



HAL
open science

Développement d'outils pour l'étude de la dynamique de l'appareil de Golgi en interphase et en mitose

Clément Nizak

► To cite this version:

Clément Nizak. Développement d'outils pour l'étude de la dynamique de l'appareil de Golgi en interphase et en mitose. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2003. Français. NNT: . tel-00190898

HAL Id: tel-00190898

<https://theses.hal.science/tel-00190898>

Submitted on 23 Nov 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**Thèse présentée par Clément Nizak
pour obtenir le grade de docteur
de l'Université Paris VII Denis Diderot**

spécialité □ Interface Physique-Biologie

intitulée □

**Développement d'outils pour l'étude de la dynamique de
l'appareil de Golgi en interphase et en mitose □ anticorps
recombinants, ARNs inhibiteurs, et imagerie in vivo.**

devant le jury composé de □

Pr Michel Volovitch	président
Dr Catherine Rabouille	rapporteur
Dr Pierre Cosson	rapporteur
Dr Bruno Goud	directeur
Dr Franck Perez	co-directeur
Dr Jean-Luc Teillaud	examineur

Développement d'outils pour l'étude de la dynamique de l'appareil de Golgi en interphase et en mitose □ anticorps recombinants, ARNs inhibiteurs, et imagerie in vivo.

RESUME

L'appareil de Golgi est un organite central du réseau des voies de transport intracellulaire des cellules eucaryotes. L'étude de son fonctionnement dynamique complexe nécessite le développement de nouveaux outils. J'ai donc suivi plusieurs stratégies en parallèle pour proposer de nouvelles approches d'étude de l'appareil de Golgi.

Tout d'abord, j'ai utilisé la technique d'Interférence ARN, qui permet d'inhiber l'expression d'une protéine d'intérêt, et ainsi révélé la complexité de la régulation du transport golgien par la GTPase Rab6.

Ensuite, j'ai suivi une stratégie reposant sur l'imagerie in vivo du désassemblage et du réassemblage de l'appareil de Golgi au cours de la mitose, et ainsi mis en évidence une étape particulière du désassemblage golgien.

Enfin, le cœur de ma thèse a consisté en la production d'anticorps recombinants dirigés contre des protéines golgiennes par *Phage Display*, et le développement de leur utilisation pour tracer le comportement des protéines-cibles in vivo.

Setting up new tools to study the dynamics of the Golgi apparatus in interphase and mitosis □ recombinant antibodies, small inhibitory RNAs, and live cell imaging.

ABSTRACT

The Golgi apparatus is a central organelle in the web of intracellular transport pathways of eukaryotic cells. The study of its complex dynamics requires the development of new tools. I have therefore followed several strategies in parallel to propose new approaches to study the Golgi apparatus.

I have first used RNA interference, a method enabling the specific depletion of a protein of interest, and thus revealed the complexity of Golgi traffic regulation by the GTPase Rab6.

I have then followed a strategy relying on the in vivo imaging of the disassembly and subsequent reassembly of the Golgi apparatus occurring in mitosis, and thus I have outlined a particular step of the disassembly process.

Finally, my thesis work has essentially consisted in producing recombinant antibodies against Golgi proteins by *Phage Display* and setting up their use to track the behavior of target proteins in vivo.

Je me souviens très bien des premiers jours de ma thèse, et de m'être demandé comment j'allais m'en sortir après les deux premières semaines. Maintenant que je suis en train de finir ce manuscrit, je dois avouer que je trouve le résultat pour le moins inattendu et que je ne soupçonnais pas vraiment les quelques détours que ma vie a pris avant de parvenir à ce point.

Evidemment les choses n'auraient pas pris cette tournure sans l'aide de nombreuses personnes que je souhaite vivement remercier. D'abord Luc Valentin, André Adoutte (dont j'espère ce manuscrit honore la mémoire), Michel Volovitch, pour l'énergie investie dans l'organisation du DEA Interface Physique-Biologie, et qui m'ont permis d'échapper à mon triste sort de physicien et devenir un peu biologiste. Ensuite Bruno, pour avoir accepté (presque les yeux fermés) de prendre le risque de me proposer une place de thésard. Ludger, et Fred, pour m'avoir accueilli au laboratoire les premiers mois, et supporté mes débuts difficiles en culture cellulaire. Franck, pour tellement de choses que je ne vais pas même essayer d'énumérer ici. Si je devais citer le plus important, je lui dois tout simplement ma façon de réfléchir et d'avoir compris ce qu'est une science expérimentale (j'étais plutôt du genre à ne jurer que par des théorèmes indéboulonnables et passer mes journées à écrire le genre de programme qui se trouve en annexe).

Je remercie aussi sincèrement Michel Volovitch de présider le jury, Catherine Rabouille et Pierre Cosson d'avoir accepté la lourde tâche de rapporteur, et avec qui j'espère poursuivre les discussions bien après la soutenance. Jean-Luc Teillaud pour sa participation en tant qu'examinateur, et François Amblard pour avoir accepté en vain de faire partie du jury et de m'avoir encadré lors de mon premier stage de recherche ce fameux été où nous sommes devenus champions du monde.

