase Pin1]." Med Sci (Paris) 19(12): 1251-8.
- Lederkremer, G. Z., Y. Cheng, et al. (2001). "Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII." Proc Natl Acad Sci U S A 98(19): 10704-9.
- Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, et al. (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." Mol Cell Biol 23(21): 7448-59.
- Lee, K. P., M. Dey, et al. (2008). "Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing." Cell 132(1): 89-100.
- Lievremont, J. P., R. Rizzuto, et al. (1997). "BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺." J Biol Chem 272(49): 30873-9.
- Lilie, H., R. Rudolph, et al. (1995). "Association of antibody chains at different stages of folding: prolyl isomerization occurs after formation of quaternary structure." J Mol Biol 248(1): 190-201.
- Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2004). "A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER." Nature 429(6994): 834-40.
- Lilley, B. N. and H. L. Ploegh (2005). "Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane." Proc Natl Acad Sci U S A 102(40): 14296-301.
- Lin, H. Y., P. Masso-Welch, et al. (1993). "The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin." Mol Biol Cell 4(11): 1109-19.

- Lin, J. H., H. Li, et al. (2007). "IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response." Science 318(5852): 944-9.
- Lin, J. H., H. Li, et al. (2009). "Divergent effects of PERK and IRE1 signaling on cell viability." PLoS One 4(1): e4170.
- Lipp, J., B. Dobberstein, et al. (1987). "Signal recognition particle arrests elongation of nascent secretory and membrane proteins at multiple sites in a transient manner." J Biol Chem 262(4): 1680-4.
- Liu, C. Y., M. Schroder, et al. (2000). "Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum." J Biol Chem 275(32): 24881-5.
- Liu, D., P. S. Rudland, et al. (2005). "Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas." Cancer Res 65(9): 3796-805.
- Liu, Y., P. Choudhury, et al. (1999). "Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome." J Biol Chem 274(9): 5861-7.
- Lomas, D. A. and R. Mahadeva (2002). "Alpha1-antitrypsin polymerization and the serpinopathies: pathobiology and prospects for therapy." J Clin Invest 110(11): 1585-90.
- Lord, J. M., E. Deeks, et al. (2003). "Retrograde transport of toxins across the endoplasmic reticulum membrane." Biochem Soc Trans 31(Pt 6): 1260-2.
- Luirink, J. and I. Sinning (2004). "SRP-mediated protein targeting: structure and function revisited." Biochim Biophys Acta 1694(1-3): 17-35.
- Lunkes, A., K. S. Lindenberg, et al. (2002). "Proteases acting on mutant huntingtin generate cleaved products that differentially build up cytoplasmic and nuclear inclusions." Mol Cell 10(2): 259-69.
- Lutcke, H., S. High, et al. (1992). "The methionine-rich domain of the 54 kDa subunit of signal recognition particle is sufficient for the interaction with signal sequences." Embo J 11(4): 1543-51.
- Lytton, J., M. Westlin, et al. (1992). "Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps." J Biol Chem 267(20): 14483-9.
- Lytton, J., M. Westlin, et al. (1991). "Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps." J Biol Chem 266(26): 17067-71.
- Ma, Y., J. W. Brewer, et al. (2002). "Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response." J Mol Biol 318(5): 1351-65.
- Ma, Y. and L. M. Hendershot (2004). "The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?" Nat Rev Cancer 4(12): 966-77.
- Maattanen, P., K. Gehring, et al. "Protein quality control in the ER: the recognition of misfolded proteins." Semin Cell Dev Biol 21(5): 500-11.
- Maattanen, P., G. Kozlov, et al. (2006). "ERp57 and PDI: multifunctional protein disulfide isomerases with similar domain architectures but differing substrate-partner associations." Biochem Cell Biol 84(6): 881-9.
- Mancias, J. D. and J. Goldberg (2005). "Exiting the endoplasmic reticulum." Traffic 6(4): 278-85.
- Marcu, M. G., M. Doyle, et al. (2002). "Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1alpha." Mol Cell Biol 22(24): 8506-13.
- Martoglio, B. and B. Dobberstein (1998). "Signal sequences: more than just greasy peptides." Trends Cell Biol 8(10): 410-5.

- Mason, N., L. F. Ciufo, et al. (2000). "Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle." Embo J 19(15): 4164-74.
- Mast, S. W., K. Diekman, et al. (2005). "Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins." Glycobiology 15(4): 421-36.
- Mayer, T. U., T. Braun, et al. (1998). "Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein." Embo J 17(12): 3251-7.
- McCracken, A. A. and J. L. Brodsky (2005). "Recognition and delivery of ERAD substrates to the proteasome and alternative paths for cell survival." Curr Top Microbiol Immunol 300: 17-40.
- McKnight, C. J., S. J. Stradley, et al. (1991). "Conformational and membrane-binding properties of a signal sequence are largely unaltered by its adjacent mature region." Proc Natl Acad Sci U S A 88(13): 5799-803.
- McPherson, P. S. and K. P. Campbell (1993). "The ryanodine receptor/Ca²⁺ release channel." J Biol Chem 268(19): 13765-8.
- Melnick, J., J. L. Dul, et al. (1994). "Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum." Nature 370(6488): 373-5.
- Menetret, J. F., R. S. Hegde, et al. (2005). "Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes." J Mol Biol 348(2): 445-57.
- Menetret, J. F., A. Neuhof, et al. (2000). "The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation." Mol Cell 6(5): 1219-32.
- Meunier, L., Y. K. Usherwood, et al. (2002). "A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins." Mol Biol Cell 13(12): 4456-69.
- Meusser, B., C. Hirsch, et al. (2005). "ERAD: the long road to destruction." Nat Cell Biol 7(8): 766-72.
- Michalak, M., J. Groenendyk, et al. (2009). "Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum." Biochem J 417(3): 651-66.
- Mikami, K., D. Yamaguchi, et al. "The sugar-binding ability of human OS-9 and its involvement in ER-associated degradation." Glycobiology 20(3): 310-21.
- Miller, E., B. Antonny, et al. (2002). "Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit." Embo J 21(22): 6105-13.
- Miller, J. D., S. Tajima, et al. (1995). "The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane." J Cell Biol 128(3): 273-82.
- Miller, J. D. and P. Walter (1993). "A GTPase cycle in initiation of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane." Ciba Found Symp 176: 147-59; discussion 159-63.
- Miller, J. D., H. Wilhelm, et al. (1993). "GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation." Nature 366(6453): 351-4.
- Miller, W. L. (1988). "Molecular biology of steroid hormone synthesis." Endocr Rev 9(3): 295-318.
- Miyagi, T., O. Hori, et al. (2002). "Antitumor effect of reduction of 150-kDa oxygen-regulated protein expression on human prostate cancer cells." Int J Urol 9(10): 577-85.
- Mizushima, N. (2007). "Autophagy: process and function." Genes Dev 21(22): 2861-73.
- Mizushima, N., A. Yamamoto, et al. (2001). "Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells." J Cell Biol 152(4): 657-68.

- Moenner, M., O. Pluquet, et al. (2007). "Integrated endoplasmic reticulum stress responses in cancer." Cancer Res 67(22): 10631-4.
- Molinari, M. (2007). "N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal." Nat Chem Biol 3(6): 313-20.
- Molinari, M., V. Calanca, et al. (2003). "Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle." Science 299(5611): 1397-400.
- Molinari, M., C. Galli, et al. (2002). "Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER." J Cell Biol 158(2): 247-57.
- Morgan, D. G., J. F. Menetret, et al. (2002). "Structure of the mammalian ribosome-channel complex at 17A resolution." J Mol Biol 324(4): 871-86.
- Mori, H., T. Tsukazaki, et al. (2003). "Fluorescence resonance energy transfer analysis of protein translocase. SecYE from *Thermus thermophilus* HB8 forms a constitutive oligomer in membranes." J Biol Chem 278(16): 14257-64.
- Morrow, M. W. and J. L. Brodsky (2001). "Yeast ribosomes bind to highly purified reconstituted Sec61p complex and to mammalian p180." Traffic 2(10): 705-16.
- Mothes, W., B. Jungnickel, et al. (1998). "Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane." J Cell Biol 142(2): 355-64.
- Mothes, W., S. Prehn, et al. (1994). "Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane." Embo J 13(17): 3973-82.
- Mueller, B., E. J. Klemm, et al. (2008). "SEL1L nucleates a protein complex required for dislocation of misfolded glycoproteins." Proc Natl Acad Sci U S A 105(34): 12325-30.
- Mueller, B., B. N. Lilley, et al. (2006). "SEL1L, the homologue of yeast Hrd3p, is involved in protein dislocation from the mammalian ER." J Cell Biol 175(2): 261-70.
- Nadanaka, S., T. Okada, et al. (2007). "Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress." Mol Cell Biol 27(3): 1027-43.
- Nadanaka, S., H. Yoshida, et al. (2006). "Reduction of disulfide bridges in the luminal domain of ATF6 in response to glucose starvation." Cell Struct Funct 31(2): 127-34.
- Nagai, K., C. Oubridge, et al. (2003). "Structure, function and evolution of the signal recognition particle." Embo J 22(14): 3479-85.
- Nagasawa, K., T. Higashi, et al. (2007). "Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation." EMBO Rep 8(5): 483-9.
- Nakagawa, T., H. Zhu, et al. (2000). "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta." Nature 403(6765): 98-103.
- Nakatani, Y., H. Kaneto, et al. (2005). "Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes." J Biol Chem 280(1): 847-51.
- Neuhof, A., M. M. Rolls, et al. (1998). "Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction." Mol Biol Cell 9(1): 103-15.
- Nicchitta, C. V. and G. Blobel (1993). "Luminal proteins of the mammalian endoplasmic reticulum are required to complete protein translocation." Cell 73(5): 989-98.
- Nishitoh, H., A. Matsuzawa, et al. (2002). "ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats." Genes Dev 16(11): 1345-55.
- Novoa, I., H. Zeng, et al. (2001). "Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha." J Cell Biol 153(5): 1011-22.

- Obeid, M., A. Tesniere, et al. (2007). "Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death." Nat Med 13(1): 54-61.
- O'Connor, T. F., P. G. DeBenedetti, et al. (2007). "Stability of proteins in the presence of carbohydrates; experiments and modeling using scaled particle theory." Biophys Chem 127(1-2): 51-63.
- Oda, Y., N. Hosokawa, et al. (2003). "EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin." Science 299(5611): 1394-7.
- Oda, Y., T. Okada, et al. (2006). "Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation." J Cell Biol 172(3): 383-93.
- Oeri, J., M. Matter, et al. (1954). "[Congenital factor V deficiency (parahemophilia) with true hemophilia in two brothers.]." Bibl Paediatr 58: 575-88.
- Ohki, M., F. Tamura, et al. (1986). "Nucleotide sequence of the Escherichia coli dnaJ gene and purification of the gene product." J Biol Chem 261(4): 1778-81.
- Ohsumi, T., T. Ichimura, et al. (1993). "Ribosome-binding protein p34 is a member of the leucine-rich-repeat-protein superfamily." Biochem J 294 (Pt 2): 465-72.
- Oikawa, D., M. Tokuda, et al. (2007). "Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1." Biochem Biophys Res Commun 360(1): 122-7.
- Okuda-Shimizu, Y. and L. M. Hendershot (2007). "Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp." Mol Cell 28(4): 544-54.
- Olivari, S., C. Galli, et al. (2005). "A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation." J Biol Chem 280(4): 2424-8.
- Oliver, J. D., R. C. Hresko, et al. (1996). "The glut 1 glucose transporter interacts with calnexin and calreticulin." J Biol Chem 271(23): 13691-6.
- Oliver, J. D., H. L. Roderick, et al. (1999). "ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin." Mol Biol Cell 10(8): 2573-82.
- Oliver, J. D., F. J. van der Wal, et al. (1997). "Interaction of the thiol-dependent reductase ERp57 with nascent glycoproteins." Science 275(5296): 86-8.
- Omura, T., M. Kaneko, et al. (2006). "A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin." J Neurochem 99(6): 1456-69.
- Ostermann, J., L. Orci, et al. (1993). "Stepwise assembly of functionally active transport vesicles." Cell 75(5): 1015-25.
- Otero, J. H., B. Lizak, et al. "Life and death of a BiP substrate." Semin Cell Dev Biol 21(5): 472-8.
- Otsu, M., G. Bertoli, et al. (2006). "Dynamic retention of Ero1alpha and Ero1beta in the endoplasmic reticulum by interactions with PDI and ERp44." Antioxid Redox Signal 8(3-4): 274-82.
- Ou, W. J., P. H. Cameron, et al. (1993). "Association of folding intermediates of glycoproteins with calnexin during protein maturation." Nature 364(6440): 771-6.
- Ozcan, U., Q. Cao, et al. (2004). "Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes." Science 306(5695): 457-61.
- Palade, G. (1975). "Intracellular aspects of the process of protein synthesis." Science 189(4206): 867.
- Panaretakis, T., N. Joza, et al. (2008). "The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death." Cell Death Differ 15(9): 1499-509.
- Pandey, U. B., Y. Batlevi, et al. (2007). "HDAC6 at the intersection of autophagy, the ubiquitin-proteasome system and neurodegeneration." Autophagy 3(6): 643-5.

- Pandey, U. B., Z. Nie, et al. (2007). "HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS." Nature 447(7146): 859-63.
- Park, S. W., G. Zhen, et al. (2009). "The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus." Proc Natl Acad Sci U S A 106(17): 6950-5.
- Parodi, A. J. (2000). "Protein glucosylation and its role in protein folding." Annu Rev Biochem 69: 69-93.
- Paul, S. (2008). "Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in multiple disease conditions: therapeutic approaches." Bioessays 30(11-12): 1172-84.
- Paulick, M. G. and C. R. Bertozzi (2008). "The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins." Biochemistry 47(27): 6991-7000.
- Paulson, J. C. (1989). "Glycoproteins: what are the sugar chains for?" Trends Biochem Sci 14(7): 272-6.
- Payne, A. H. and D. B. Hales (2004). "Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones." Endocr Rev 25(6): 947-70.
- Pelletier, M. F., A. Marcil, et al. (2000). "The heterodimeric structure of glucosidase II is required for its activity, solubility, and localization in vivo." Glycobiology 10(8): 815-27.
- Peng, Y. and L. S. Weisman (2008). "The cyclin-dependent kinase Cdk1 directly regulates vacuole inheritance." Dev Cell 15(3): 478-85.
- Petrescu, A. J., A. L. Milac, et al. (2004). "Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding." Glycobiology 14(2): 103-14.
- Pichler, H., B. Gaigg, et al. (2001). "A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids." Eur J Biochem 268(8): 2351-61.
- Pikuleva, I. A. (2006). "Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis." Pharmacol Ther 112(3): 761-73.
- Pirneskoski, A., P. Klappa, et al. (2004). "Molecular characterization of the principal substrate binding site of the ubiquitous folding catalyst protein disulfide isomerase." J Biol Chem 279(11): 10374-81.
- Plempner, R. K., S. Bohmler, et al. (1997). "Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation." Nature 388(6645): 891-5.
- Ploegh, H. L. (1998). "Viral strategies of immune evasion." Science 280(5361): 248-53.
- Pollock, S., G. Kozlov, et al. (2004). "Specific interaction of ERp57 and calnexin determined by NMR spectroscopy and an ER two-hybrid system." Embo J 23(5): 1020-9.
- Porter, K. R. and G. E. Palade (1957). "Studies on the endoplasmic reticulum. III. Its form and distribution in striated muscle cells." J Biophys Biochem Cytol 3(2): 269-300.
- Prinz, A., E. Hartmann, et al. (2000). "Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*." Biol Chem 381(9-10): 1025-9.
- Puthalakath, H., L. A. O'Reilly, et al. (2007). "ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim." Cell 129(7): 1337-49.
- Pyhtila, B., T. Zheng, et al. (2008). "Signal sequence- and translation-independent mRNA localization to the endoplasmic reticulum." Rna 14(3): 445-53.
- Quan, H., G. Fan, et al. (1995). "Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site." J Biol Chem 270(29): 17078-80.
- Raden, D., W. Song, et al. (2000). "Role of the cytoplasmic segments of Sec61alpha in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex." J Cell Biol 150(1): 53-64.

- Ramachandran, V., T. Arumugam, et al. (2008). "Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival." Cancer Res 68(19): 7811-8.
- Rapiejko, P. J. and R. Gilmore (1997). "Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum." Cell 89(5): 703-13.
- Rapoport, T. A. (2007). "Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes." Nature 450(7170): 663-9.
- Raykhel, I., H. Alanen, et al. (2007). "A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors." J Cell Biol 179(6): 1193-204.
- Reiterer, V., B. Nyfeler, et al. "Role of the lectin VIP36 in post-ER quality control of human alpha1-antitrypsin." Traffic 11(8): 1044-55.
- Riordan, J. R., J. M. Rommens, et al. (1989). "Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA." Science 245(4922): 1066-73.
- Romero-Ramirez, L., H. Cao, et al. (2004). "XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth." Cancer Res 64(17): 5943-7.
- Romisch, K. (2005). "Endoplasmic reticulum-associated degradation." Annu Rev Cell Dev Biol 21: 435-56.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." Nat Rev Mol Cell Biol 8(7): 519-29.
- Rudnick, D. A. and D. H. Perlmutter (2005). "Alpha-1-antitrypsin deficiency: a new paradigm for hepatocellular carcinoma in genetic liver disease." Hepatology 42(3): 514-21.
- Russell, S. J., L. W. Ruddock, et al. (2004). "The primary substrate binding site in the b' domain of ERp57 is adapted for endoplasmic reticulum lectin association." J Biol Chem 279(18): 18861-9.
- Rutkevich, L. A., M. F. Cohen-Doyle, et al. "Functional Relationship between Protein Disulfide Isomerase Family Members during the Oxidative Folding of Human Secretory Proteins." Mol Biol Cell 21(18): 3093-105.
- Saito, K., M. Chen, et al. (2009). "TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites." Cell 136(5): 891-902.
- Saito, Y., K. Kimura, et al. (1998). "Activities of mutant Sar1 proteins in guanine nucleotide binding, GTP hydrolysis, and cell-free transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus." J Biochem 124(4): 816-23.
- Sakaida, I., A. P. Thomas, et al. (1991). "Increases in cytosolic calcium ion concentration can be dissociated from the killing of cultured hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide." J Biol Chem 266(2): 717-22.
- Sauer-Eriksson, A. E. and T. Hainzl (2003). "S-domain assembly of the signal recognition particle." Curr Opin Struct Biol 13(1): 64-70.
- Savitz, A. J. and D. I. Meyer (1990). "Identification of a ribosome receptor in the rough endoplasmic reticulum." Nature 346(6284): 540-4.
- Savitz, A. J. and D. I. Meyer (1993). "180-kD ribosome receptor is essential for both ribosome binding and protein translocation." J Cell Biol 120(4): 853-63.
- Schrag, J. D., J. J. Bergeron, et al. (2001). "The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding." Mol Cell 8(3): 633-44.
- Schrag, J. D., D. O. Procopio, et al. (2003). "Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway." Trends Biochem Sci 28(1): 49-57.
- Schroder, K., B. Martoglio, et al. (1999). "Control of glycosylation of MHC class II-associated invariant chain by translocon-associated RAMP4." Embo J 18(17): 4804-15.

- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "ER stress and the unfolded protein response." Mutat Res 569(1-2): 29-63.
- Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." Annu Rev Biochem 74: 739-89.
- Sekijima, Y., R. L. Wiseman, et al. (2005). "The biological and chemical basis for tissue-selective amyloid disease." Cell 121(1): 73-85.
- Senderek, J., M. Krieger, et al. (2005). "Mutations in SIL1 cause Marinesco-Sjogren syndrome, a cerebellar ataxia with cataract and myopathy." Nat Genet 37(12): 1312-4.
- Shen, J., X. Chen, et al. (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." Dev Cell 3(1): 99-111.
- Shen, X., R. E. Ellis, et al. (2005). "Genetic interactions due to constitutive and inducible gene regulation mediated by the unfolded protein response in *C. elegans*." PLoS Genet 1(3): e37.
- Shen, Y., P. Ballar, et al. (2006). "Ubiquitin ligase gp78 increases solubility and facilitates degradation of the Z variant of alpha-1-antitrypsin." Biochem Biophys Res Commun 349(4): 1285-93.
- Shimizu, K., M. Tani, et al. (1999). "The autocrine motility factor receptor gene encodes a novel type of seven transmembrane protein." FEBS Lett 456(2): 295-300.
- Shiu, R. P., J. Pouyssegur, et al. (1977). "Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A 74(9): 3840-4.
- Sifers, R. N., S. Brashears-Macatee, et al. (1988). "A frameshift mutation results in a truncated alpha 1-antitrypsin that is retained within the rough endoplasmic reticulum." J Biol Chem 263(15): 7330-5.
- Song, J. L. and C. C. Wang (1995). "Chaperone-like activity of protein disulfide-isomerase in the refolding of rhodanese." Eur J Biochem 231(2): 312-6.
- Sousa, M. and A. J. Parodi (1995). "The molecular basis for the recognition of misfolded glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Embo J 14(17): 4196-203.
- Sousa, M. C., M. A. Ferrero-Garcia, et al. (1992). "Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase." Biochemistry 31(1): 97-105.
- Spiro, R. G. (2002). "Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds." Glycobiology 12(4): 43R-56R.
- Stephens, D. J. (2003). "De novo formation, fusion and fission of mammalian COPII-coated endoplasmic reticulum exit sites." EMBO Rep 4(2): 210-7.
- Stirling, C. J., J. Rothblatt, et al. (1992). "Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum." Mol Biol Cell 3(2): 129-42.
- Suzuki, T., H. Park, et al. (2000). "PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide:N-glycanase." J Cell Biol 149(5): 1039-52.
- Tanaka, H., M. Ikawa, et al. (1997). "Cloning and characterization of the human Calmegin gene encoding putative testis-specific chaperone." Gene 204(1-2): 159-63.
- Tatu, U. and A. Helenius (1997). "Interactions between newly synthesized glycoproteins, calnexin and a network of resident chaperones in the endoplasmic reticulum." J Cell Biol 136(3): 555-65.
- Taylor, S. C., A. D. Ferguson, et al. (2004). "The ER protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein-glucosyltransferase modifies substrates distant to local changes in glycoprotein conformation." Nat Struct Mol Biol 11(2): 128-34.

- Tazawa, S., M. Unuma, et al. (1991). "Identification of a membrane protein responsible for ribosome binding in rough microsomal membranes." J Biochem 109(1): 89-98.
- Teasdale, R. D. and M. R. Jackson (1996). "Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus." Annu Rev Cell Dev Biol 12: 27-54.
- Terzi, L., M. R. Pool, et al. (2004). "Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition." Biochemistry 43(1): 107-17.
- Tessier, D. C., D. Dignard, et al. (2000). "Cloning and characterization of mammalian UDP-glucose glycoprotein: glucosyltransferase and the development of a specific substrate for this enzyme." Glycobiology 10(4): 403-12.
- Thompson, D. A. and R. J. Weigel (1998). "hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines." Biochem Biophys Res Commun 251(1): 111-6.
- Thrower, J. S., L. Hoffman, et al. (2000). "Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal." Embo J 19(1): 94-102.
- Tian, G., S. Xiang, et al. (2006). "The crystal structure of yeast protein disulfide isomerase suggests cooperativity between its active sites." Cell 124(1): 61-73.
- Tian, R., S. J. Li, et al. (2004). "The acidic C-terminal domain stabilizes the chaperone function of protein disulfide isomerase." J Biol Chem 279(47): 48830-5.
- Tirasophon, W., K. Lee, et al. (2000). "The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response." Genes Dev 14(21): 2725-36.
- Tirasophon, W., A. A. Welihinda, et al. (1998). "A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells." Genes Dev 12(12): 1812-24.
- Tremblay, L. O., N. Campbell Dyke, et al. (1998). "Molecular cloning, chromosomal mapping and tissue-specific expression of a novel human alpha1,2-mannosidase gene involved in N-glycan maturation." Glycobiology 8(6): 585-95.
- Tremblay, L. O. and A. Herscovics (1999). "Cloning and expression of a specific human alpha 1,2-mannosidase that trims Man9GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 isomer B during N-glycan biosynthesis." Glycobiology 9(10): 1073-8.
- Tremblay, L. O. and A. Herscovics (2000). "Characterization of a cDNA encoding a novel human Golgi alpha 1, 2-mannosidase (IC) involved in N-glycan biosynthesis." J Biol Chem 275(41): 31655-60.
- Trombetta, E. S., J. F. Simons, et al. (1996). "Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit." J Biol Chem 271(44): 27509-16.
- Trombetta, S. E., M. Bosch, et al. (1989). "Glucosylation of glycoproteins by mammalian, plant, fungal, and trypanosomatid protozoa microsomal membranes." Biochemistry 28(20): 8108-16.
- Trombetta, S. E. and A. J. Parodi (1992). "Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase." J Biol Chem 267(13): 9236-40.
- Turano, C., S. Coppari, et al. (2002). "Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions." J Cell Physiol 193(2): 154-63.
- Uemura, A., M. Oku, et al. (2009). "Unconventional splicing of XBP1 mRNA occurs in the cytoplasm during the mammalian unfolded protein response." J Cell Sci 122(Pt 16): 2877-86.

- Underwood, K. W., N. L. Jacobs, et al. (1998). "Evidence for a cholesterol transport pathway from lysosomes to endoplasmic reticulum that is independent of the plasma membrane." J Biol Chem 273(7): 4266-74.
- Urano, F., A. Bertolotti, et al. (2000). "IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum." J Cell Sci 113 Pt 21: 3697-702.
- Urano, F., X. Wang, et al. (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." Science 287(5453): 664-6.
- Ushioda, R., J. Hoseki, et al. (2008). "ERdj5 is required as a disulfide reductase for degradation of misfolded proteins in the ER." Science 321(5888): 569-72.
- Van den Berg, B., W. M. Clemons, Jr., et al. (2004). "X-ray structure of a protein-conducting channel." Nature 427(6969): 36-44.
- van Huizen, R., J. L. Martindale, et al. (2003). "P58IPK, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2alpha signaling." J Biol Chem 278(18): 15558-64.
- van Lith, M., A. R. Karala, et al. (2007). "A developmentally regulated chaperone complex for the endoplasmic reticulum of male haploid germ cells." Mol Biol Cell 18(8): 2795-804.
- Van, P. N., F. Peter, et al. (1989). "Four intracisternal calcium-binding glycoproteins from rat liver microsomes with high affinity for calcium. No indication for calsequestrin-like proteins in inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium sequestering rat liver vesicles." J Biol Chem 264(29): 17494-501.
- Vattem, K. M. and R. C. Wek (2004). "Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A 101(31): 11269-74.
- Vijay, I. K. (1998). "Developmental and hormonal regulation of protein N-glycosylation in the mammary gland." J Mammary Gland Biol Neoplasia 3(3): 325-36.
- Voeltz, G. K., M. M. Rolls, et al. (2002). "Structural organization of the endoplasmic reticulum." EMBO Rep 3(10): 944-50.
- Voigt, S., B. Jungnickel, et al. (1996). "Signal sequence-dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane." J Cell Biol 134(1): 25-35.
- Vuori, K., T. Pihlajaniemi, et al. (1992). "Site-directed mutagenesis of human protein disulphide isomerase: effect on the assembly, activity and endoplasmic reticulum retention of human prolyl 4-hydroxylase in Spodoptera frugiperda insect cells." Embo J 11(11): 4213-7.
- Wang, C. W. and D. J. Klionsky (2003). "The molecular mechanism of autophagy." Mol Med 9(3-4): 65-76.
- Wang, X. Z., H. P. Harding, et al. (1998). "Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses." Embo J 17(19): 5708-17.
- Wang, Z., Y. Hao, et al. (2008). "The adenocarcinoma-associated antigen, AGR2, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation." Cancer Res 68(2): 492-7.
- Ward, C. L. and R. R. Kopito (1994). "Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins." J Biol Chem 269(41): 25710-8.
- Watanabe, D., K. Yamada, et al. (1994). "Molecular cloning of a novel Ca(2+)-binding protein (calmeglin) specifically expressed during male meiotic germ cell development." J Biol Chem 269(10): 7744-9.
- Weitzmann, A., J. Volkmer, et al. (2006). "The nucleotide exchange factor activity of Grp170 may explain the non-lethal phenotype of loss of S11 function in man and mouse." FEBS Lett 580(22): 5237-40.

- Wieland, F. T., M. L. Gleason, et al. (1987). "The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface." Cell 50(2): 289-300.
- Wiertz, E. J., D. Tortorella, et al. (1996). "Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction." Nature 384(6608): 432-8.
- Wild, K., I. Sinning, et al. (2001). "Crystal structure of an early protein-RNA assembly complex of the signal recognition particle." Science 294(5542): 598-601.
- Wilkinson, B. and H. F. Gilbert (2004). "Protein disulfide isomerase." Biochim Biophys Acta 1699(1-2): 35-44.
- Williams, D. B. (2006). "Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum." J Cell Sci 119(Pt 4): 615-23.
- Wirtz, K. W. (1991). "Phospholipid transfer proteins: from lipid monolayers to cells." Klin Wochenschr 69(3): 105-11.
- Wong, B. R., F. Parlati, et al. (2003). "Drug discovery in the ubiquitin regulatory pathway." Drug Discov Today 8(16): 746-54.
- Wormald, M. R. and R. A. Dwek (1999). "Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability." Structure 7(7): R155-60.
- Worthington, Z. E. and N. H. Carbonetti (2007). "Evading the proteasome: absence of lysine residues contributes to pertussis toxin activity by evasion of proteasome degradation." Infect Immun 75(6): 2946-53.
- Wu, J., D. T. Rutkowski, et al. (2007). "ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress." Dev Cell 13(3): 351-64.
- Yamaguchi, A., O. Hori, et al. (1999). "Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation." J Cell Biol 147(6): 1195-204.
- Yamaguchi, D., D. Hu, et al. "Human XTP3-B binds to alpha1-antitrypsin variant null(Hong Kong) via the C-terminal MRH domain in a glycan-dependent manner." Glycobiology 20(3): 348-55.
- Yamamoto, K., T. Sato, et al. (2007). "Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1." Dev Cell 13(3): 365-76.
- Yang, Z. and D. J. Klionsky (2009). "An overview of the molecular mechanism of autophagy." Curr Top Microbiol Immunol 335: 1-32.
- Ye, J., R. B. Rawson, et al. (2000). "ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs." Mol Cell 6(6): 1355-64.
- Ye, Y., H. H. Meyer, et al. (2001). "The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol." Nature 414(6864): 652-6.
- Ye, Y., Y. Shibata, et al. (2005). "Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane." Proc Natl Acad Sci U S A 102(40): 14132-8.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, et al. (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress." J Biol Chem 276(17): 13935-40.
- Yorimitsu, T. and D. J. Klionsky (2007). "Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy." Trends Cell Biol 17(6): 279-85.
- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2003). "A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response." Dev Cell 4(2): 265-71.

- Yoshida, H., T. Matsui, et al. (2001). "XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor." Cell 107(7): 881-91.
- Yoshida, H., T. Okada, et al. (2000). "ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response." Mol Cell Biol 20(18): 6755-67.
- Yoshida, H., M. Oku, et al. (2006). "pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response." J Cell Biol 172(4): 565-75.
- Yoshida, Y. and K. Tanaka "Lectin-like ERAD players in ER and cytosol." Biochim Biophys Acta 1800(2): 172-80.
- Yoshihisa, T., C. Barlowe, et al. (1993). "Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum." Science 259(5100): 1466-8.
- Yu, Y. H., D. D. Sabatini, et al. (1990). "Antiribophorin antibodies inhibit the targeting to the ER membrane of ribosomes containing nascent secretory polypeptides." J Cell Biol 111(4): 1335-42.
- Zapun, A., N. J. Darby, et al. (1998). "Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57." J Biol Chem 273(11): 6009-12.
- Zapun, A., S. M. Petrescu, et al. (1997). "Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin." Cell 88(1): 29-38.
- Zhang, B., M. Spreafico, et al. (2008). "Genotype-phenotype correlation in combined deficiency of factor V and factor VIII." Blood 111(12): 5592-600.
- Zhang, J. S., A. Gong, et al. (2005). "AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer." Genes Chromosomes Cancer 43(3): 249-59.
- Zhang, K. and R. J. Kaufman (2008). "From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response." Nature 454(7203): 455-62.
- Zhang, Y., E. Baig, et al. (2006). "Functions of ERp57 in the folding and assembly of major histocompatibility complex class I molecules." J Biol Chem 281(21): 14622-31.
- Zhang, Y., S. S. Forootan, et al. (2007). "Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients." Prostate Cancer Prostatic Dis 10(3): 293-300.
- Zhang, Y., R. Liu, et al. "Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP." J Biol Chem 285(20): 15065-75.
- Zhao, F., R. Edwards, et al. "Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in Agr2^{-/-} mice." Dev Biol 338(2): 270-9.
- Zheng, W., P. Rosenstiel, et al. (2006). "Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease." Genes Immun 7(1): 11-8.
- Zhong, X., Y. Shen, et al. (2004). "AAA ATPase p97/valosin-containing protein interacts with gp78, a ubiquitin ligase for endoplasmic reticulum-associated degradation." J Biol Chem 279(44): 45676-84.
- Zhou, J., C. Y. Liu, et al. (2006). "The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response." Proc Natl Acad Sci U S A 103(39): 14343-8.
- Zhou, M. and R. Schekman (1999). "The engagement of Sec61p in the ER dislocation process." Mol Cell 4(6): 925-34.
- Zhu, H., D. C. Lam, et al. (2007). "High resolution analysis of genomic aberrations by metaphase and array comparative genomic hybridization identifies candidate tumour genes in lung cancer cell lines." Cancer Lett 245(1-2): 303-14.

- Zimmermann, R., S. Eyrisch, et al. "Protein translocation across the ER membrane." Biochim Biophys Acta.
- Zinszner, H., M. Kuroda, et al. (1998). "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum." Genes Dev 12(7): 982-95.
- Zweitzig, D. R., D. A. Smirnov, et al. (2007). "Physiological stress induces the metastasis marker AGR2 in breast cancer cells." Mol Cell Biochem 306(1-2): 255-60.

Annexes

Annexe 1

Publications et Communications

Publications et Communications

Publications

Audrey Mulot*, Frederic Delom*, Marion Bouchecareilh, Duc Thang Nguyen, Daniel Boismenu, Mickeal J. Wise, E. Chevet. Role of the PDI-family member Anterior Gradient 2 in Endoplasmic Reticulum quality control of Alpha 1 Antitrypsine. (*) equal contributor to this work. (En révision).

J. Villeneuve*, S. Lepreux*, A. Mulot, A. Bérard, Arisa Higa-Nishiyama, Pierre Costet, V. De ledinghen, P. Bioulac-Sage, C. Balabaud, Alan T. Nurden, J. Rosenbaum, E. Chevet, J. Ripoché. A protective role for CD154 in hepatic steatosis. (*) equal contributor to this work. Hepatology. (Sous presse, Hepatology).

.

Communications affichées

Communications affichées nationales :

A. Mulot, F. Delom, D.T. Nguyen, M. J. Wise, D. Boismenu, E. Chevet. *Functional characterization of the endoplasmic reticulum-ribosome interactome*. 4^{ème} Journée Cancéropole Grand Sud Ouest. Montpellier, 14-16 octobre 2008.

Communications affichées locales :

A. Mulot, F. Delom, D.T. Nguyen, M. J. Wise, D. Boismenu, E. Chevet. *Functional characterization of the endoplasmic reticulum-ribosome interactome*. 2^{ème} Journée Doc's 66 meeting. Bordeaux, 24 juin 2008.

A. Mulot, F. Delom, D.T. Nguyen, M. J. Wise, D. Boismenu, E. Chevet. *Functional characterization of the endoplasmic reticulum-ribosome interactome*. Journée scientifique de l'IFR 66 Pathologies Infectieuses et cancers. Bordeaux, 2 décembre 2008.

A. Mulot, F. Delom, D.T. Nguyen, M. J. Wise, D. Boismenu, E. Chevet. *Functional characterization of Anterior Gradient-2 (AGR2) in the Endoplasmic Reticulum*. 9^e Journée Scientifique de l'école doctorale sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, 8 avril 2009.

A. Mulot, F. Delom, D.T. Nguyen, M. J. Wise, D. Boismenu, E. Chevet. *Functional characterization of Anterior Gradient-2 (AGR2) in the Endoplasmic Reticulum*. 3^{ème} Journée Doc's 66 meeting. Bordeaux, 23 juin 2009.

A Mulot, F. Delom, DT. Nguyen, M J. Wise, M. Bouchecareilh, D. Boismenu, E. Chevet. *Identification and Characterization of Anterior Gradient 2 protein (AGR-2), a new PDI-like family member involved in the Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD) pathway.* Journée scientifique de l'IFR 66 Pathologies Infectieuses et cancers. Bordeaux, 1^{er} décembre 2009.

A Mulot, F. Delom, DT. Nguyen, M J. Wise, M. Bouchecareilh, D. Boismenu, E. Chevet. *Identification and Characterization of Anterior Gradient 2 protein (AGR-2), a new PDI-like family member involved in the Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD) pathway.* 10^e Journée Scientifique de l'école doctorale sciences de la Vie et de la Santé. Arcachon, 28 avril 2010.

A Mulot, F. Delom, DT. Nguyen, M J. Wise, M. Bouchecareilh, D. Boismenu, E. Chevet. *Identification and Characterization of Anterior Gradient 2 protein (AGR-2), a new PDI-like family member involved in the Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ERAD) pathway.* 4^{ème} Journée Doc's 66 meeting. Bordeaux, 22 juin 2010.

Annexe 2

Article

**A protective role for CD154 in hepatic steatosis
(sous presse)**



A protective role for CD154 in hepatic steatosis

Journal:	<i>Hepatology</i>
Manuscript ID:	HEP-10-0023.R1
Wiley - Manuscript type:	Original
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Villeneuve, Julien; Université de Bordeaux, INSERM U 889 Lepreux, Sébastien; Université de Bordeaux, INSERM U 889 Mulot, Audrey; Université de Bordeaux, Inserm U 889 Bérard, Annie; Université de Bordeaux, CHU de Bordeaux, Equipe Facteurs de Risque Vasculaire Higa-Nishiyama, Arisa; Université de Bordeaux, Avenir, INSERM U 889 Costet, Pierre; Université Victor Segalen Bordeaux2, Animalerie Spécialisée de Ledinghen, victor; Université de Bordeaux, CHU de Bordeaux, Service d'Hépatogastroentérologie Bioulac-Sage, Paulette; Université de Bordeaux, CHU de Bordeaux, Service d'Anatomo-Pathologie balabaud, charles; Université de Bordeaux, CHU de Bordeaux, Service d'Hépatogastroentérologie Nurden, Alan; CHU de Bordeaux, Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires Rosenbaum, Jean; Université de Bordeaux, INSERM U 889 Chevet, Eric; Université de Bordeaux, Avenir, INSERM U 889 Ripoche, Jean; Université de Bordeaux, INSERM U 889
Keywords:	Liver, CD154, Inflammation, Hepatic Steatosis, Unfolded Protein Response

SCHOLARONE™
Manuscripts

A protective role for CD154 in hepatic steatosis

Julien Villeneuve^{(1) *}, Sébastien Lepreux^{(1, 2) *}, Audrey Mulot^(1, 9), Annie M Bérard^(3, 4), Arisa Higa-Nishiyama⁽¹⁾, Pierre Costet⁽⁵⁾, Victor De Ledinghen^(1, 6), Paulette Bioulac-Sage^(1, 2), Charles Balabaud^(1, 7), Alan T Nurden⁽⁸⁾, Jean Rosenbaum⁽¹⁾, Eric Chevet^(1, 9), Jean Ripoche⁽¹⁾

(1) Inserm U889, Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France; (2) CHU de Bordeaux, Service d'Anatomo-Pathologie, F-33076 Bordeaux, France; (3) Equipe Facteurs de Risque Vasculaire, Université de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France; (4) CHU de Bordeaux, Service de Biochimie, F-33076 Bordeaux, France; (5) Université de Bordeaux, Animalerie Spécialisée, F-33076 Bordeaux, France; (6) CHU de Bordeaux, Service d'Hépatogastroentérologie, F-33600 Pessac, France; (7) CHU de Bordeaux, Service d'Hépatogastroentérologie, F-33000 Bordeaux, France; (8) CHU de Bordeaux, Centre de Référence des Pathologies Plaquettaires, F-33600 Pessac, France; (9) Avenir, Inserm U889, Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France. (*) These authors equally contributed to this work

Key-words: Liver; Inflammation; Hepatic Steatosis; CD154; Unfolded Protein Response

Correspondence: Jean Ripoche, Inserm U889, Université de Bordeaux F-33076
Bordeaux, France; e-mail : jean.ripoche@u-bordeaux2.fr; Tel : (33)0557571707 ;
FAX : (33)0556514077

Funding: work was funded by grants from INSERM and the Association Française
pour l'Etude du Foie.

Conflict of interest: The authors disclose no conflicts.

Nonstandard abbreviations used in this manuscript: apoB100, apolipoprotein B100;
ATF6, Activating transcription factor 6; CHOP, C/EBP homologous protein; ER,
endoplasmic reticulum; eIF2 α , eukaryotic initiation factor 2 α ; GRP78, 78 kDa
glucose-regulated/binding immunoglobulin protein; IRE1, inositol requiring ER-to-
nucleus signalling protein-1; NAFLD, nonalcoholic fatty liver disease; OA, oleic acid;
rsCD154, recombinant soluble CD154; PERK, ER membrane protein PKR-like ER
kinase; SREBP-1c, sterol regulatory element binding protein-1c; TM, tunicamycin;
TG, triglyceride; UPR, unfolded protein response; VLDL, very low density lipoprotein;
XBP1, X-Box binding protein 1; WT, wild type

Abstract

Inflammation and lipid metabolism pathways are linked and deregulation of this interface may be critical in hepatic steatosis. The importance of the dialog between inflammatory signalling pathways and the unfolded protein response (UPR) in metabolism has been underlined. Herein, we studied the role of CD154, a key mediator of inflammation, in hepatic steatosis. To this end, Balb/c mice, wild type or deficient in CD154 (CD154KO), were fed an olive oil-rich diet. *In vitro*, the effect of CD154 was studied on primary hepatocyte cultures and hepatocyte-derived cell lines. Results showed that CD154KO mice fed an olive oil-rich diet developed hepatic steatosis associated with reduced apolipoprotein B100 (apoB100) expression and decreased secretion of very low density lipoproteins. This phenotype correlated with an altered UPR as assessed by reduced X-Box binding protein 1 (XBP1) mRNA splicing and reduced phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 α (eIF2 α). Altered UPR signalling in livers of CD154KO mice was confirmed in tunicamycin (TM) challenge experiments. Treatment of primary hepatocyte cultures and hepatocyte-derived cell lines with soluble CD154 increased XBP1 mRNA splicing in cells subjected to either oleic acid (OA) or TM treatment. Moreover, CD154 reduced the inhibition of apoB100 secretion by HepG2 cells grown in the presence of high concentrations of OA, an effect suppressed by XBP1 mRNA silencing and in HepG2 cells expressing a dominant negative form of IRE1. The control of the UPR by CD154 may represent one of the mechanisms involved in the pathophysiology of hepatic steatosis. In conclusion, our study identifies CD154 as a new mediator of hepatic steatosis.

Introduction

The accumulation of triglycerides (TG) in hepatocytes is a common phenomenon in liver disease. Several mechanisms can account for hepatic steatosis, including increased free fatty acid flux to the liver through diet or peripheral TG lipolysis, defective fat oxidation, increased lipogenesis or decreased very low density lipoprotein (VLDL) export. These mechanisms have been proposed as causal explanations for hepatic steatosis associated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) (1-4). The endoplasmic reticulum (ER) is an essential organelle in lipid metabolism. First, VLDL generation depends on a functional ER (5-9). Second, excessive lipid input in hepatocytes, as observed in NAFLD patients, in animal models of fatty livers or in cultured cells is associated with ER stress, the underlying mechanisms remaining poorly understood (10-16). In these contexts, ER stress contributes to steatosis through various mechanisms, including increased degradation of apoB100 and hepatic lipogenesis through insulin-independent activation of the transcription factor SREBP-1c (14, 17-20). ER stress signalling pathways, collectively named the Unfolded Protein Response (UPR), regulate ER homeostasis (21-24). The UPR is important for hepatocyte ER adaptation to excessive lipid input in conditions associated with ER stress. (21-23). Indeed, the genetic ablation of either branch of the UPR leads to hepatic steatosis in acute ER stress conditions (25, 26), whereas enforced maintenance of ER homeostasis increases apoB100 secretion, prevents SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice or cell culture models (9, 14, 18-20). Beyond their conventional role in monitoring ER homeostasis in acute ER stress, UPR effectors are activated under physiological conditions, regulate glucose and lipid metabolic pathways, thus contributing to basal cellular homeostasis (27, 28). Importantly, the UPR signalling

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

intersects with other signalling cascades, rendering the former amenable to regulation by signals other than directly resulting from ER stress. Among them, inflammatory signals may have a specific importance (27). Inflammatory mediators may be key regulators in the progression of hepatic steatosis (29-31) and the deregulation of the interface between the UPR and inflammation signaling pathways may be instrumental in metabolic disorders (30, 32-34). Here, we study CD154, a member of the Tumor Necrosis Factor (TNF) superfamily, and a critical mediator of inflammation (35). The main reservoir of CD154 in the organism is the blood platelet (36, 37). CD154 expression is inducible by pro-inflammatory cytokines, and a soluble form (sCD154) retaining biological activity is released from cell surface by an poorly defined mechanism (38). sCD154 levels are increased in the metabolic syndrome (39, 40). Similar to TNF- α receptors activation, CD154 binding to its receptor, CD40, leads to the formation of a trimeric complex which triggers an intricate signalling cascade ending in a pleiotropic range of consequences in inflammation, immunity or cell survival (35, 38). Here, we tested whether CD154 was involved in the regulation of lipid processing in the liver. We used CD154 deficient mice (CD154KO mice) and cell culture models. Our results indicate a protective role for CD154 in hepatic steatosis.

Experimental procedures

Mice

Male Balb/c CD154KO mice were generated from male B16/C CD154KO (B6.129S2-*CD40lg^{tm1/mx}/J*) mice (Jackson Laboratory, ME) by repeated (≥ 10) backcrossings. Mice were housed in a temperature-controlled specific pathogen free environment (transgenic animal housing of Bordeaux 2 University) with a 12 h light/dark cycle and given free access to food and water. Additional information concerning CD154KO mice is provided in supplemental experimental procedures. The study followed guidelines of and was approved by the animal research ethical committee of Aquitaine Poitou-Charentes. Ten-twelve week-old mice were used.

Olive oil administration and tunicamycin injections in mice

Olive oil (olive oil for human consumption, Puget®, France) was administered by gavage, 6.6 mL/kg of body weight, three times a week. Tunicamycin (TM) (Merck Darmstadt, FRG) or vehicle was administered as a single intraperitoneal injection at 0.5 mg/kg of body weight.

Primary cell cultures and cell lines, experimental procedures with cultured cells, histology and immunostaining procedures, liver lipid and plasma metabolic parameter measurements, TG production rate study, real time quantitative RT-PCR procedures and primers, RNA interference experiments, preparation of liver extracts, immunoprecipitations, immunoblot procedures and antibodies, flow cytometry, ELISA, immunoelectron microscopy and statistics are described in supplemental experimental procedures.

Results

Hepatic steatosis in CD154KO mice

CD154KO mice fed with an olive oil-rich diet developed a major hepatic steatosis. Differences between WT and CD154KO mice were macroscopically observable and confirmed by microscopic examination. A marked centrilobular steatosis was noted in CD154KO mice, with neither visible lobular inflammation nor signs of hepatocyte damage, as assessed by morphological examination, (Figure 1A). The absence of hepatocyte damage was also shown by serum liver enzyme measurements (Figure 1B). Further, there were no signs of apoptosis as assessed by caspase 3 immunostaining (Figure 1C) and TUNEL staining (data not shown). Features were evocative of simple steatosis (41) and confirmed by oil red O-staining of frozen tissue sections (data not shown) and liver TG measurements (Figure 1D). These results identified CD154 as a novel factor interfering with fat processing in the liver.

The hepatic VLDL export is impaired in CD154KO mice

Plasma TG and TG-containing lipoproteins (VLDL) were decreased in CD154KO mice fed an olive oil-rich diet (Figure 2A and Supplemental Table 1). There was a modest and not significant reduction in WT mice, consistent with the absence of increased plasma VLDL-TG following diets enriched in unsaturated fats (42). We next studied the *in vivo* plasma TG production rate after VLDL clearance inhibition by Triton WR 1339. As shown in Figure 2B, CD154KO mice exhibited significant lower rates of hepatic TG secretion compared to WT mice. Results indicated thus that the reduced plasma VLDL concentrations in CD154KO mice resulted from an impaired hepatic export of TG-rich lipoproteins.

ApoB100 expression is reduced in CD154KO mouse livers fed an olive oil-rich diet

ApoB100, a key structural component of VLDL is primarily expressed in the mammalian liver and is essential to VLDL secretion (7, 43). Both WT and CD154KO mice displayed increased liver apoB100 mRNA levels when fed an olive oil-rich diet with no significant difference between either mouse strain (Figure 3A). However, apoB100 protein expression was reduced in CD154KO mice compared to WT mice following the olive oil-rich diet (Figure 3B). Messenger RNA and protein expression of microsomal triglyceride transfer protein (MTTP), which is required for VLDL assembly and secretion, were not modified for both mouse strains fed the olive oil-rich diet (Figures 3C and 3D).

Increased lipogenic enzyme gene expression in CD154KO mice fed an olive oil-rich diet

As steatosis may result from alterations in uptake, synthesis, storage and/or oxidation of fatty acids in liver, we studied genes involved in these pathways (Table 1). There was no modification of the fatty acid transporters FABP1 and SLC27A1 expression. However, lipogenic genes ACC, FAS and SCD-1 were significantly up-regulated in CD154KO mouse livers for animals fed an olive oil-rich diet. The expression of these latter genes relies on the activation of transcription factors such as SREBP-1c. SREBP-1c was indeed activated in livers of CD154KO mice receiving olive oil (Figure 3E). SREBP-1c mRNA was also up-regulated, most likely through self-activation of its promoter (20) (Figure 3F). The hepatocyte major lipid droplet-associated protein, ADFP, was up-regulated by the fat diet in both mouse strains. Fat oxidation gene expression was not altered in CD154KO mice, as exemplified by the lack of change in expression of the main mitochondrial fatty acid transporter CPT-1A, of the acyl

CoA dehydrogenases MCAD and LCAD, and of ACOX-1. Transcription factors PPAR α and ChREBP expression was not significantly modified. Finally, there was no difference in plasma insulin levels between both strains (Supplemental table 1). Treatment of HepG2 cells with CD154 did not directly alter the gene expression of ACC, FAS and SCD-1 (data not shown). Altogether, results showed that CD154 deficiency was associated with hepatic steatosis, decreased plasma VLDL and apoB100 expression, and increased expression of lipogenic genes in mice fed an olive oil-rich diet. Lipid homeostasis is dependent on an integrated network of signalizations, in which inflammatory and UPR signalling pathways are critical. As CD154 stimulates the production of proinflammatory cytokines, its absence may lead to a deregulation of this network. In this study, we examined the UPR.