Je ne vais pas non plus tenter d'énumérer toutes les personnes que j'ai côtoyées avec plaisir pendant ces quatre années. Je pense entre autres à Arnaud dont la présence m'a beaucoup stimulé, Sandrine qui a partagé les moments difficiles dans le développement d'une technique «qui de toute façon n'a aucune chance de marcher», les étudiants qui ont sacrifié leur été à cette même technique infâme, Florence qui continue à tenir le laboratoire à bout de bras tout en distrayant les nouveaux arrivants, la trop courageuse Véro (ma motivation n'était qu'une pâle imitation de la sienne) pour m'avoir convaincu de goûter à la biologie.

Merci aussi à Megan pour son soutien et sa patience (tiens voilà bien encore quelque chose que je dois à Franck, non ?! Eh oui, s'il ne l'avait pas présenté à sa chercheuse préférée ...), même à 6000 km de distance (un truc infallible pour obtenir des montagnes de résultats de son thésard, machiavélique). Bien que je n'aie pas beaucoup vu ma famille ces années, cela ne m'a pas empêché de penser souvent à eux. Et à celui que je ne reverrai jamais.

A Adrien, Hugo, Carol et Nano

ABREVIATIONS

ADNc	ADN complémentaire
ADP	adénosine di-phosphate
ARF	ADP ribosylation factor
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine tri-phosphate
ATPase	adénosine tri-phosphatase
BFA	Bréfeldine A
CCD	charge coupled device
CFP	cyan fluorescent protein
CGN	cis Golgi network
CHO	chinese hamster ovary
COP	coat protein
DTT	dithiotreitol
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
GalNacT2	N-acetyl galactosamine transferase 2
GalT	□ 1,4-galactosyltransferase
GAP	GTPase activating protein
GDI	GDP dissociation inhibitor
GDP	guanosine di-phosphate
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GMP-PNP	5'-gunanylylimidodiphosphate
GPI	glycosyl-phosphatidyl-inositol
GTP	guanosine tri-phosphate
GTPase	guanosine tri-phosphatase
GTP[S	guanosine 5'3O-(thio)tri-phosphate
kDa	kiloDalton
MDCK	Madin-Darby canine kidney
NAGT I	N-acetyl glucosamine transferase I
NEM	N-ethylmaléimide
NSF	NEM sensitive factor
RAM	random access memory
RE	réticulum endoplasmique
SDS	sodium dodécylsulfate
siRNA	small inhibitory RNA
SNAP	soluble NSF attachment protein
SNAP25	synaptosomal associated protein of 25 kDa
SNARE	SNAP receptor
TGN	trans Golgi network
VAMP	vesicle associated membrane protein
VSV	virus de la stomatite vésiculaire bovine
VSV-G	protéine G du VSV
YFP	yellow fluorescent protein

TABLE DES MATIERES

I.	INTRODUCTION	9
I.A.	Transport intracellulaire et appareil de Golgi	9
I.A.1.	La complexité du réseau des voies de transport intracellulaire	9
I.A.2.	Fonctions de l'appareil de Golgi	11
I.A.3.	Structure de l'appareil de Golgi	14
I.A.4.	Deux modèles pour le transport intra-golgien □ vésiculaire ou maturation des citernes	16
I.A.5.	Machinerie du transport golgien	20
I.A.5.a.	Physique des membranes et transport	20
I.A.5.b.	Les différentes familles de protéines de la machinerie du transport	21
I.A.5.c.	Approches protéomiques de la machinerie du transport	24
I.A.6.	Petites GTPases	25
I.A.6.a.	Petites GTPases □ définitions et généralités	25
I.A.6.b.	GTPases du transport	26
I.A.7.	SNAREs	26
I.A.8.	Facteurs d'arrimage	27
I.A.9.	Périphérie de l'appareil de Golgi □ matrice golgienne, facteurs d'arrimage	30
I.A.9.a.	Matrice structurale	30
I.A.9.b.	Matrice fonctionnelle	32
I.A.9.c.	Golgines	32
I.A.9.d.	GRASPs	33
I.A.9.e.	Une fonction de la matrice golgienne dans le transport golgien	34
I.A.10.	Différentes voies de transport entre le RE, l'appareil de Golgi, et la membrane plasmique	36
I.A.10.a.	biosynthèse-sécrétion □ première étape, export depuis le RE	37
I.A.10.b.	biosynthèse-sécrétion □ deuxième étape, le compartiment intermédiaire	39
I.A.10.b.i.	Le manteau COPI	39
I.A.10.b.ii.	Dynamique de Arf1/COPI observées par microscopie de fluorescence in vivo	42
I.A.10.b.iii.	Bréfeldine A	44
I.A.10.c.	Transport rétrograde Golgi-RE	46
I.A.10.d.	Transport rétrograde endosomes précoces-TGN	48
I.B.	Mitose et appareil de Golgi	52
I.B.1.	Héritage des organites	52
I.B.2.	Trafic et mitose, cas de l'appareil de Golgi	53
I.B.2.a.	Problématique	53
I.B.2.b.	Héritage de l'appareil de Golgi	53
I.B.2.c.	Observations directes microscopiques et biochimiques	55
I.B.2.c.i.	Par microscopie optique, éventuellement in vivo	55
I.B.2.c.ii.	Par microscopie électronique	57
I.B.2.c.iii.	Par des méthodes biochimiques	58
I.B.2.d.	Transport depuis et vers l'appareil de Golgi en mitose	59
I.B.2.d.i.	Rétrograde Golgi-RE forcé en début de mitose	60
I.B.2.d.ii.	Rétrograde Golgi-RE inhibé en début de mitose	61
I.B.2.d.iii.	Antérograde RE-Golgi inhibé en fin de mitose	61
I.B.2.e.	Mécanismes moléculaires □ systèmes in vitro et semi-in vitro	62
I.B.2.f.	Mécanismes de réassemblage	64
I.B.2.g.	Mécanismes de désassemblage	67
I.B.3.	Appareil de Golgi et contrôle mitotique	72
I.B.4.	Trafic et cytotinèse	74
I.C.	Antibody Phage Display	77
I.C.1.	Principe	77
I.C.2.	Cas particulier du Phage Display d'anticorps	79
I.C.2.a.	ScFv ou Fab □	80
I.C.2.b.	Importance des CDRs	82
I.C.2.c.	Banques	82