Altered eIF2 α phosphorylation and XBP1 mRNA splicing in mice fed an olive oil-rich diet

The UPR is organized in three signalling pathways triggered through the activation of proximal sensors, IRE1, PERK, and ATF6 (23, 44-47). To monitor the UPR, we studied PERK and IRE1 α phosphorylation and ATF6 cleavage, together with the expression of phospho-eIF2 α and of alternatively spliced XBP1 mRNA, downstream effectors of activated PERK and IRE1, respectively. A moderate induction of IRE1 phosphorylation was observed in WT mice, whereas no obvious induction was observed in CD154KO mice. PERK phosphorylation was not noticeably induced in either strain. There was a moderate decreased expression of the 90 kDa ATF6 precursor band following the olive oil diet, suggesting cleavage-induced activation, with no differences between either mouse strain (Figure 4A-C). On the other hand, whereas eIF2 α phosphorylation and XBP1 mRNA splicing were induced in the WT

1
2
3 mice, these inductions were not observed in CD154KO mouse livers (Figure 4E and
4
5
6 F). The expression of GRP78 did not vary in either mouse strains when fed the olive
7
8 oil-rich diet (Figure 4D). Finally, C/EBP homologous protein (CHOP), a key
9
10 intermediate in ER stress-mediated apoptosis (48), remained undetectable by
11
12 immunostaining and immunoblot analysis in both WT and CD154KO livers (data not
13
14 shown), thus correlating with the absence of morphological and biochemical signs of
15
16 hepatocyte apoptosis. Altogether these results show that olive oil induced only a low
17
18 level of induction of ER stress in the liver. However, CD154KO mice subjected to the
19
20 olive-oil rich diet showed altered XBP1 mRNA splicing and eIF2 α phosphorylation.
21
22
23
24
25
26

27 *Hepatic steatosis and altered unfolded protein response in CD154KO mouse livers*
28
29 *following tunicamycin treatment*
30

31
32 To test whether such alterations were found in a stronger ER stress induction model,
33
34 mice were challenged with a single, subtoxic dose of TM, a N-glycosylation inhibitor
35
36 widely used as an ER stress inducer. TM administration leads to acute ER stress,
37
38 and, in conditions associated with a defective UPR signalling, to lipid homeostasis
39
40 disruption and hepatic steatosis (25, 26, 49). As expected (13, 18, 26), TM
41
42 administration resulted in moderate hepatic steatosis in WT mice. In contrast, a major
43
44 hepatic steatosis was observed in CD154KO mice (Figure 5A). There was no
45
46 detectable apoptosis in WT and CD154KO mouse livers 24 hours after injection as
47
48 assessed by activated caspase 3 immunostaining (Supplemental Figure 1A) and
49
50 TUNEL staining (data not shown), and liver enzymes were modestly elevated (Figure
51
52 5B). Moreover, although CHOP and c-Jun N-terminal kinase (JNK) inductions at 8
53
54 hours were higher in CD154KO mice as compared to WT mice, at 24 hours,
55
56 sustained CHOP expression was not obvious, and JNK activation was identical in
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

both mouse strains (Figure 5C and Supplemental Figure 1B). GRP78 expression was increased by TM administration but no major difference between the strains was observed (Figure 5D). In WT mice, TM induced PERK and IRE1 phosphorylation, decreased expression of the 90 kDa ATF6 precursor band, suggesting cleavage-induced activation, eIF2 α phosphorylation and XBP1 mRNA splicing. In contrast, in CD154KO livers, PERK and eIF2 α phosphorylations as well as XBP1 mRNA splicing were reduced at 24 hours (Figure 5E and F). Finally, we found an increased lethality in CD154KO mice challenged with TM after 24 hours. This may reflect extra hepatic TM-dependent toxicity, as hepatocyte damage was minimal in these conditions. Altogether, results showed that the main liver phenotype associated with CD154 deficiency in TM-injected mice was hepatic steatosis and suggested compromised eIF2 α phosphorylation and XBP1 mRNA splicing. We therefore hypothesized that the CD154 signalling might interfere with the UPR.

CD154 treatment increases XBP1 mRNA splicing in tunicamycin- and oleic acid-treated primary hepatocyte and hepatocyte-derived cell line cultures.

We tested the hypothesis of a connection between CD154 and UPR signalling in cultured cells. CD40 is the canonical CD154 receptor. It was expressed in mouse and human hepatocytes as well as in HepG2, SNU 398, SNU 475, Hep3B, SKHep1 and H2M cells (Supplemental Figure 2A). In mouse livers, electron microscopy confirmed expression of CD40 on hepatocytes and showed expression in Kupffer, hepatic stellate and endothelial cells (Supplemental Figure 2B). Moreover, CD40 was similarly expressed in CD154KO and WT mouse livers (Supplemental Figure 2C). In TM-treated HepG2 cells, the UPR was activated as TM induced a peak of XBP1 mRNA splicing at 12 hours (Figure 6A), and increased eIF2 α phosphorylation

(Supplemental Figure 3A). The addition of rsCD154 prolonged the XBP1 mRNA splicing (Figure 6A) an effect that was significantly inhibited by antibody-induced CD40 neutralization (Figure 6C) or by siRNA-mediated CD40 silencing (Supplemental Figure 4). These results were confirmed in SNU398, SNU475 and SKHEP1 cells (data not shown). The HepG2 cell line was then chosen as an alternative to hepatocytes to investigate the effect of CD154 in HepG2 cells grown in the presence of OA (the major fatty acid in olive oil). Two mM OA activated the UPR as a peak of XBP1 mRNA splicing at 4 hours (Figure 6B), and increased eIF2 α phosphorylation (Supplemental Figure 3B) were observed. The addition of rsCD154 resulted in prolonged and amplified splicing of XBP1 mRNA (Figure 6B), an effect that was suppressed by CD40 neutralization (Figure 6D) or siRNA-mediated CD40 silencing (Supplemental Figure 4). Thus, *in vitro*, CD154 increases XBP1 mRNA splicing upon TM or OA treatments, suggesting a regulatory connection between the CD154-CD40 signalling and the UPR. Finally, CD154 reduced cell death upon long-term exposure to 2 mM OA, suggesting increased cell adaptation to the OA challenge (Supplemental Figure 5). We then asked whether CD154 could control apoB100 secretion through regulation of XBP1 mRNA splicing.

CD154 alleviates the inhibition of apoB100 secretion upon OA treatment.

As observed for McA-RH7777 cells (14), high OA concentrations led to an inhibition of apoB100 secretion by HepG2 cells (Supplemental Figure 6). The addition of rsCD154 partially rescued apoB100 secretion, and this was inhibited by the antibody-mediated neutralization of CD40 (Figure 7A). CD154 treatment did not modify apoB100 mRNA expression and protein secretion in HepG2 cells not exposed to OA (data not shown). Moreover, the effect of CD154 on apoB100 secretion was

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

suppressed in HepG2 cells expressing a dominant negative form of IRE1 (50), Figure 7B) and after siRNA-mediated silencing of XBP1 (Figure 7C). These results suggested that the IRE1/XBP1 signalling contributed to the CD154-mediated stimulation of apoB100 secretion.

Olive oil-rich diet increases the expression of CD154.

A role for CD154 in hepatic steatosis raises the question of its origin in the context of a fat-rich diet. Activated platelets are the primary source of CD154 in the organism (36, 37). Hyperlipidemia has been previously associated with platelet activation and release of sCD154 (51, 52). We monitored platelet activation and CD154 expression both on platelets and in a circulating soluble form, in mice subjected to an olive oil-rich diet or to TM treatment. In both situations, there was increased expression of P-selectin on platelets, suggesting their activation (Supplemental Figure 7A and B). Both circulating sCD154 (Supplemental Figure 7C and D) and platelet-associated CD154 (Supplemental Figure 7E and F) were increased following the olive oil-rich diet and the TM treatment in WT mice. Therefore, the olive oil-rich diet led to platelet activation and to increased circulating sCD154 levels.

Discussion

The natural history of hepatic steatosis results from a complex interplay between metabolic, endocrine and immune pathways (1, 3, 4, 31, 32, 53). The dialog between inflammatory and metabolic pathways is emerging as being of increasing importance in metabolic diseases. However, mediators involved in these responses remain incompletely defined. The major finding of our study is the identification of CD154 as a new regulatory mediator in the natural history of hepatic steatosis. CD154 deficiency increases the susceptibility of mice to develop hepatic steatosis when fed an olive oil-rich diet. The steatotic phenotype of the CD154KO mice is associated with an impairment of VLDL secretion by the liver and increased expression of lipogenic genes. CD154KO mice do not show signs of hepatocyte damage after 3 weeks of olive oil-rich diet, making this regimen potentially interesting to study mechanisms leading to simple steatosis, a first step in the progression of NAFLD (54).

UPR signalling pathways intersect with lipid metabolic pathways, and impairment of the UPR branches in ER stress conditions is associated to TG accumulation (9, 14, 18-20, 26). Several arguments suggest that one of the mechanisms by which CD154 is protective against steatosis is through regulatory interactions with the UPR. First, we evidenced a defect in UPR signalling in CD154KO mice fed olive oil, as shown by reduced XBP1 mRNA splicing and eIF2 α phosphorylation. Such defects were also seen when mice were challenged by the prototypical ER stress inductor, TM. In that case, we could clearly also demonstrate the activation of the upstream UPR transducers IRE1 and PERK; this was not the case in olive oil-fed animals, which is likely due to the much lower level of stress in that condition. We cannot however exclude that the distinctive decreased eIF2 α phosphorylation observed in CD154KO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

mice may be linked to ER-stress independent regulations, through CD40-connected
kinase pathways. Indeed, eIF2 α can be the substrate of PERK-independent kinase
activation pathways (28, 55). Secondly, we used an *in vitro* model partly mimicking
the *in vivo* situation, by using HepG2 cells treated with OA, the main component of
olive oil, with or without added CD154. High amounts of oleate lead to hepatocyte TG
accumulation, linked in part to the ER stress-dependent inhibition of apoB100
secretion (14). In our hands, OA led to UPR activation as shown by increased XBP1
splicing, an effect that was enhanced in presence of CD154. Importantly, CD154
alleviated the reduction of apoB100 secretion in HepG2 cells grown in the presence
of OA, an effect dependent on the activation of the IRE1 pathway, as shown by its
abrogation when using HepG2 IRE1 DN or with XBP1 silencing. Our work highlights
a possible connection between CD40 and UPR signalling pathways in the liver. Other
examples of extracellular signals modulating UPR pathways have been reported.
Toll-like receptor signalling interferes with the UPR by regulating the ATF4-CHOP
pathway and the insulin-like growth factor-1 also regulates ER stress pathways (56-
58). Finally, XBP1 mRNA splicing in spleen B cells during plasma cell differentiation
is induced by antibody-mediated CD40 activation (59, 60). The regulation of the UPR
by extra-cellular signals may represent a way by which the environment controls cell
adaptation to stress. How the IRE1 and the CD40 signalling pathways interact
remains an open question. The recruitment of TNF receptor-associated factor
(TRAF)-2 mediates the pro-inflammatory consequences of CD154/CD40 interaction
(61, 62). As IRE1 recruits TRAF2 upon activation, TRAF2 may represent a potential
link between the CD40 and IRE1 signalization pathways.

Our study does not exclude other mechanisms through which CD154 may interfere
with the progression of liver steatosis. These may involve deregulation of the cytokine

network. Indeed, CD154 induces inflammatory cytokines, some of which play a role in lipid metabolism, such as IL-6. IL-6 alleviates liver steatosis and diet-induced steatohepatitis (63, 64) and IL-6^{-/-} mice develop mature-onset obesity and are prone to major hepatic steatosis and metabolic alterations (65, 66). According to the regulatory role of CD154 on IL-6 expression, we found that CD154KO mice showed impaired induction of IL-6 following the olive oil-rich diet as shown by a reduced induction of plasma levels and liver IL-6 mRNA (Supplemental Figure 8A and B). Hence, the down-regulation of IL-6 expression may provide another mechanism to explain the steatotic phenotype of olive oil-fed CD154KO mice. ER stress also leads to IL-6 production through XBP-1 signalling (59, 67) and, accordingly, in HepG2 cells expressing a dominant negative form of IRE1, TM-induced expression of IL-6 was impaired. In this context, the CD154-dependent IL-6 induction was preserved (Supplemental Figure 8C and D). Therefore, the control of IL-6 expression is likely to represent another interface linking CD154, the UPR and hepatic lipid metabolism. This observation suggests that several integrated signalling pathways are likely to account for the contribution of CD154 in hepatic steatosis.

In conclusion, our study shows that CD154 is a mediator involved in the natural history of hepatic steatosis. CD154 appears as a new link between lipid metabolism and inflammation in the liver, supporting the idea of interdependency between inflammation and metabolic disorders (27, 32).

References

1. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-1231.

2. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004;114:147-152.

3. Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:46-53.

4. Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol Rev* 2008;60:311-357.

5. Olofsson SO, Asp L, Boren J. The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1999;10:341-346.

6. Shelness GS, Sellers JA. Very-low-density lipoprotein assembly and secretion. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:151-157.

7. Fisher EA, Ginsberg HN. Complexity in the secretory pathway: the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *J Biol Chem* 2002;277:17377-17380.

8. Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett* 2006;580:5484-5491.

9. Gregor MG, Hotamisligil GS. Adipocyte stress: The endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 2007.

10. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 2004;306:457-461.

11. Nakatani Y, Kaneto H, Kawamori D, Yoshiuchi K, Hatazaki M, Matsuoka TA, Ozawa K, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* 2005;280:847-851.

12. Borradaile NM, Han X, Harp JD, Gale SE, Ory DS, Schaffer JE. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. *J Lipid Res* 2006;47:2726-2737.

13. Yang L, Jhaveri R, Huang J, Qi Y, Diehl AM. Endoplasmic reticulum stress, hepatocyte CD1d and NKT cell abnormalities in murine fatty livers. *Lab Invest* 2007;87:927-937.

14. Ota T, Gayet C, Ginsberg HN. Inhibition of apolipoprotein B100 secretion by lipid-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in rodents. *J Clin Invest* 2008;118:316-332.

15. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, Sanyal AJ. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2008;134:568-576.

16. Su Q, Tsai J, Xu E, Qiu W, Bereczki E, Santha M, Adeli K. Apolipoprotein B100 acts as a molecular link between lipid-induced endoplasmic reticulum stress and hepatic insulin resistance. *Hepatology* 2009;50:77-84.

17. Shimomura I, Bashmakov Y, Horton JD. Increased levels of nuclear SREBP-1c associated with fatty livers in two mouse models of diabetes mellitus. *J Biol Chem* 1999;274:30028-30032.

18. Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, et al. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest* 2001;107:1263-1273.

19. Qiu W, Kohen-Avramoglu R, Mhapsekar S, Tsai J, Austin RC, Adeli K. Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress promotes ApoB100 degradation: evidence for Grp78-

- mediated targeting to proteasomal degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:571-577.
20. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, Luquet S, Magnan C, Koike T, Ferre P, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest* 2009;119:1201-1215.
21. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005;115:2656-2664.
22. Bernales S, Papa FR, Walter P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006;22:487-508.
23. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519-529.
24. Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 2008;320:1492-1496.
25. Yamamoto K, Takahara K, Oyadomari S, Okada T, Sato T, Harada A, Mori K. Induction of Liver Steatosis and Lipid Droplet Formation in ATF6{alpha}-knockout Mice Burdened with Pharmacological Endoplasmic Reticulum Stress. *Mol Biol Cell*.
26. Rutkowski DT, Wu J, Back SH, Callaghan MU, Ferris SP, Iqbal J, Clark R, et al. UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev Cell* 2008;15:829-840.
27. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*;140:900-917.
28. Rutkowski DT, Hegde RS. Regulation of basal cellular physiology by the homeostatic unfolded protein response. *J Cell Biol*;189:783-794.
29. Choi S, Diehl AM. Role of inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:702-707.
30. Wellen KE, Hotamisligil GS. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111-1119.
31. Shoelson SE, Herrero L, Naaz A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. *Gastroenterology* 2007;132:2169-2180.
32. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006;444:860-867.
33. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, et al. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 2006;124:587-599.
34. Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature* 2008;454:455-462.
35. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* 2000;67:2-17.
36. Andre P, Nannizzi-Alaimo L, Prasad SK, Phillips DR. Platelet-derived CD40L: the switch-hitting player of cardiovascular disease. *Circulation* 2002;106:896-899.
37. Viallard JF, Solanilla A, Gauthier B, Contin C, Dechanet J, Grosset C, Moreau JF, et al. Increased soluble and platelet-associated CD40 ligand in essential thrombocythemia and reactive thrombocytosis. *Blood* 2002;99:2612-2614.
38. Schonbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:4-43.
39. Angelico F, Alessandri C, Ferro D, Pignatelli P, Del Ben M, Fiorello S, Cangemi R, et al. Enhanced soluble CD40L in patients with the metabolic syndrome: Relationship with in vivo thrombin generation. *Diabetologia* 2006;49:1169-1174.
40. Natal C, Restituto P, Inigo C, Colina I, Diez J, Varo N. The proinflammatory mediator CD40 ligand is increased in the metabolic syndrome and modulated by adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2319-2327.

41. Brunt EM, Tiniakos DG. Pathological features of NASH. *Front Biosci* 2005;10:1475-1484.

42. Lai HC, Lasekan JB, Yang H, Clayton MK, Ney DM. In vivo determination of triglyceride secretion using radioactive glycerol in rats fed different dietary saturated fats. *Lipids* 1991;26:824-830.

43. Kim E, Young SG. Genetically modified mice for the study of apolipoprotein B. *J Lipid Res* 1998;39:703-723.

44. Cox JS, Shamu CE, Walter P. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 1993;73:1197-1206.

45. Mori K, Ma W, Gething MJ, Sambrook J. A transmembrane protein with a cdc2+/CDC28-related kinase activity is required for signaling from the ER to the nucleus. *Cell* 1993;74:743-756.

46. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005;74:739-789.

47. Todd DJ, Lee AH, Glimcher LH. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008;8:663-674.

48. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ* 2004;11:381-389.

49. Wu J, Rutkowski DT, Dubois M, Swathirajan J, Saunders T, Wang J, Song B, et al. ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress. *Dev Cell* 2007;13:351-364.

50. Cameron PH, Chevet E, Pluquet O, Thomas DY, Bergeron JJ. Calnexin phosphorylation attenuates the release of partially misfolded alpha1-antitrypsin to the secretory pathway. *J Biol Chem* 2009;284:34570-34579.

51. Cipollone F, Mezzetti A, Porreca E, Di Febbo C, Nutini M, Fazia M, Falco A, et al. Association between enhanced soluble CD40L and prothrombotic state in hypercholesterolemia: effects of statin therapy. *Circulation* 2002;106:399-402.

52. Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M, Salomon RG, Ma Y, Valiyaveetil M, Poliakov E, et al. Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med* 2007;13:1086-1095.

53. Li Z, Diehl AM. Innate immunity in the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 2003;19:565-571.

54. Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Mod Pathol* 2007;20 Suppl 1:S40-48.

55. Wek RC, Jiang HY, Anthony TG. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem Soc Trans* 2006;34:7-11.

56. Novosyadlyy R, Kurshan N, Lann D, Vijayakumar A, Yakar S, LeRoith D. Insulin-like growth factor-I protects cells from ER stress-induced apoptosis via enhancement of the adaptive capacity of endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ* 2008;15:1304-1317.

57. Cadoret A, Rey C, Wendum D, Elriz K, Tronche F, Holzenberger M, Housset C. IGF-1R contributes to stress-induced hepatocellular damage in experimental cholestasis. *Am J Pathol* 2009;175:627-635.

58. Woo CW, Cui D, Arellano J, Dorweiler B, Harding H, Fitzgerald KA, Ron D, et al. Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nat Cell Biol* 2009;11:1473-1480.

59. Iwakoshi NN, Lee AH, Glimcher LH. The X-box binding protein-1 transcription factor is required for plasma cell differentiation and the unfolded protein response. *Immunol Rev* 2003;194:29-38.

60. Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol* 2003;4:321-329.
61. Lee SY, Reichlin A, Santana A, Sokol KA, Nussenzweig MC, Choi Y. TRAF2 is essential for JNK but not NF-kappaB activation and regulates lymphocyte proliferation and survival. *Immunity* 1997;7:703-713.
62. Lee HH, Dempsey PW, Parks TP, Zhu X, Baltimore D, Cheng G. Specificities of CD40 signaling: involvement of TRAF2 in CD40-induced NF-kappaB activation and intercellular adhesion molecule-1 up-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:1421-1426.
63. Hong F, Radaeva S, Pan HN, Tian Z, Veech R, Gao B. Interleukin 6 alleviates hepatic steatosis and ischemia/reperfusion injury in mice with fatty liver disease. *Hepatology* 2004;40:933-941.
64. Mas E, Danjoux M, Garcia V, Carpentier S, Segui B, Levade T. IL-6 deficiency attenuates murine diet-induced non-alcoholic steatohepatitis. *PLoS One* 2009;4:e7929.
65. Kroy DC, Beraza N, Tschaharganeh DF, Sander LE, Erschfeld S, Giebeler A, Liedtke C, et al. Lack of interleukin-6/glycoprotein 130/signal transducers and activators of transcription-3 signaling in hepatocytes predisposes to liver steatosis and injury in mice. *Hepatology*;51:463-473.
66. Wallenius V, Wallenius K, Ahren B, Rudling M, Carlsten H, Dickson SL, Ohlsson C, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat Med* 2002;8:75-79.
67. Gargalovic PS, Gharavi NM, Clark MJ, Pagnon J, Yang WP, He A, Truong A, et al. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2490-2496.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

We thank Chantal Combe, Jérôme Gabet, Alexandra Nicou and Antonio Palos Pinto for technical help.

For Peer Review

Figure legends

Figure 1: Hepatic steatosis in CD154KO mice

(A): Macroscopic (top panel) and microscopic examination of WT and CD154KO mouse livers (bottom panel, high and low magnifications of HE-stained sections of hepatic tissue (upper and lower rows, respectively)). Representative illustrations of n=8 mice in each group fed for 3 weeks on sham diet, n=10 mice in each group fed for 3 weeks on olive oil-rich diet (Olive oil diet) (T=3 weeks), and n=8 mice in each group fed for 10 weeks on olive oil-rich diet (T=10 weeks). (B): Serum concentrations of gamma-glutamyl-transferase (γ -GT), alanine aminotransferase (ALAT) and aspartate aminotransferase (ASAT) in WT and CD154KO mice (n=8 mice in each group, fed for 3 weeks on sham diet or on olive oil-rich diet (Olive oil diet) (mean $\pm$ SD). (C): active caspase 3 representative immunostaining of liver tissue sections from WT and CD154KO mice (n=2 mice in each group). Bottom inserts depict a tissue section from CCl₄-treated CD154KO mouse, as a positive control, at two different magnifications. (D): TG quantification was performed on liver samples from mice fed for 3 weeks on sham diet (mean $\pm$ SD, n=3), or olive oil-rich diet (Olive oil diet) (mean $\pm$ SD, n=8, *p<0.05).

Figure 2: Impaired VLDL hepatic secretion in CD154KO mice

(A): FPLC analysis of plasma lipoproteins in mice. The triglyceride (continuous line) and cholesterol (dotted line) distribution in pooled plasma lipoproteins from 4h-fasted WT and CD154KO mice (n=7 mice in each group) at time 0 (top panels) and following 3 weeks of olive oil-rich diet (bottom panels) is shown. The elution positions of VLDL, IDL, LDL, HDL lipoproteins are indicated. Arrows highlight the VLDL fraction. (B): *In vivo* TG production rates were estimated after blocking lipase

activities and TG-rich lipoprotein clearance with tyloxapol, in 4h-fasted WT and CD154KO mice after 3-weeks of olive oil-rich diet (n=5 mice in each group, mean $\pm$ SD, * p<0.05).

Figure 3: ApoB100, MTTP expression and activation of SREBP-1c in CD154KO mice (A and C): Fold-induction of apoB100 (A) and microsomal triglyceride transfer protein (MTTP) (C) mRNAs in WT and CD154KO livers from mice fed for 3 weeks on sham diet or olive oil-rich diet (Olive oil diet) (mean $\pm$ SD, n=8 mice in each group; * p<0.05). Data are normalized to WT mice in sham diet condition. (B and D): ApoB100 (B) and MTTP (D) immunoblots from WT and CD154KO liver lysates of mice fed for 3 weeks on sham diet or olive oil-rich diet (Olive oil diet) (CNX, calnexin). (E): Immunoblot of the SREBP-1c nuclear form (nSREBP-1c) from nuclear extracts and immunoblot of SREBP-1c precursor form (pSREBP-1c) from microsomal extracts of WT and CD154KO livers from mice fed for 3 weeks on sham diet or on olive oil-rich diet (Olive oil diet). (F): Fold-induction of SREBP-1c mRNA in WT and CD154KO livers from mice fed for 3 weeks on sham diet or on olive oil-rich diet (Olive oil diet) (mean $\pm$ SD, n=8 mice in each group; * p<0.05). Data are normalized to WT mice in sham diet condition. Lamin A/C and calnexin (CNX), were used as loading controls for nuclear and microsomal extract immunoblots, respectively.

Figure 4: Altered UPR in CD154KO mouse livers following the olive oil-rich diet Immunoblots of (A) Phospho-PERK (P-PERK) and total PERK, (B) Phospho-IRE1 (P-IRE1) and total IRE1, (C) ATF6 (depicting the 90 kDa mouse precursor species predominantly recognized by the antibody used), (D) GRP78 and, (E) Phospho-eIF2 α (P-eIF2 α) and total eIF2 α , from WT and CD154KO liver lysates from mice fed

for 3 weeks on sham diet or on olive oil-rich diet (Olive oil diet) (CNX, calnexin). (F): Fold-induction of the spliced to unspliced ratio of XBP1 mRNA (XBP1s/u) from WT and CD154KO livers from mice fed for 3 weeks on sham diet or on olive oil-rich diet (Olive oil diet) (mean $\pm$ SD, n=8; * p<0.05). Data are normalized to results from WT mice in sham diet condition.

Figure 5: Major hepatic steatosis and altered UPR in livers of CD154KO tunicamycin (TM)-treated mice

(A): Photographs of representative livers (n=4 mice in each group) (top panels) and HE-stained liver sections at high (middle panels) and low (bottom panels) magnifications of WT and CD154KO mice 24 hours after vehicle or TM injection. (B): Serum concentrations of ASAT and ALAT in WT and CD154KO mice 24 hours after vehicle injection and 8 and 24 hours after TM injection (mean $\pm$ SD, n=4 mice in each group; * p<0.05). (C top panel): CHOP representative immunostaining (n=3 mice in each group) of liver sections from WT and CD154KO mice 24 hours after vehicle injection and 8 and 24 hours after TM injection. (C, bottom panel): CHOP immunoblots (representative of 3 performed) from liver lysates of WT and CD154KO mice 24 hours after vehicle injection and 8 and 24 hours after TM injection. (D and E): immunoblots of (D) GRP78 from liver lysates of WT and CD154KO mice 24 hours after vehicle injection and 8 and 24 hours after TM injection and (E) Phospho-PERK (P-PERK) and total PERK, Phospho-IRE1 (P-IRE1) and total IRE1 and ATF6 from livers lysates of WT and CD154KO mice 24 hours after vehicle injection and 8 and 24 hours after TM injection (representative of 2 performed on pools of three mice) (CNX, calnexin). (F, top panel): Fold-induction of the spliced to unspliced ratio of XBP1 mRNA (XBP1s/u) from WT and CD154KO mouse livers, 24 hours after vehicle

1
2
3 injection and 8 and 24 hours after TM injection (mean $\pm$ SD, n=3 for vehicle and T=8
4
5 hours; n=6 for T=24 hours; * p<0.05). Data are normalized to WT mice for vehicle
6
7 condition. (F, bottom panel): Immunoblot (representative of 2 performed on pool of
8
9 three mice) of Phospho-eIF2 α (P-eIF2 α) and total eIF2 α from liver lysates of WT and
10
11 CD154KO mice, 24 hours after vehicle injection and 8 and 24 hours after TM
12
13 injection.
14
15
16
17
18
19

20 Figure 6: CD154 sustains the splicing of XBP1 mRNA in tunicamycin- and oleic acid-
21
22 induced ER stress *in vitro*.
23

24 (A): Fold-induction of the spliced to unspliced ratio of XBP1 mRNA (XBP1s/u) in
25
26 HepG2 and human hepatocyte (insert) cell lysates, following incubation with or
27
28 without 2.5 μ M TM and in the presence or not of rsCD154 (the data plotted represent
29
30 the mean $\pm$ SD, n=5, * p<0.05). (B): Fold-induction of the spliced to unspliced ratio of
31
32 XBP1 mRNA (XBP1s/u) in HepG2 cell lysates following incubation with or without
33
34 2mM OA, in the presence or not of rsCD154 (the data plotted represent the mean $\pm$
35
36 SD, n=4; * p<0.05). (C and D): Fold-induction of the spliced to unspliced ratio of
37
38 XBP1 mRNA (XBP1s/u) in HepG2 cell lysates following incubation with or without TM
39
40 for 18 hours (C) or 2mM OA for 8 hours (D) in the presence or not of rsCD154 and
41
42 neutralizing CD40 mAb (anti-CD40) or matched antibody isotype (isotype) (mean $\pm$
43
44 SD, n=3; * p<0.05). Data from figures A through D are normalized to cells grown in
45
46 vehicle medium without rsCD154.
47
48
49
50
51
52
53
54

55 Figure 7: CD154 alleviates the inhibition of apoB100 secretion induced by oleic acid
56
57 *in vitro*.
58
59
60

(A): ApoB100 concentration in the supernatants of HepG2 cells following incubation with 2mM OA for 8 hours, in the presence or not of rsCD154 and neutralizing CD40 mAb (anti-CD40) or matched antibody isotype (isotype) (mean $\pm$ SD, n=4; * p<0.05). (B): ApoB100 concentration in the supernatants of HepG2 pcDNA and HepG2 IRE1 DN cells following incubation with 2mM OA for 8 hours, in the presence or not of rsCD154 (mean $\pm$ SD, n=3; * p<0.05). (C): ApoB100 concentration in the supernatants of HepG2 cells following incubation for 8 hour with 2mM OA, in the presence or not of rsCD154 and after transfection with luciferase or XBP1 siRNAs (mean $\pm$ SD, n=3; * p<0.05).

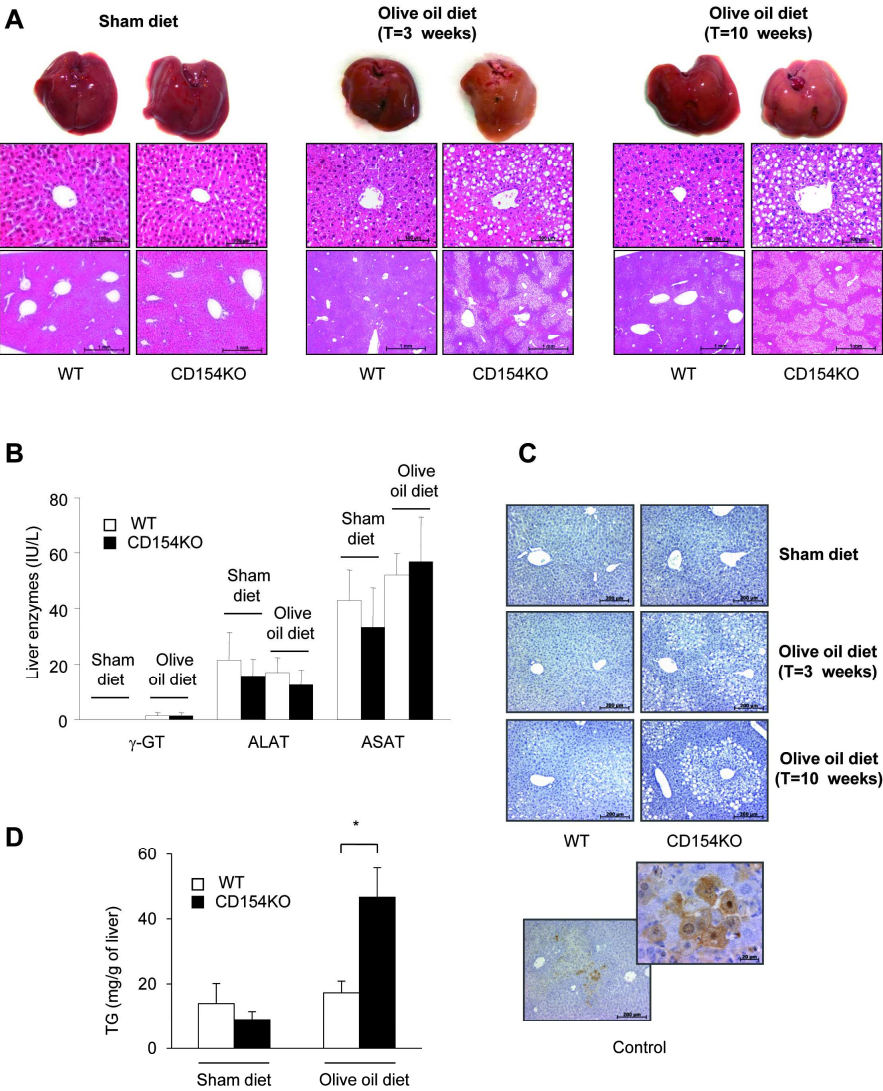


Figure 1

197x254mm (300 x 300 DPI)

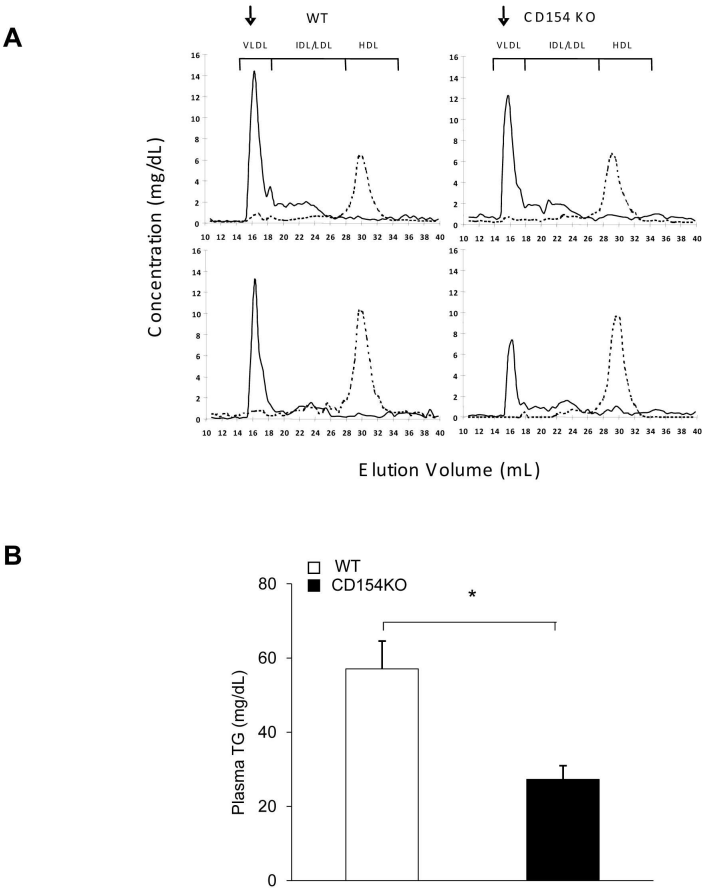


Figure 2

191x254mm (300 x 300 DPI)