I.C.3.	Pratique de présentation à la surface des phages, sélection, élution	86
I.C.3.a.	Choix d'une protéine de surface du phage filamenteux M13 pIII, pVI, pVIII, pIX	86
I.C.3.b.	Phage ou phagemide	86
I.C.3.c.	Sélection in vitro	88
I.C.3.c.i.	Cycler la sélection pour « dépasser » le « bruit de fond »	90
I.C.3.d.	Identification des clones positifs	91
I.C.4.	Nouveaux anticorps, nouvelles applications	91
I.C.4.a.	Sélection in vitro de nouveaux anticorps	92
I.C.4.a.i.	Anticorps contre des protéines conservées ou toxiques pour l'animal	93
I.C.4.a.ii.	Anticorps contre des conformations, des complexes, des organites, des cellules, des tissus préservation de l'antigène lors de l'immunisation	93
I.C.4.a.iii.	Antibody Phage Display et protéomique « haut débit »	93
I.C.4.a.iv.	Sélection « alternée » entre cycles, élution avec compétiteurs	94
I.C.4.a.v.	« Pathfinder » isolation rapide de phage-anticorps dirigés contre l'environnement local de l'antigène immobilisé	94
I.C.4.a.vi.	Sélection par double-hybride anticorps intracellulaires, ou intra-anticorps	95
I.C.4.b.	Anticorps recombinants nouvelles applications	95
I.C.4.b.i.	Anticorps versatiles	95
I.C.4.b.ii.	Intra-anticorps	96
I.C.4.b.iii.	Auto-anticorps pour l'immunothérapie	97
II.	RESULTATS	98
II.A.	Rab6A et Rab6A'	99
II.A.1.	Introduction et Résultats	99
II.A.2.	Discussion et Perspectives	102
II.B.	Anticorps recombinants contre des fractions sub-cellulaires	102
II.B.1.	Introduction	102
II.B.2.	Résultats, Discussion et Perspectives	103
II.B.2.a.	Autres organites	104
II.B.2.b.	Matrice golgienne	105
II.C.	Anticorps recombinants conformationnels	106
II.C.1.	Introduction	106
II.C.2.	Résultats, Discussion, Perspectives	107
II.C.2.a.	Détection conformationnelle des GTPases	107
II.C.2.b.	AA2, scFv anti-Rab6•GTP	108
II.C.2.c.	Utilisation de AA2 pour suivre Rab6•GTP in vivo	109
II.D.	Appareil de Golgi et mitose	111
II.D.1.	Introduction	111
II.D.2.	Résultats, Discussion	112
II.D.2.a.	Deux modes d'héritage de l'appareil de Golgi en mitose	112
II.D.2.b.	Trafic golgien et cytotocinèse	114
II.E.	Analyse de séquences protéiques à la recherche de motifs d'interaction avec COPII	115
II.F.	Annexes techniques	117
II.F.1.	Observation par microscopie de fluorescence de cellules vivantes	117
II.F.1.a.	Microscopie classique	117
II.F.1.b.	Microscopie confocale	118
II.F.1.c.	Quantification de la dynamique intracellulaire par des méthodes de corrélation	119
II.F.2.	Déplétion de protéines par Interférence ARN dans des cellules de mammifères	122
III.	DISCUSSION	124
III.A.	La Giantine et la définition d'une matrice golgienne	124

III.B.	Intermédiaires de transport sphériques ou tubulaires	129
III.C.	Héritage de l'appareil de Golgi au cours de la mitose	133
III.C.1.	Mécanismes de désassemblage et réassemblage de l'appareil de Golgi □ un biais vers le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique □	133
III.C.2.	Polémique sur le mode d'héritage de l'appareil de Golgi	135
III.C.3.	Liens avec d'autres controverses dans le cadre du transport intracellulaire	137
III.D.	Organisation en compartiments □ système statique en équilibre ou système dynamique hors équilibre □	138
III.E.	Perspectives de la technique d'<i>Antibody Phage Display</i>	140
IV.	ANNEXE	143
V.	BIBLIOGRAPHIE	144

I. INTRODUCTION

L'introduction se divise en trois parties □ la présentation de l'appareil de Golgi dans le contexte du transport intracellulaire, le problème de l'héritage de l'appareil de Golgi lors de la mitose, et enfin un exposé synthétique du principe et des applications en biologie cellulaire de la technique de production in vitro d'anticorps recombinants par présentation à la surface de phages.