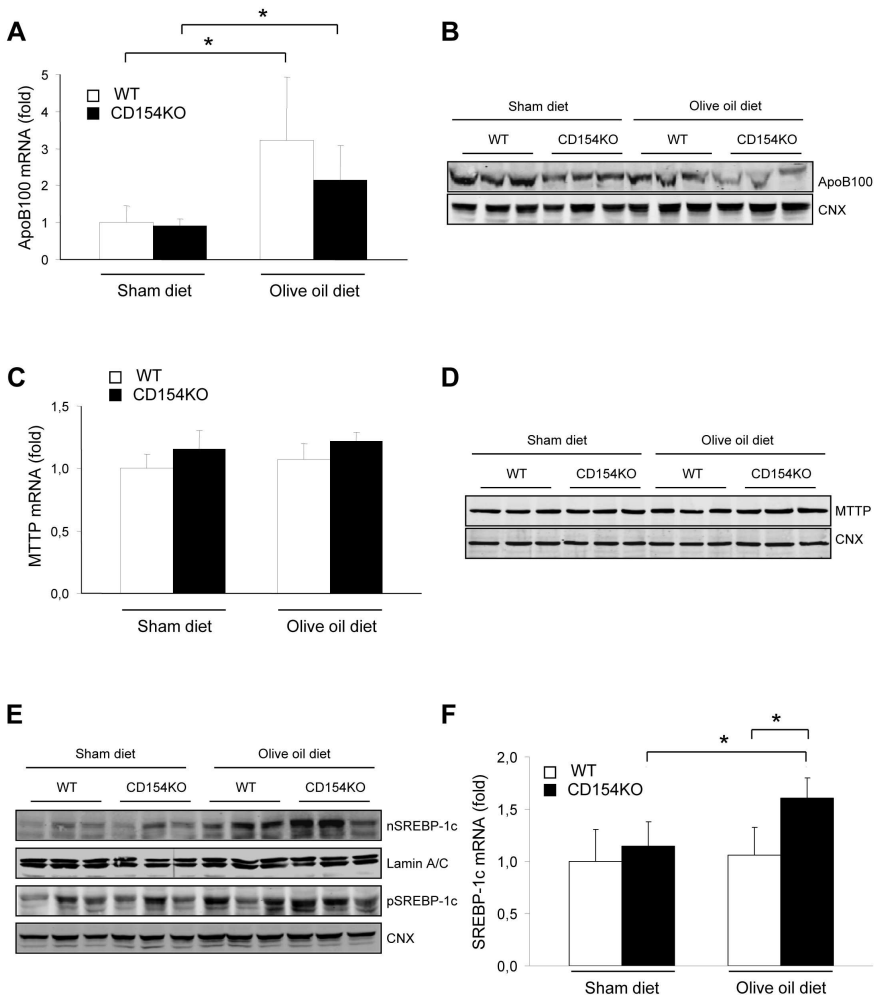


Figure 3

193x254mm (300 x 300 DPI)

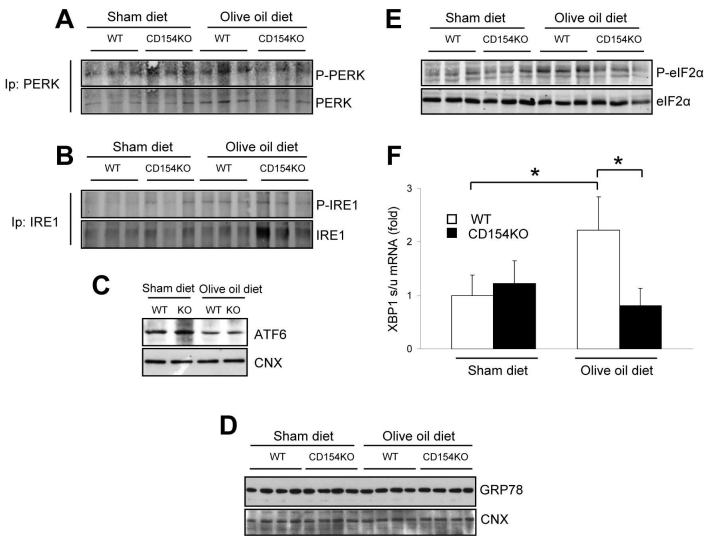


Figure 4

191x254mm (300 x 300 DPI)

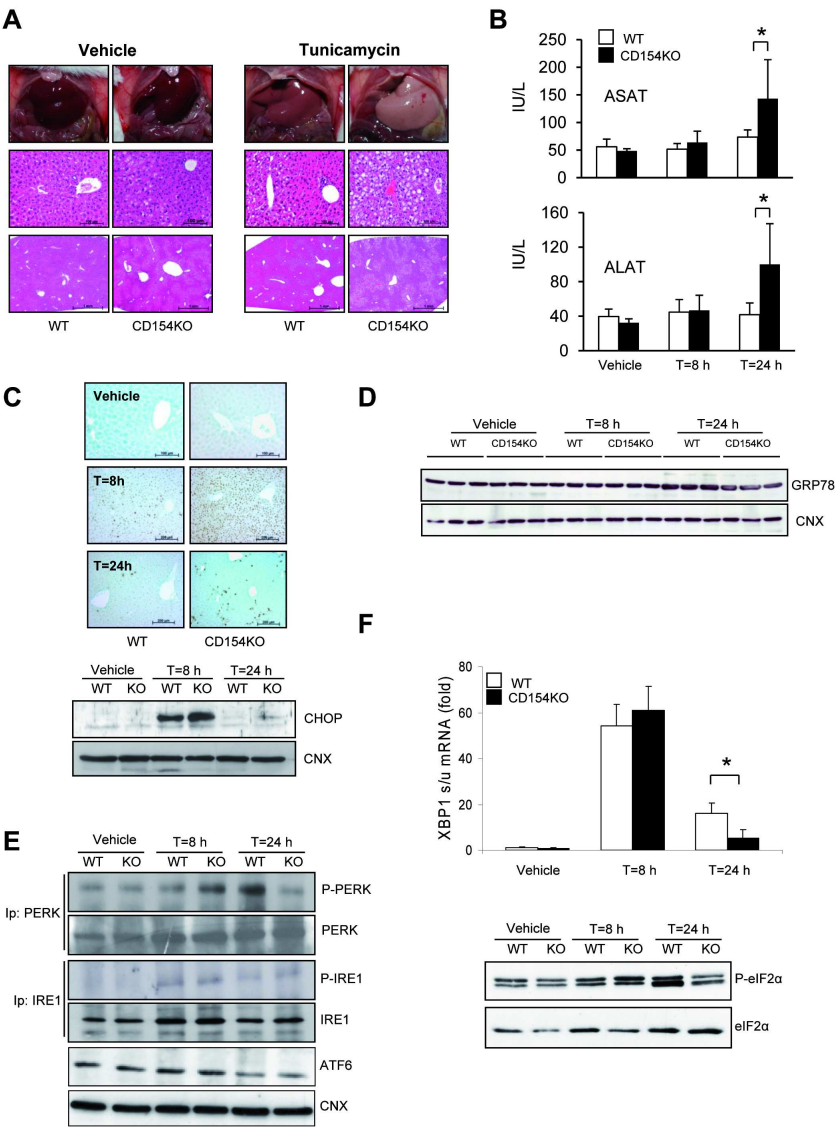


Figure 5

191x254mm (300 x 300 DPI)

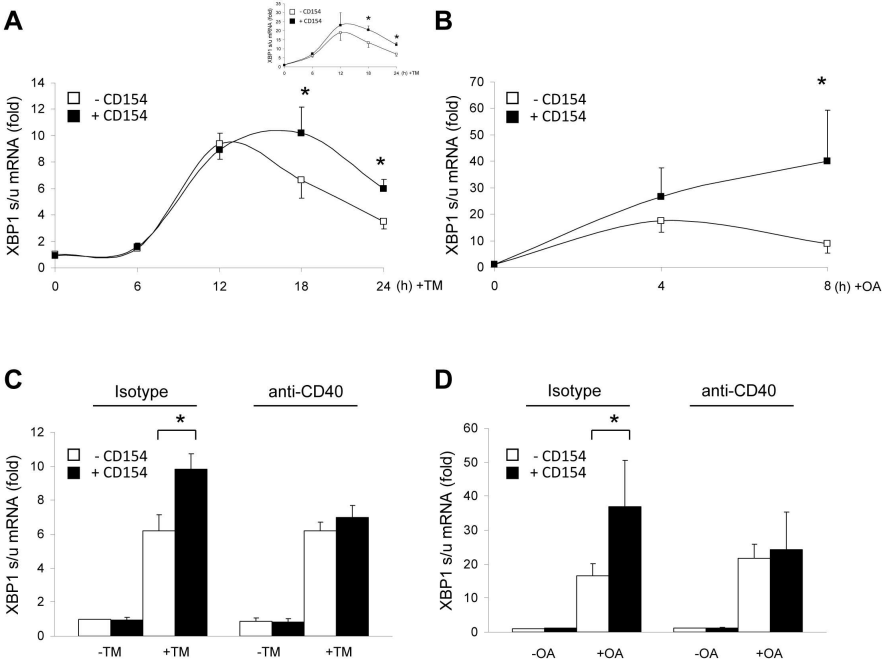


Figure 6

201x254mm (300 x 300 DPI)

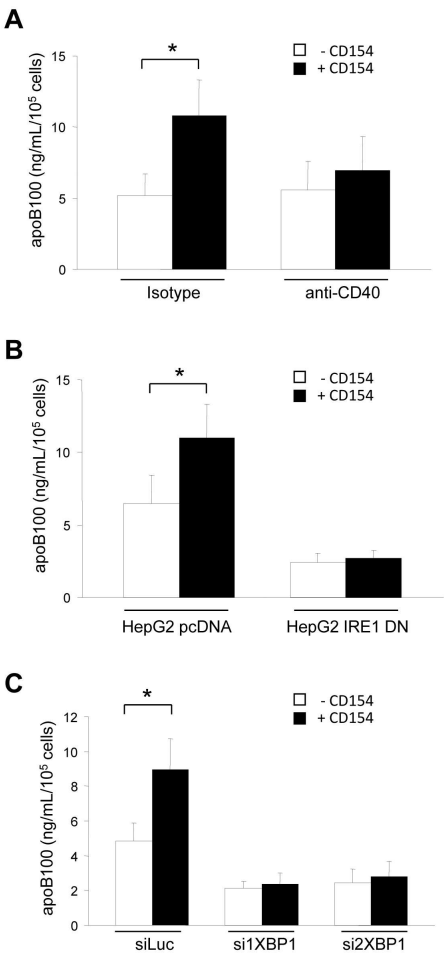


Figure 7

191x254mm (300 x 300 DPI)

			Sham diet		Olive oil diet	
			WT (n = 8)	CD154KO (n = 8)	WT (n = 8)	CD154KO (n = 8)
Lipid and lipoprotein synthesis	ACC		1.00 ± 0.25	1.22 ± 0.23	0.86 ± 0.15	1.78 ± 0.28 § #
	FAS		1.00 ± 0.53	1.58 ± 0.93	1.00 ± 0.27	2.18 ± 0.55 #
	DGAT1		1.00 ± 0.16	1.48 ± 0.70	0.88 ± 0.16	1.12 ± 0.20
	DGAT2		1.00 ± 0.09	0.98 ± 0.18	0.90 ± 0.14	0.89 ± 0.14
	SCD-1		1.00 ± 0.76	1.13 ± 0.37	0.67 ± 0.18	2.04 ± 1.23 #
	ApoB100		1.00 ± 0.44	0.91 ± 0.20	3.21 ± 1.72 §	2.15 ± 0.92 §
	MTTP		1.00 ± 0.11	1.16 ± 0.15	1.07 ± 0.13	1.22 ± 0.07
Fatty acid transporters	FABP1		1.00 ± 0.19	0.90 ± 0.33	1.02 ± 0.22	0.84 ± 0.20
	SLC27A1		1.00 ± 0.17	1.29 ± 0.18	0.87 ± 0.24	1.18 ± 0.25
	CPT-1a		1.00 ± 0.25	0.80 ± 0.31	0.84 ± 0.28	1.18 ± 0.35
PAT proteins	ADFP		1.00 ± 0.08	1.30 ± 0.33	2.37 ± 0.13 §	2.79 ± 0.95 §
Lipolytic enzymes	ACOX-1		1.00 ± 0.12	1.18 ± 0.18	1.03 ± 0.14	1.18 ± 0.27
	LCAD		1.00 ± 0.04	1.35 ± 0.29	1.14 ± 0.14	1.26 ± 0.33
	MCAD		1.00 ± 0.19	1.46 ± 0.47	1.03 ± 0.19	1.49 ± 0.56
Transcription factors	SREBP-1c		1.00 ± 0.30	1.15 ± 0.23	1.06 ± 0.26	1.60 ± 0.20 § #
	PPAR α		1.00 ± 0.34	0.86 ± 0.44	0.71 ± 0.29	0.88 ± 0.22
	ChREBP		1.00 ± 0.23	0.96 ± 0.17	1.21 ± 0.22	1.13 ± 0.19

Table 1: Messenger RNA expression of genes involved in lipid metabolism.

Fold-induction of mRNA expression of target genes in livers from mice fed for 3 weeks on sham diet or olive oil-rich diet (Olive oil diet) (mean ± SD; § p<0.05 (compared to sham diet); # p<0.05 (compared to WT)). Data are normalized to results from WT mice in sham diet conditions.

Abbreviations : ACC, Acetyl-Coenzyme A Carboxylase; FAS, Fatty Acid Synthase; DGAT, Diacylglycerol O-Acyl Transferase; SCD-1, Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1; ApoB100, Apolipoprotein B100; MTTP, Microsomal Triglyceride Transfer Protein; FABP1, Fatty Acid Binding Protein 1; SLC27A1, Solute Carrier Family 27 A1; CPT-1a, Carnitine Palmitoyl Transferase 1A; PAT proteins (Perilipin, ADFP, Tip-47 proteins); ADFP, Adipophilin; ACOX-1, Acyl Coenzyme A Oxidase-1; LCAD, Long Chain Acyl-coenzyme A Dehydrogenase; MCAD, Medium Chain Acyl-coenzyme A Dehydrogenase; SREBP-1c, Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c; PPAR α , Peroxisome Proliferator Activated Receptor alpha; ChREBP, Carbohydrate Response Element Binding Protein

Table 1

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplemental experimental procedures

Mice

Comparative blood counts showed no differences between WT and CD154KO animals except for a discrete lymphocytopenia in CD154KO animals that did not reach statistical significance ($4.22 \pm 1.26 \times 10^3/\text{mm}^3$ versus $5.8 \pm 2.22 \times 10^3/\text{mm}^3$ in CD154KO and WT animals, respectively, $n=6$). There were no differences in the platelet counts of WT and CD154KO mice ($1242 \pm 179 \times 10^3/\text{mm}^3$ and $1160 \pm 74 \times 10^3/\text{mm}^3$, respectively, $n=6$). Mice were free of mouse hepatitis virus as determined by qRT-PCR (QM Diagnostics, Nijmegen, The Netherlands).

Primary hepatocyte and hepatocyte-derived cell lines cultures

Mouse hepatocytes were isolated by a two-step perfusion procedure as described (1) using Liberase Blendzyme 3 (Roche Applied Sciences, Meylan, France). Cell viability was superior to 80%. Cells were resuspended in William's medium containing antibiotics (penicillin (100 IU/mL), streptomycin (100 $\mu\text{g/mL}$)), non-essential amino acids, glutamine (2 mM), Insulin-Transferrin-Selenium-A Supplement (Sigma, Saint Quentin Fallaviers, France) and fetal calf serum (FCS, Perbio Science, Cramlington, UK) (10%). Primary human hepatocytes (Biopredic SA, Rennes, France) were grown following the manufacturer's recommendations. Human hepatocyte-derived cell lines HepG2, SNU 398, SNU 475, Hep3B, SKHep1 and H2M were grown in DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS (Perbio Science), and antibiotics. HepG2 cells expressing a dominant negative form of IRE-1 (HepG2 IRE-1 DN) and the corresponding control cell line (HepG2 pcDNA) were described previously (2).

Oleic acid (OA) and tunicamycin (TM) treatment of cultured cells

OA treatment: cells were incubated in the presence of OA (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) diluted in vehicle medium (DMEM (low glucose, 1g/L) added with 0.5% BSA (Sigma) and 0.8% ethanol). TM treatment: cells were incubated in vehicle medium (DMEM (low glucose, 1g/L), 10% FCS) added with 2.5 µg/mL TM. Control cells were incubated in respective vehicle medium. Recombinant soluble CD154 (rsCD154) (MegaCD40LTM, Coger SAS, Paris, France) was used at a final concentration of 100 ng/mL. Anti-human CD40 mouse monoclonal antibody (mAb) (mAb89, gift from Schering-Plough laboratory (Dardilly, France)) was used at 1 µg/mL in neutralizing experiments.

Histology, immunostaining, TUNEL staining

Liver samples were fixed in 3.7% neutral formaldehyde. Paraffin-embedded sections (4µm) were stained with hematoxylin and eosin. Oil red O was used to stain neutral lipids in frozen liver sections. For immunostaining, endogenous peroxidases were first blocked, then tissue sections were incubated with the indicated antibody for 30 min after heat-induced antigen retrieval. The signal was amplified by EnVisionTM dextran polymer (Dako A/S, Trappes, France) and revealed with liquid diaminobenzidine substrate (Dako A/S) before counterstaining. TUNEL staining was performed using a TdT-FragELTM DNA fragmentation detection kit (Calbiochem, Merck4Biosciences, France) according to the manufacturer's instructions.

Tissue sections were observed by two pathologists (PBS and SL). To grade and stage portal or lobular inflammation, readings were based on published recommendations (3).

Lipid and glucose analysis

TG were measured from liver tissue. Lipids were extracted according to Folch (4).

Total TG were measured with enzymatic kits (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

For plasma lipoprotein profiles, mice were fasted for 4h and blood was drawn in tubes containing 4 mM EDTA. Pooled fresh plasmas were centrifuged at 2400g for 20 min at 4°C and 500 µL of clear supernatant were applied to a fast protein liquid chromatography (FPLC) system with two Superose (Sephacrose 6) columns connected in series (Pharmacia LKB, Orsay, France). Lipoproteins were eluted, collected and analyzed. Total cholesterol and TG were quantified in each fraction in order to establish a FPLC profile.

Glycemia was determined by an enzymatic method (BioMérieux).

In vivo triglyceride production rate

TG production rate was determined by inhibiting their plasma catabolism as described (5). Briefly, mice were fed for 3 weeks on olive oil-rich diet, fasted 4 hours, anesthetized and injected in the saphenous vein with 500 mg/kg of Triton WR 1339 (Tyloxapol, Sigma) as a 15% (wt/vol) solution in 0.9% NaCl. Fifty µL blood samples were drawn at 30 and 60 min after injection for TG measurements. Production rates were estimated via the difference between the 30 and 60 min TG values.