I.A. Transport intracellulaire et appareil de Golgi

Dans cette première partie de l'introduction, je vais tout d'abord situer l'appareil de Golgi au sein du réseau des voies de transport intracellulaire, et plus généralement au sein de la cellule. Ensuite, je vais présenter la structure de l'appareil de Golgi et le fonctionnement du transport intra-Golgi, puis décrire brièvement la machinerie de transport intracellulaire. Les sous-familles de cette machinerie sur lesquelles mes études se sont concentrées seront ensuite présentées plus en détail. Enfin, un certain nombre de voies de transport ayant comme point d'arrivée ou de départ l'appareil de Golgi seront décrites plus avant du point de vue mécanistique et moléculaire.

I.A.1. La complexité du réseau des voies de transport intracellulaire

Les cellules eucaryotes sont organisées en compartiments subcellulaires délimités chacun par une membrane lipidique (parfois double) semblable à celle qui délimite la cellule elle-même. La lumière de ces compartiments est ainsi isolée chimiquement du cytosol qui baigne ces compartiments, ce qui permet à chacun d'eux de remplir une fonction précise à l'aide d'enzymes spécifiquement enrichies. Dans le cadre du modèle de transport vésiculaire, les molécules situées dans la lumière de ces compartiments sont transportées entre compartiments et aussi le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de «vésicules» lipidiques (sphériques ou de géométrie plus complexe)¹ qui bourgeonnent depuis un compartiment donneur et fusionnent avec un compartiment accepteur. Les molécules présentes dans le cytosol peuvent accéder à la lumière de certains compartiments seulement (le réticulum endoplasmique et les mitochondries par exemple), de même qu'elles ne peuvent échapper à leur lumière pour

¹ Dans le cas des mitochondries, des chloroplastes, et des peroxisomes, les molécules sont en général directement adressées vers ces compartiments au sein du cytosol et transloquées dans leur lumière.

rejoindre le cytosol qu'à partir de certains compartiments. Les processus d'échange de vésicules entre compartiments et d'échange de molécules entre ces compartiments et le cytosol sont très finement régulés, ce qui assure la préservation de l'intégrité des organites.

L'appareil de Golgi se situe au croisement de nombreuses voies de transport intracellulaire. Les protéines néo-synthétisées, destinées par exemple à être secrétées (voie de biosynthèse-sécrétion), sont transloquées dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE), d'où bourgeonnent des vésicules dans lesquelles elles sont empaquetées. Ces protéines atteignent la face «*cis*» de l'empilement de citernes de l'appareil de Golgi lorsque les vésicules fusionnent avec ces membranes, progressent à travers l'appareil de Golgi pour atteindre les citernes de la face «*trans*» (nous verrons que le mode de progression intra-Golgi n'est pas complètement établi), puis le réseau trans-golgien (*trans-Golgi network*, TGN). Ces molécules sont alors empaquetées dans des vésicules qui progressent jusqu'à la membrane plasmique avec laquelle elles fusionnent, et donc re-larguent leur contenu dans le milieu extracellulaire.

La majeure partie des molécules endocytées par les cellules est destinée à la voie de dégradation. Ces molécules présentes dans le milieu extracellulaire sont empaquetées dans des vésicules qui bourgeonnent depuis la membrane plasmique, puis progressent vers les endosomes précoces, tardifs et enfin les lysosomes dans lesquels la dégradation s'effectue.

Ces deux voies majeures de transport intracellulaire, la biosynthèse-sécrétion et l'endocytose «*classique*», ne rendent cependant pas compte de la complexité du transport vésiculaire au sein des cellules eucaryotes. Par exemple, les enzymes lysosomales néo-synthétisées sont transloquées dans le réticulum endoplasmique, transportées vers l'appareil de Golgi, puis le réseau trans-Golgien. De là elles sont empaquetées dans des vésicules qui progressent vers les lysosomes directement et non pas vers la membrane plasmique comme pour les protéines secrétées (Kornfeld 1992). De même, certaines toxines bactériennes, comme la toxine de Shiga (Mallard et al. 1998), sont endocytées puis transportées des endosomes vers le réseau trans-Golgien puis le réticulum endoplasmique où elles peuvent passer dans le cytosol pour attaquer leur cible. De plus, pour des raisons d'homéostasie membranaire, à chaque étape de transport vésiculaire entre deux compartiments correspond en général une voie de transport rétrograde. Celle-ci permet au compartiment donneur de la voie antérograde de recevoir en retour directement des membranes (et des protéines) du compartiment accepteur, ce qui lui permet de maintenir son intégrité.

Ainsi de nombreuses voies de transport existent et fonctionnent de façon constitutive dans les cellules eucaryotes, et l'appareil de Golgi, en particulier le réseau trans-Golgien, constitue le carrefour majeur de ces voies de transport.