Liver enzyme measurements

Blood samples were collected from each animal by venipuncture. Serum was stored at -80°C until measurement of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma-glutamyltransferase on an automated analyser (Modular, Roche, Diagnostics, Meylan, France).

Real-Time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 50 mg of mouse frozen liver or from human hepatocyte cell lines using a RNA extraction kit (NucleoSpin® RNAII Macherey-Nagel, Hoerd, France) following the manufacturer's instructions, and quantified spectrophotometrically (Thermo spectronic, Cambridge, UK). Complementary DNA (cDNA) was synthesized with oligo-dT from 2 µg of total RNA in a final volume of 40 µL using First strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche) according to the manufacturer's instructions.

The quantitative PCR (qPCR) was performed in triplicate on a Mx4000™ multiplex Quantitative PCR System (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands) using iQ™SYBR® green Supermix kit (Bio-rad, Marnes la Coquette, France). The cycling parameters for qPCR reaction included 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 62°C for 60 seconds and elongation at 72°C for 30 seconds. The specificity of qPCR was established by incorporating non-reverse transcribed RNA. The specificities of the amplified transcripts were confirmed by melting curve profiles generated at the end of the PCR program. Ribosomal phosphoprotein P0 (RPL0) was used as a housekeeping gene standard. All primers were synthesized by MWG (Roissy, France).

Primer sequences used in real time qRT-PCR analysis

m, mouse; h, human; Fw, forward primer; Rev, reverse primer

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Human primers

Name	Sequence (5'-3')	GenBank no.
hRPL0-Fw	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	NM_001002
hRPL0-Rev	CCATCAGCACCCACAGCCTTC	
hXBP1s-Fw	GCTGAGTCCGCAGCAGGTG	NM_005080
hXBP1u-Fw	GAGTCCGCAGCACTCAGACT	
hXBP1-Rev	GTCCAGAATGCCCAACAGGAT	NM_004083
hCHOP-Rev	GGAGCTGGAAGCCTGGTATG	
hCHOP-Fw	GCCAGAGAAGCAGGGTCAAG	NM_000384
hapoB100-Fw	CCTCCGTTTTGGTGGTAGAG	
hapoB100-Rev	CCTAAAAGCTGGGAAGCTGA	NM_198839
hACC-Fw	CCATTATTCCTCCAAAATGAGC	
hACC-Rev	TCTGATGTCAATCTTGAGGGC	NM_004104
hFAS-Fw	TCTCCGACTCTGGCAGCTT	
hFAS-Rev	GCTCCAGCCTCGCTCTC	NM_005063
hSCD1-Fw	GCAGCCGAGCTTTGTAAGAG	
hSCD1-Rev	GTTCTACACCTGGCTTTGGG	NM_000600
hIL6-Fw	CCAGTACCCCCAGGAGAAGA	
hIL6-Rev	GATGCCGTGAGGATGTACC	NM_001250
hCD40-Fw	AGACACACTGCCACCAGCAC	
hCD40-Rev	GGTGCAGGACACAGCTCTCA	

Mouse primers

Name	Sequence (5'-3')	GenBank no.
mRPL0-Fw	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	NM_007475
mRPL0-Rev	CCATCAGCACACAGCCTTC	
mXBP1s-Fw	GCTGAGTCCGCAGCAGGTG	NM_013842
mXBP1u-Fw	GAGTCCGCAGCACTCAGACT	
mXBP1-Rev	GTGTCAGAGTCCATGGGAAGA	
mDGAT1-Fw	AGAAGGTCAGTGGGGCTGCT	NM_010046
mDGAT1-Rev	GGGGACCGAGGAAAGTTGAG	
mDGAT2-Fw	GCCTGGGTGCCTTCTGTAAC	NM_026384
mDGAT2-Rev	CAGGTACTCGCGAAGCACAG	
mApoB100-Fw	AGAGGCTCACCTGGACATCA	NM_009693
mApoB100-Rev	GGTCATCTGTGCTCGAATCC	
mMTTP-Fw	GAGGCTGTCCAGAGCTTCCT	NM_008642
mMTTP-Rev	GCGAGTCTGGAGTCTGAGCA	
mACC-Fw	CAACCCTGAGCTGACTGACG	NM_133360
mACC-Rev	GTTGCTTCTCCAGCCACTCC	
mFAS-Fw	CACTGCTGGTGAACCCTGAG	NM_007988
mFAS-Rev	GCAGCCAGACTGTGGAACAC	
mSCD1-Fw	CACCTGGCTGGTGAACAGTG	NM_009127
mSCD1-Rev	AGGGGAAGGTGTGGTGGTAG	
mMCAD-Fw	GCTGCTAGTGGAGCACCAAG	NM_007382
mMCAD-Rev	AACCTCCCAGGCTGCTCTCT	
mFABP1-Fw	GGACATCAAGGGGGTGTGAG	NM_017399
mFABP1-Rev	GGTCTCCAGTTCGCACTCCT	
mCPT1a-Fw	GGGCCATCTGTGGGAGTATG	NM_013495
mCPT1a-Rev	TGTCCCACTGTAGCCTGGTG	
mSLC27A1-Fw	CTTCTGCCCCAGGTGGATAC	NM_011977
mSLC27A1-Rev	GGGTACATAGCGTCCCTGCT	
mSREBP1c-Fw	CTGAGCGCTTGTAACCACTG	NM_011480
mSREBP1c-Rev	CTGGCTGGGCTAGATTCCAC	
mChREBP-Fw	CAGTGAGCGGCGACTATCAG	NM_021455
mChREBP-Rev	GTCTACACGACCCCGGCTTA	
mPPARalpha-Fw	ATGTCCGTGGAGACCGTCA	NM_011144
mPPARalpha-Rev	CATCAAGGAGGACAGCATCG	
mIL6-Fw	CCTTCTTGGGACTGATGCTG	NM_031168
mIL6-Rev	CCTCCCACTTGTGAAGTGGT	
mACOX1-Fw	TTCTCAGCAGTGGGATTC	NM_015729
mACOX1-Rev	CGTCTGCAGCATCATAACAG	
mADFP-Fw	ACCTTGTGTCCTCCGCTTAT	NM_007408
mADFP-Rev	AGAGGTACGGTCTTCACG	
mLCAD-Fw	CCCATGGCATTAGCCTCT	NM_007381
mLCAD-rev	CCTGAGCTTTCATTCCCATC	

RNA interference experiments

For the transfection of siRNAs, 1.5×10^5 cells were transfected in suspension with the siRNA duplexes and then seeded into 6-well plates, and transfected a second time

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

the next day with the same siRNA duplexes. Transfection was performed with Lipofectamine™ RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Silencing of the target mRNA was assayed 48, 72 and 96 hours after transfection. CD40 and XBP1 mRNA were silenced by transfecting cells with, respectively, CD40 siRNA duplexes, (5'-GCGAAUCCUAGACACCUGdTdT-3' and 5'-CUGGUGAGUGACUGCACAGdTdT-3' and their antisense sequences) and XBP1 siRNA duplexes (5'-AGACUGCCAGAGAUCGAAAdTdT-3' and 5'-ACAGCAAGUGGUAGAUUUAdTdT-3' and their antisense sequences), at a final concentration of 25 nM. Control included a siRNA duplex targeting the luciferase mRNA (5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3' and its antisense sequence). All siRNA duplexes were synthesised by MWG.

Preparation of liver extracts, immunoprecipitations (Ip) and immunoblot experiments
Total lysates from mouse livers were prepared by homogenizing 50 mg tissue in 300 µl RIPA lysis buffer (Sigma), added with protease inhibitors (Sigma), sodium fluoride (2mM) and Na3VO4 (1mM). Microsomal membranes and nuclear extracts from mouse livers were prepared by homogenizing tissues in Buffer A (0.25 M sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.6, 3 mM MgCl2 added with protease inhibitors (Sigma)). The homogenate was centrifuged (500 x g for 5 min at 4°C). The supernatant was then centrifuged (100000 x g for 1 hour at 4°C) to obtain microsomes. The microsome pellet was resuspended in Buffer B (20 mM Hepes, pH 7.6, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% SDS added with protease inhibitors (Sigma)) and used for the analysis of microsome proteins. The pellet from the first centrifugation was resuspended in Buffer A, adjusted to 1% Nonidet P-40, and homogenized. The homogenate was centrifuged (500 x g for 5 min at 4°C). The nuclear pellet was

resuspended in Buffer C (2 M sucrose, 10 mM HEPES, pH 7.6, 25 mM KCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glycerol added with protease inhibitors (Sigma)) and centrifuged at 10000 x g for 1 hour. The pellet was used for analysis of nuclear proteins.

For immunoprecipitations, 1 mg of total lysate from mouse livers was precleared for 30 min at 4°C with 50µl of protein A-Sepharose beads (GE Healthcare, Pessac, France). Proteins that nonspecifically bound the protein A-Sepharose were removed by centrifugation to generate the precleared lysates. Then 2 µg of the indicated antibodies were added to the precleared lysates overnight at 4°C, and 50µl of protein A-Sepharose beads were added with further incubation for 45 min at 4°C. Beads were washed 5 times in RIPA and bound proteins were eluted by boiling in SDS-PAGE loading buffer.

For immunoblot experiments, 50-100 µg of extracted proteins were separated on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. Gels were transferred to nitrocellulose membranes and membranes were then blocked with 2.5% BSA in phosphate buffered saline (PBS)/Tween 0.1% and incubated overnight with the primary antibodies. The protein bands were detected with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies and enhanced chemiluminescence solution (Perbio, Brebières, France).

Antibodies used in immunostaining, immunoprecipitation and immunoblot analysis
Antibodies to active Caspase 3 (R&D systems, Lille France) and CHOP (Santa-Cruz Biotechnology, Heidelberg, FRG, clone F-168), were used for immunostaining experiments.

Antibodies to GRP78 (Santa Cruz Biotechnology), ATF6 (Rabbit polyclonal, (Abcam, San Francisco, CA), predominantly recognizing the 90 kDa ATF6 species (cleaved to yield a 50 kDa Mr fragment band upon ATF6 activation), IRE1 (Santa Cruz Biotechnology), Phospho-IRE1 (Rabbit polyclonal, Abcam), PERK (Santa Cruz Biotechnology), phospho-PERK (Rabbit monoclonal, clone 16F8, Cell Signaling, Danvers, USA), CHOP (Santa-Cruz Biotechnology, clone F-168), JNK (Santa Cruz Biotechnology), Phospho-JNK (Cell Signaling), MTTP (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA), apolipoprotein B (Santa Cruz Biotechnology), lamin A/C (BD Biosciences), SREBP-1c (Thermo Scientific, Courtaboeuf, France, clone 2A4), CD40 (AbD Serotec, clone 3/23), CNX (Stressgen, Ann Harbor, USA), eIF2 α (Cell Signaling), phospho-eIF2 α (Cell Signaling) were used for immunoprecipitation and/or immunoblot procedures.

CNX was used as loading control in immunoblot experiments. Secondary antibodies were polyclonal HRP-conjugated goat anti-mouse, goat anti-rabbit or goat anti-rat antibodies (Dako, Glostrup, Denmark). Quantification of the signals from immunoblots were performed using the ImageJ software.

Flow cytometry

Mouse monoclonal antibody (mAb) to human CD40 (mAb89), a gift from Schering-Plough (Dardilly, France), rat polyclonal antibody to mouse CD40 (AbD Serotec, clone 3/23), FITC-conjugated rat mAb to mouse P-selectin (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France, clone RB40.34) and rat mAb to mouse CD154 (Santa Cruz Biotechnology, clone L30) were used with matched isotype controls. Secondary antibodies, PE-conjugated donkey anti-rat and goat anti-mouse IgG, were obtained

from eBioscience (Montrouge, France) and Beckman Coulter (Villepinte, France), respectively.

Flow cytometry on mouse platelets: Platelet-rich plasma was prepared from EDTA-anticoagulated blood and the platelets were fixed with 1% paraformaldehyde. Fixed platelets were directly labelled with the FITC-labelled mAb to P-selectin for 1 hour at room temperature and indirectly labelled with the anti-CD154 antibody.

Flow cytometry on hepatic cells and hepatocyte-derived cell lines: Cells were incubated with the indicated anti-CD40 primary antibody for 1 hour at room temperature followed by matched secondary PE-conjugated antibody for 1 hour at room temperature. All analyses were performed on an Epics XL2 (Beckman Coulter) flow cytometer and the EXPO 32 ADC software (Beckman Coulter).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mouse plasma concentrations of insulin, CD154 and IL-6 and the secretion of apoB100 into cell culture supernatants were measured using commercial ELISA kits from SPI BIO (Montigny-le-Bretonneux, France), Bender MedSystems (Burlingame, CA), eBioscience and Mabtech (Sophia-Antipolis, France) respectively, according to the manufacturer's recommendations.

Immuno-electron microscopy

Initially, graded sections were incubated in 4% normal goat serum (NGS) in PBS for 30 minutes at room temperature. Sections were incubated for 15 hours at room temperature with a polyclonal rabbit anti-CD40 antibody (Abcam), at a dilution of 1:50 in PBS with 1% NGS. After washing in PBS containing 2% BSA and 0.2% cold water fish gelatin (PBS-BSA-gelatin), sections were incubated for 2 hours at room

temperature with goat anti-rabbit IgG conjugated to ultra-small colloidal gold particles (0.8 nm; Aurion, Wageningen, The Netherlands) diluted (1/100) in PBS-BSAc-gelatin. The sections were then washed in PBS and post-fixed in PBS with 1% glutaraldehyde for 10 minutes. After several washes in PBS and in sodium acetate buffer 0.1M, pH7.0, the gold labeling was intensified using a silver enhancement kit (HQ silver; Nanoprobes, Yaphank) for 6 minutes at room temperature in the dark. Sections were washed in acetate buffer and then in PBS. The sections were equilibrated in PBS for 3 to 5 minutes and post-fixed in osmium tetroxide 1% in PBS for 10 minutes at room temperature. After several washes in PBS, sections were dehydrated in graded ethanol, which included 1% uranyl acetate in 70° ethanol, and then treated with propylene oxide and embedded in resin (Durcupan ACM, Fluka, Switzerland). Sections were mounted on glass slides and incubated at 60°C for 48 hours. Areas of interest were cut out from the slides and glued to blank cylinders of resin. Semi-thin sections (1µm thick) were cut with a Reichert ultracut S (Leica, Nusslock, Germany) to identify the immunoreactive cells. Ultrathin sections were cut collected on pioloform-coated single-slot copper grids, stained with lead acetate and examined with a Tecnai electron microscope (Philips).

Statistics

All Data are presented as mean ± SD. Differences in the mean values between 2 groups were assessed by 2-tailed Student t-test. P<0.05 was taken to imply statistical significance.

References

1. Klaunig JE, Goldblatt PJ, Hinton DE, Lipsky MM, Chacko J, Trump BF. Mouse liver cell culture. I. Hepatocyte isolation. *In Vitro* 1981;17:913-925.
2. Cameron PH, Chevet E, Pluquet O, Thomas DY, Bergeron JJ. Calnexin phosphorylation attenuates the release of partially misfolded alpha1-antitrypsin to the secretory pathway. *J Biol Chem* 2009;284:34570-34579.
3. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-2474.
4. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509.
5. Shachter NS, Ebara T, Ramakrishnan R, Steiner G, Breslow JL, Ginsberg HN, Smith JD. Combined hyperlipidemia in transgenic mice overexpressing human apolipoprotein C1. *J Clin Invest* 1996;98:846-855.

Supplemental Figure Legends

Supplemental Figure 1

(A): Immunostaining of active caspase 3 on representative liver sections of WT and CD154KO mice 24 hours after vehicle injection and 8 and 24 hours after TM injection. Bottom inserts depict a tissue section from CCl4-treated CD154KO mouse at two different magnifications, as a positive control. (B): Immunoblot of Phospho-JNK (P-JNK) and total JNK (representative of 2 performed), from livers of WT and CD154KO mice 24 hours after vehicle injection and 8 and 24 hours after TM injection.

Supplemental Figure 2: Expression of CD40 on primary cultures of human and murine hepatocytes and on hepatocyte-derived cell lines and in mouse liver

(A): Flow cytometry analysis of CD40 expression on hepatocytes in primary culture and on hepatocyte-derived cell lines. X-axis represents the CD40 fluorescence and the Y-axis the number of events. Gray histogram shows isotype controls, white histograms shows CD40 expression (representative of 3 performed). (B): CD40 immuno-electron microscopy of representative liver tissue sections in WT mice (n=3) at low magnification (top panels) and high magnification (bottom panels). Bottom panels refer to high magnifications of the respective inserts depicted in top panels (C): CD40 and CNX immunoblots from WT and CD154KO liver lysates from mice fed for 3 weeks on sham diet or on olive oil-rich diet (Olive oil diet).

Supplemental Figure 3: eIF2 α phosphorylation in oleic acid and tunicamycin-treated HepG2 cells.

Immunoblots of Phospho-eIF2 α (P-eIF2 α) and total eIF2 α from HepG2 cell lysates following incubation with (Left panels) TM (2.5 μ M) or (right panels) oleic acid (2 mM), for different times (representative of 2 performed).

Supplemental Figure 4: The silencing of CD40 inhibits the CD154-induced increased XBP1 mRNA splicing under tunicamycin- and oleic acid-treated HepG2 cells.

(A): Fold-induction of CD40 mRNA in HepG2 cell lysates at 48, 72 and 96 hours following transfection with luciferase and CD40 siRNAs (mean $\pm$ SD, n=3). (B): Representative flow cytometry analysis of CD40 expression on HepG2 cells at 72 and 96 hours following transfection with luciferase and CD40 siRNAs (representative of 3 performed with si1CD40, similar results were obtained with si2CD40). (C and D): Fold-induction of the ratio of spliced to unspliced XBP1 mRNAs (XBP1s/u) from HepG2 cell lysates following incubation of HepG2 cells 18 hours with or without TM (C) or 8 hours with or without 2mM OA (D), in the presence or not of rsCD154 and after transfection with luciferase and CD40 siRNAs (mean $\pm$ SD, n=3; * p<0.05). Data are normalized to cells grown in respective vehicle medium without rsCD154 and transfected with luciferase siRNA.

Supplemental Figure 5: CD154 reduces toxicity associated to long term exposure to oleic acid.

HepG2 cells were cultured in the presence of 2 mM OA in the presence or not of rsCD154. Cell viability was measured in a sulforhodamin B cytotoxicity assay. The data plotted represent the mean $\pm$ SD, n=4, * p<0.05. Hundred per cent viability represents the optical density for untreated cells.

Supplemental Figure 6: High concentrations of oleic acid inhibit apoB100 secretion in HepG2 cells.

ApoB100 concentration in the supernatants of HepG2 cells following 4 and 8 hours incubation with vehicle medium, 1 and 2 mM OA (mean $\pm$ SD, n=4, * p<0.05).

Supplemental Figure 7: Olive oil-rich diet and TM treatment increase the expression of CD154.

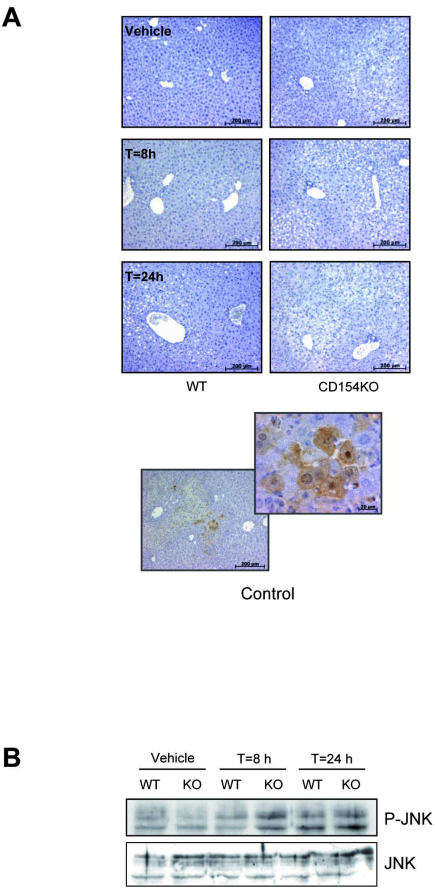
(A and B): platelet P-selectin expression as measured by flow cytometry in WT and CD154KO mice at time 0 (T0) and following 3 weeks (T=3 weeks) of olive oil-rich diet (A) and in WT and CD154KO mice at time 0 (T0) and 24 hours after TM injection (T=24 h) (B) (mean $\pm$ SD, n=5 mice in each group; * p<0.05). (C and D): plasma concentration of soluble CD154 (sCD154) in WT mice at time 0 (T0) and following 3 weeks (T=3 weeks) of olive oil-rich diet (C) and in WT mice at time 0 (T0) and 24 hours after TM injection (T=24 h) (D) (mean $\pm$ SD, n=5 mice in each group; * p<0.05). (E and F): CD154 expression on platelets (flow cytometry) in WT mice at time 0 (T0) and following 3 weeks (T=3 weeks) of olive oil-rich diet (E) and in WT mice at time 0 (T0) and 24 hours after TM injection (T=24 h) (F) (mean $\pm$ SD, n=5 mice in each group; * p<0.05).

Supplemental Figure 8:

(A and B): Impaired IL-6 induction following the olive oil-rich diet in CD154KO mice
(A): Mouse plasma concentration of IL-6 in WT and CD154KO mice at time 0 (T0) and following 3 weeks of olive oil-rich diet (T=3 weeks) (mean $\pm$ SD, n=5 mice in each group; * p<0.05). (B): Fold-induction of IL-6 mRNA in WT and CD154KO livers from mice fed for 3 weeks on sham diet or olive oil-rich diet (Olive oil diet) (mean $\pm$

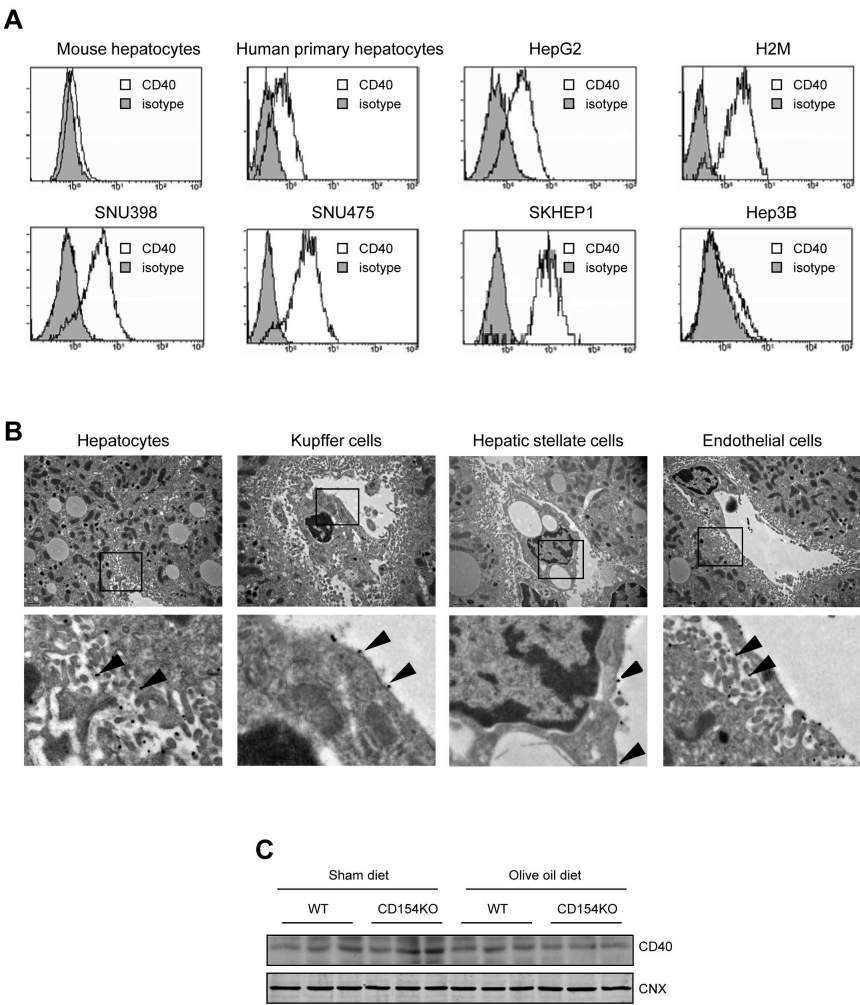
SD, n=8 mice in each group; * $p<0.05$). Data are normalized to WT mice in sham diet conditions.

(C and D): Fold-induction of IL-6 mRNA in HepG2 pcDNA cell lysates (C), and in HepG2 IRE1 DN cell lysates (D) following incubation with TM or rsCD154 (the data plotted represent the mean $\pm$ SD, n=4). Inserts: Fold-induction of IL6 mRNA in HepG2 pcDNA cell lysates (C), and in HepG2 DN IRE1 cell lysates (D) following 12 hours incubation with or without TM and with or without rsCD154 (mean $\pm$ SD, n=4; * $p<0.05$). Data from figures C and D are normalized to cells grown in respective vehicle medium without TM or rsCD154.



Supplemental Figure 1

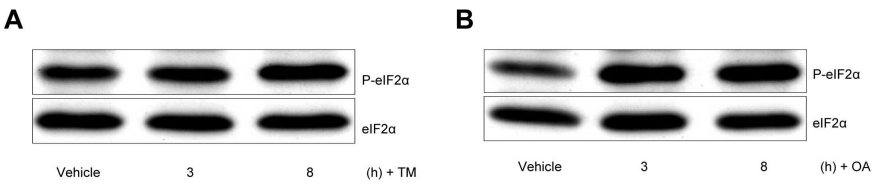
191x254mm (300 x 300 DPI)



Supplemental Figure 2

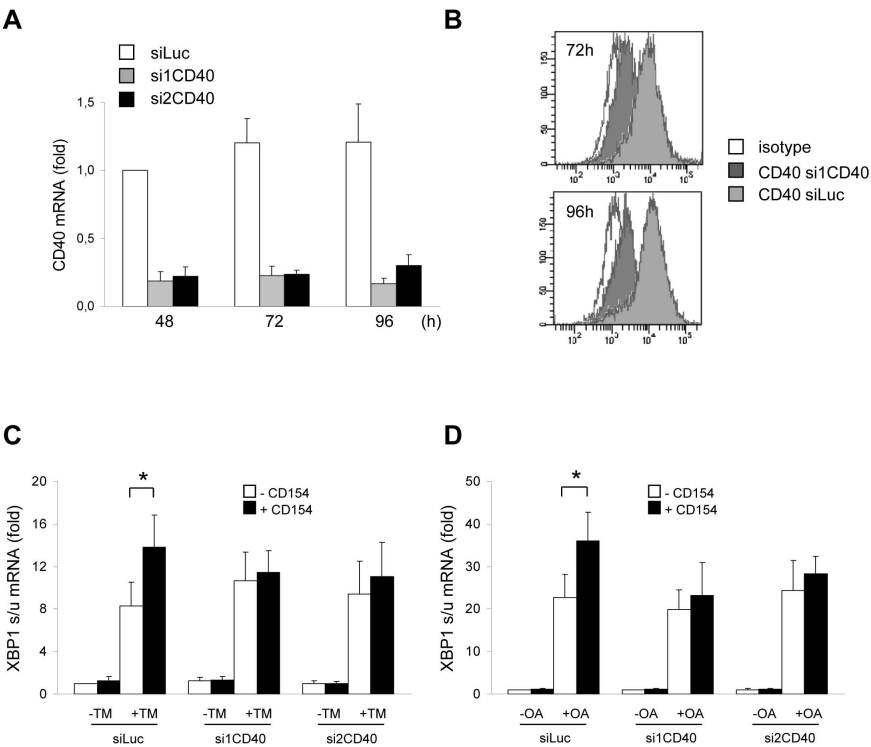
191x254mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



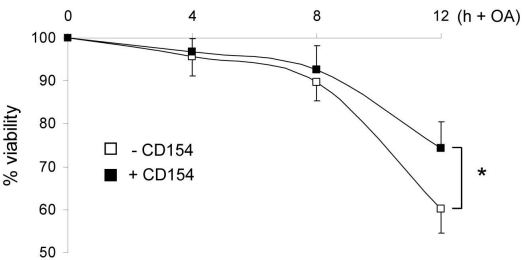
Supplemental Figure 3

201x254mm (300 x 300 DPI)



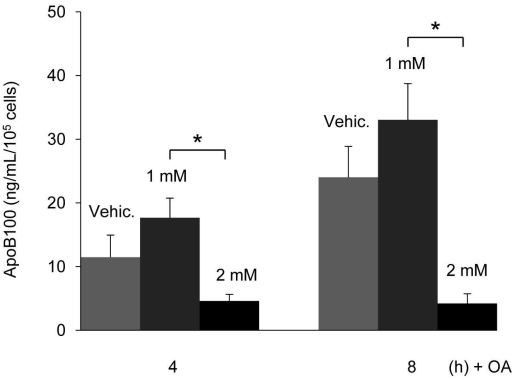
Supplemental Figure 4

201x254mm (300 x 300 DPI)



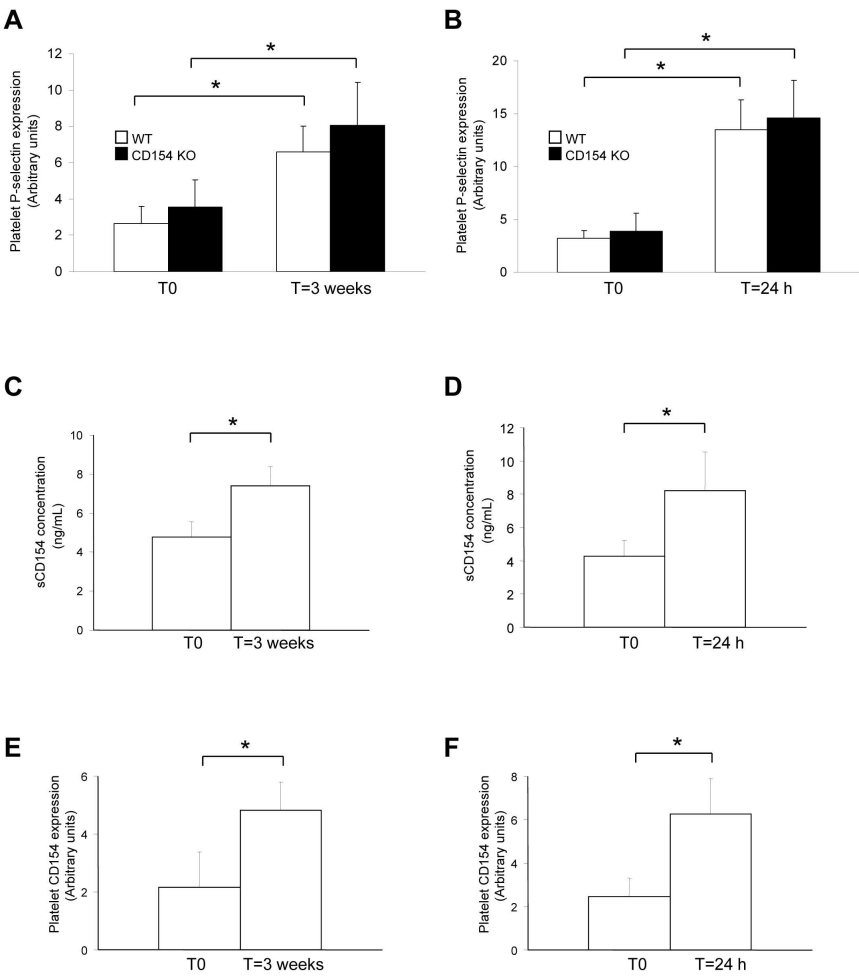
Supplemental Figure 5

191x254mm (300 x 300 DPI)



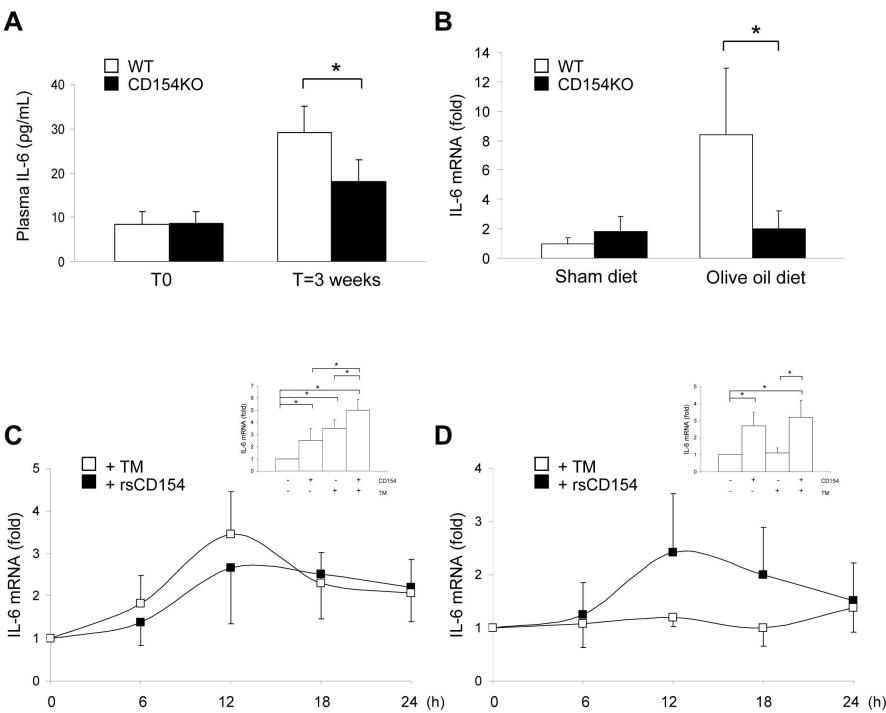
Supplemental Figure 6

191x254mm (300 x 300 DPI)



Supplemental Figure 7

201x254mm (300 x 300 DPI)



Supplemental Figure 8

197x254mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

	T0		T=3 weeks	
	WT (n = 7)	CD154KO (n = 7)	WT (n = 7)	CD154KO (n = 7)
Total cholesterol (mg/dL)	52 ± 6	48 ± 6	58 ± 10	57 ± 5 §
HDL-cholesterol (mg/dL)	32 ± 4	34 ± 7	39 ± 8	39 ± 5
non HDL-cholesterol (mg/dL)	20 ± 5	14 ± 9	19 ± 7	18 ± 5
Triglycerides (mg/dL)	121 ± 16	117 ± 16	106 ± 17	93 ± 11 §
Free fatty acids (mg/dL)	99 ± 21	109 ± 25	88 ± 17	77 ± 17 §
Glucose (mg/dL)	202 ± 21	170 ± 24 #	195 ± 24	201 ± 23 §
Insulin (µg/L)	0.66 ± 0.05	0.69 ± 0.06	0.70 ± 0.05	0.72 ± 0.06

Supplemental Table 1: Metabolic profiles of WT and CD154KO mice fed an olive oil-rich diet
Plasma concentrations of lipids, glucose and insulin, in WT and CD154KO mice at time 0 (T0) and after 3 weeks (T=3 weeks) of olive oil-rich diet (mean ± SD; § p<0.05 (compared to T0); # p<0.05 (compared to WT)).

Supplemental Table 1