I.A.2. Fonctions de l'appareil de Golgi

La fonction de l'appareil de Golgi est classiquement décrite comme la modification post-traductionnelle des protéines accédant à la lumière de ce compartiment à l'aide d'enzymes de glycosylation et sulfatation et certaines protéases (comme la furine) spécifiquement enrichies (Farquhar et Palade 1981 □ Varki 1998). Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles pour la fonction de nombreuses protéines, et il est tentant de penser que la distribution spatiale des enzymes assurant ces modifications depuis le RE jusqu'au TGN permet la réalisation des différentes étapes de modification dans le bon ordre (l'ordre des enzymes de glycosylation rencontrées le long de la voie de transport correspond à l'ordre des modifications) (Rabouille, Hui et al. 1995). La localisation de ces enzymes est si bien contrôlée qu'elles servent de marqueurs spécifiques de l'appareil de Golgi et même de nombreux sous-compartiments le long de la voie de biosynthèse-sécrétion (RE, compartiment intermédiaire, réseau cis-golgien², cis-Golgi, médial-Golgi, trans-Golgi, réseau trans-golgien). Mais dans des cellules traitées avec une drogue (Bréfeldine A, BFA) qui redistribue l'ensemble des enzymes golgiennes dans le RE, et bloque la sécrétion, les modifications sont aussi correctement effectuées (les enzymes interviennent dans le bon ordre, probablement grâce à la spécificité pour leur substrat) (Bosshart et al. 1991 □ Ivessa et al. 1992). Il est possible que si les enzymes étaient toutes localisées au RE dans une cellule qui sécrète normalement, la maturation des protéines serait moins efficace, il faudrait plus de temps pour que l'ensemble des modifications ait lieu et ceci retarderait la sortie du RE et au final la cinétique de transport. Ceci pourrait aussi résulter en une proportion non-négligeable de modifications incomplètes et donc la production et le transport coûteux de protéines non-fonctionnelles. C'est probablement pourquoi la distribution des enzymes de modification post-traductionnelle le long de la voie RE-Golgi est si bien conservée à travers l'Evolution des eucaryotes, elle constitue un avantage pour la maturation des protéines.

Cependant il me semble peu probable que cette fonction seule justifie l'existence d'un compartiment aussi complexe de par sa structure, sa dynamique, et sa composition. A nouveau, une cellule pourrait probablement fonctionner correctement en assurant l'ensemble

des modifications habituellement golgiennes au niveau du RE. En revanche, la situation centrale de l'appareil de Golgi d'un point de vue topologique dans le réseau complexe des voies de transport implique une fonction essentielle de tri et de routage. L'appareil de Golgi (et en particulier le TGN) constitue le noeud le plus connecté de ce réseau, c'est-à-dire que ce compartiment est celui vers lequel le plus grand nombre de voies convergent et duquel le plus grand nombre de voies partent. Ainsi pratiquement tous les compartiments intracellulaires sont directement connectés par une voie de transport à l'appareil de Golgi (souvent au niveau du TGN), le RE, les endosomes précoces et tardifs, les lysosomes, la vacuole des levures, la membrane plasmique (et donc le milieu extracellulaire) selon des voies d'exocytose constitutive ou régulée, et même sélectivement la membrane plasmique apicale ou baso-latérale dans les cellules polarisées.

Le RE est connecté à l'appareil de Golgi par la voie de biosynthèse-sécrétion et une ou plusieurs voies de transport rétrograde (voir I.A.10.).

Une ou plusieurs voies de transport rétrograde existent pour contrebalancer le flux de membrane de la voie de biosynthèse-sécrétion, qui relie le TGN à la membrane plasmique. Ainsi, la sous-unité B de la toxine de Shiga³ est capable d'atteindre directement le TGN depuis la membrane plasmique sans passer par les endosomes tardifs (Mallard et al. 1998□ Nichols et al. 2001), de même que la protéine endogène TGN38 (concentrée à l'équilibre au TGN). Selon les études, cette voie relie directement la membrane plasmique et le TGN ou bien après une phase d'endocytose dépendante de la clathrine, relie directement les endosomes précoces au TGN (voir I.A.10).

Les endosomes tardifs échangent directement des cargos avec le TGN, comme par exemple le récepteur au mannose-6-phosphate. Ce sucre est ajouté aux enzymes lysosomales néo-synthétisées quand elles atteignent l'appareil de Golgi, ce qui leur permet d'échapper à la voie de biosynthèse-sécrétion au niveau du TGN et d'être transportées vers leur compartiment-cible, les endosomes tardifs/lysosomes (Kornfeld 1992□Le Borgne et Hoflack 1998). Une voie rétrograde relie directement les endosomes tardifs au TGN, qui permet de recycler le récepteur au mannose-6-phosphate.

² Réseau cis-golgien, ou cis-Golgi network (CGN).

³ La toxine de Shiga, produite par *S. dysenteriae*, est un assemblage non-covalent d'une sous-unité A, responsable de l'action toxique au niveau des ribosomes lorsqu'elle les atteint, et d'une sous-unité B non-toxique qui semble responsable de son adressage et transport intracellulaire (et qui sert donc de modèle d'étude de l'holotoxine du point de vue de son transport).

La vacuole des levures, compartiment équivalent au système de dégradation des eucaryotes supérieurs, est directement reliée au TGN par plusieurs voies de transport (Conibear et Stevens 1998). Une collection de mutants chez *S. cerevisiae* a été identifiée et caractérisée, les mutants VPS (*vacuolar protein sorting*), qui sont divisés en cinq groupes en fonction du phénotype associée à leur mutation nulle (Raymond et al. 1992).

Dans certains types cellulaires (les cellules endocrines, exocrines et neuronales, qui ont une activité sécrétrice intense et très finement régulée), le TGN est relié au milieu extracellulaire par un autre type de sécrétion. Cette sécrétion régulée met en jeu des granules chargés de cargos (comme les neurotransmetteurs) formés au niveau du TGN, et qui peuvent fusionner avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu sous l'action d'un signal. Cette sécrétion régulée possède ses propres mécanismes de tri et de régulation, puisqu'elle doit fonctionner en parallèle de la sécrétion constitutive au sein de ces cellules, d'où le rôle majeur du TGN dans le tri des protéines destinées exclusivement à l'une ou l'autre de ces voies de sécrétion.

Finalement, dans le cas des cellules polarisées, qui possèdent une membrane plasmique divisée en domaines apical et basolatéral, le même problème de tri se pose. Certains cargos sont destinés exclusivement à l'un ou l'autre domaine de la membrane plasmique, et il est maintenant clair que le tri est effectué aussi au niveau du TGN (Keller et al. 2001). Dans ce contexte de tri apical/basolatéral au niveau du TGN, l'existence de microdomaines lipidiques (*rafts*) sur le TGN, enrichis en cholestérol, contenant les cargos apicaux a été proposée en tant que mécanisme de tri (Lafont et al. 1998).

En plus de cette fonction de plate-forme de tri dans le transport membranaire, l'appareil de Golgi pourrait servir de plate-forme dans d'autres processus cellulaires. Les découvertes récentes de l'existence de populations golgiennes de GTPases Ras coordonnant des cascades de signalisation (Chiu, Bivona et al. 2002 □ Caloca et al. 2003), d'une machinerie golgienne de nucléation des microtubules (Chabin-Brion et al. 2001), ainsi que le rôle proposé de la fragmentation de l'appareil de Golgi dans le déroulement correct de la mitose (Sutterlin et al. 2002) et de l'apoptose (Mancini et al. 2000 □ Lane et al. 2002 □ Machamer 2003), renforce cette idée que l'appareil de Golgi est avant tout un compartiment central qui concentre un grand nombre de fonctions dans le transport membranaire et aussi d'autres processus cellulaires.

I.A.3. Structure de l'appareil de Golgi

Dans les cellules de mammifères, l'appareil de Golgi possède une structure particulière en empilements de saccules aplatis, reliés par des extensions tubulaires (entre citernes équivalentes) en une sorte de ruban (Figure 1) (Farquhar et Palade 1981 □ Rambourg et Clermont 1997). La périphérie des citernes est fenêtrée, c'est-à-dire que les citernes sont «trouées» et présentent un grand nombre d'extensions tubulaires connectées en réseau. Certains de ces tubes relient donc deux empilements voisins, d'autres semblent se fragmenter et produire des vésicules sphériques au voisinage des citernes. Cette structure a été observée par microscopie électronique, par des techniques tomographiques, sur cellules fixées chimiquement ou cryofixées (Rambourg et Clermont 1997 □ Marsh et al. 2001). Cette structure en empilement de citernes est aussi observée dans des préparations d'appareils de Golgi purifiés (Weidman et al. 1993 □ Slusarewicz, Hui et al. 1994).

Le ruban golgien est maintenu à proximité du centrosome, centre organisateur des microtubules, de par son interaction avec des moteurs dirigés vers l'extrémité «moins» des microtubules (dynéine et certaines kinésines) (Burkhardt et al. 1997 □ Xu, Takeda et al. 2002). Lorsque les microtubules sont dépolymérisés (et que la néo-synthèse est de plus bloquée), l'appareil de Golgi se reforme en mini-empilements individuels (assurant toujours leur fonction de transport) à proximité des sites de sortie du RE, qui sont dispersés sur l'ensemble des membranes du RE dans les cellules animales (Storrie et al. 1998). Cette organisation est très similaire à celle de l'appareil de Golgi et des sites de sortie du RE dans la levure *S. cerevisiae* (Rossanese et al. 1999). Ainsi la structure élémentaire de l'appareil de Golgi en empilements, qu'ils soient dispersés ou bien connectés, est conservée à travers l'Evolution (Figure I). Nous verrons dans la suite que des travaux tentent de révéler le rôle de certaines protéines dans la maintenance de cette structure (voir I.A.9.).

D'un point de vue physique, les empilements de saccules golgiens font penser aux phases multilamellaires apparaissant spontanément dans les systèmes eau/lipides (Nelson et al. 1987). Une différence majeure est que la distance entre lamelles au sein de ces phases, contrôlée par répulsion d'origine entropique (fluctuations de courbure), est beaucoup plus grande que la distance entre citernes (quelques centaines de nm au lieu de quelques nm). Par conséquent il est probable que les empilements golgiens sont soumis à des forces de tensions latérales qui étirent les membranes et les empêchent de fluctuer afin de maintenir les citernes rapprochées. Le maintien de cette structure repose peut-être sur un squelette protéique, sorte

de matrice (voir I.A.9.), qui permet de stabiliser une phase lamellaire de bicouches lipidiques de membranes fluides en un empilement très compact.

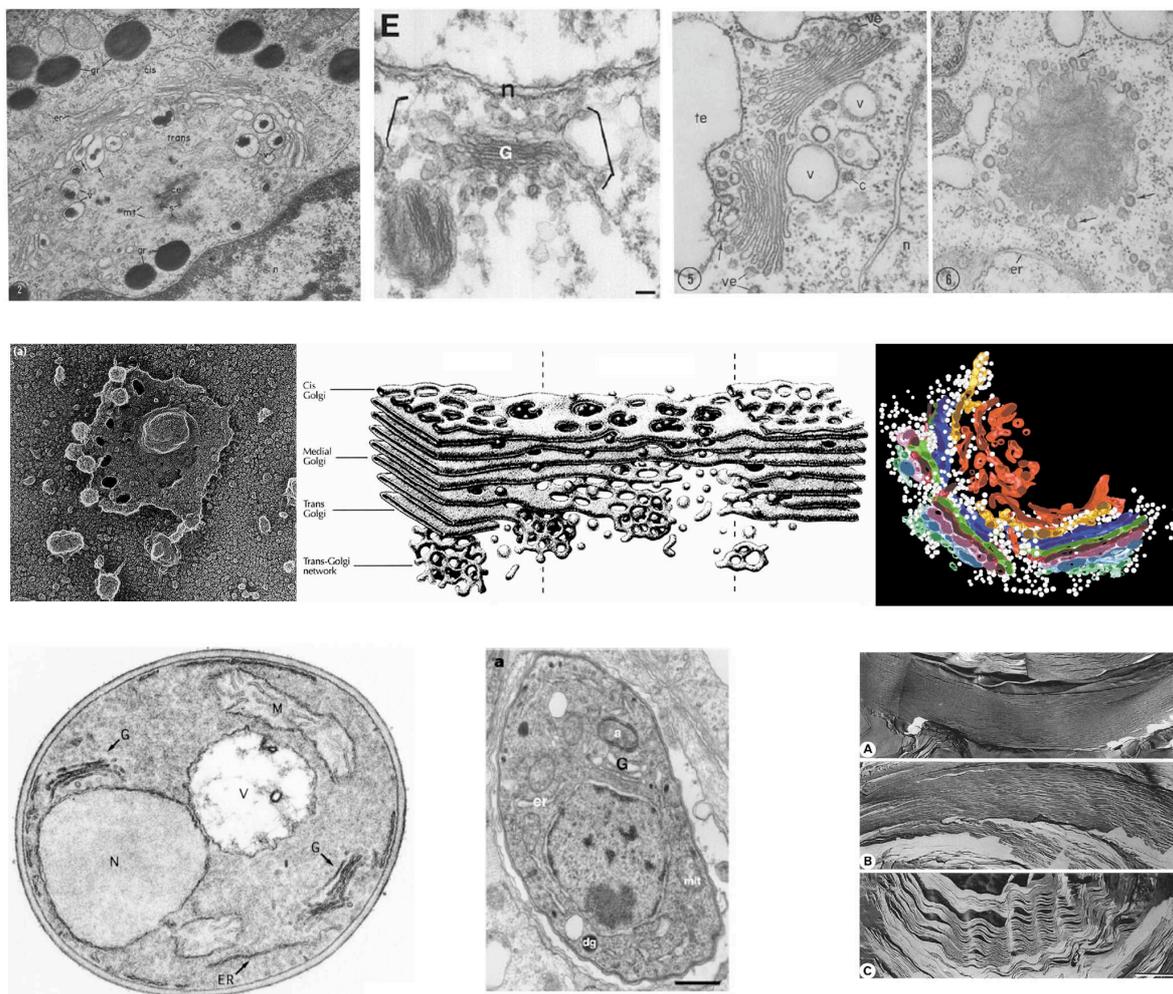


Figure 1. Structure de l'appareil de Golgi. Comparaison avec les phases lamellaires des systèmes eau/lipides.

L'appareil de Golgi est formé d'empilements de citernes polarisés de la face cis à la face trans. Ces empilements sont connectés en un ruban juxtanucléaire dans les cellules de rat (en haut à gauche (Farquhar et Palade 1981)), et les citernes sont fenêtrées près de leurs bord et aux extrémités des empilements (au milieu à gauche, une citerne d'un empilement purifié vue de face (Rothman et Warren 1994), au milieu au centre un dessin (Rothman et Warren 1994) et au milieu à droite la reconstruction tridimensionnelle (Marsh et al. 2001) représentant l'appareil de Golgi dans des cellules de rat). Cette structure de base en empilement de citernes est conservée chez *D. melanogaster* (en haut au centre (Kondylis et al. 2001)), les plantes (en haut à droite, chez l'algue *C. reinhardi* (Farquhar et Palade 1981)), *P. pastoris* (en bas à gauche (Rossanese et al. 1999)), *T. gondii* (en bas au centre (Pelletier et al. 2002)), et rappelle l'arrangement spontané des membranes en phases lamellaires dans les mélanges eau-lipides (en bas à droite (Deme' et al. 2002)). Ces derniers présentent des fluctuations de courbure des membranes (C) qui imposent un espacement important des membranes par répulsion (d'origine entropique ou électrostatique), à moins que ces structures soient figées (cristallisées, A).

I.A.4. Deux modèles pour le transport intra-golgien □ vésiculaire ou maturation des citernes

Lorsque les molécules transportées le long de la voie de biosynthèse-sécrétion atteignent la face cis d'un empilement golgien, elles progressent à travers l'empilement pour atteindre la face trans. Cependant, le chemin suivi par ces molécules fait l'objet d'une controverse □ il existe deux modèles du transport intra-golgien (Figure 2).

Le premier modèle, dit vésiculaire, suppose que l'empilement de citernes est une structure stable (probablement maintenue par une matrice sous-jacente). Les cargos seraient empaquetés dans des vésicules qui progressent depuis le RE jusqu'à la citerne cis la plus proximale, avec laquelle elles fusionnent et dans lesquelles elles libèrent leur cargo. Le cargo est ensuite empaqueté dans des vésicules qui bourgeonnent depuis cette citerne cis et progressent jusqu'à la prochaine citerne de l'empilement, immédiatement distale, dans laquelle le cargo est relargué. Ainsi le cargo progresse de citerne en citerne dans la direction antérograde au sein de vésicules. Un cargo destiné à progresser dans la direction rétrograde, dans le sens opposé, serait empaqueté dans des vésicules différentes, qui bourgeonnent d'une citerne et fusionne avec la citerne immédiatement proximale. Ce modèle nécessite donc l'existence d'au moins deux sortes de vésicules, contenant exclusivement les cargos antérogades ou rétrogrades (Orci et al. 1997).

Le second modèle, dit de maturation des citernes, suppose que les citernes de l'appareil de Golgi sont en permanence régénérées depuis le RE et détruites au niveau du TGN, et qu'elles progressent en mûrissant depuis leur formation à la face cis de l'empilement vers la face trans (Allan et Balch 1999). Dans le cadre de ce modèle, les cargos antérogades restent au sein des citernes et progressent grâce au processus de maturation des citernes d'une face à l'autre. En revanche, les cargos rétrogrades sont transportés, comme dans le modèle vésiculaire, au sein de vésicules qui progressent de citerne en citerne dans la direction rétrograde. Une conséquence majeure est que les protéines dites résidentes de l'appareil de Golgi, comme les enzymes de glycosylation qui maintiennent leur localisation à l'équilibre au sein de l'appareil de Golgi très souvent sur un sous-compartiment précis, se comportent dans ce modèle comme des cargos rétrogrades, transportées en permanence au sein de vésicules dans le sens rétrograde. A nouveau, deux modes de transport vésiculaire sont nécessaires (comme dans le premier modèle), puisque les cargos rétrogrades doivent progresser au sein de vésicules «rapides» qui leur permettent de remonter le flux intrinsèque des citernes qui mûrissent,

tandis que les protéines résidentes doivent emprunter des vésicules plus lentes qui leur permettent de compenser exactement le flux des citernes⁴. Ainsi, les vésicules qui bourgeonnent du RE seraient des «précurseurs» de citernes, qui fusionnent entre eux pour former une nouvelle citerne, et les citernes disparaissent à la face trans, étape finale du processus de maturation, après une phase cruciale de tri des cargos, en se fragmentant en vésicules contenant différents cargos destinés à différents compartiments.

Des études reposant sur des méthodes identiques mais utilisées dans des laboratoires différents ont conclu formellement pour l'une ou l'autre hypothèse. Ces méthodes consistent à immuno-localiser des cargos et des protéines résidentes de l'appareil de Golgi par microscopie électronique dans les citernes et les vésicules qui les bordent. L'argument de base de ces études est que selon le modèle de transport vésiculaire, les cargos (antérogrades par exemple) devraient se trouver essentiellement au sein de vésicules qui bordent les citernes plutôt que dans les citernes, tandis que des protéines résidentes devraient être majoritairement présentes dans les citernes plutôt que dans les vésicules péri-golgiennes (Orci et al. 2000 [1] Martinez-Menarguez et al. 2001 [2] Cosson et al. 2002). Dans le cas du modèle de maturation des citernes, le contraire devrait être observé [3] les cargos antérogrades devraient être essentiellement présents dans les citernes et les protéines résidentes dans les vésicules. En fait, cet argument n'est pas tout à fait correct, tout dépend de facteurs cinétiques, tels que le «temps de vie» des vésicules, probablement lui-même relié au flux membranaire dans les cellules (l'intensité de la sécrétion par exemple, qui dépend énormément du type cellulaire). Par exemple, dans la cadre du transport vésiculaire, si les vésicules qui transportent un cargo antérograde fusionnent très rapidement après leur bourgeonnement, alors le cargo antérograde peut très bien être majoritairement et même quasi-exclusivement distribué dans les citernes. Cette hypothèse de temps de vie très court est très plausible dans le cas de VSV-G (la protéine G du virus de la stomatite vésiculaire bovine, VSV), cargo antérograde presque systématiquement choisi, une protéine virale qui semble capable d'interagir avec la machinerie de transport (et peut-être de la modifier) de façon très efficace pour être secrétée très rapidement (voir I.A.10.). De même, dans le cadre du modèle de maturation des citernes, si le temps de vie des vésicules contenant les protéines résidentes est très court, ces protéines peuvent très bien être essentiellement distribuées dans les citernes (les études initiales de localisation des enzymes de glycolysation par microscopie électronique ont d'ailleurs conclu

⁴ Il peut en fait s'agir des mêmes vésicules de transport rétrograde, mais dans ce cas il doit exister des mécanismes différentiels de tri et d'incorporation des cargos rétrogrades et des protéines résidentes dans ces vésicules.

que celles-ci sont essentiellement présentes dans les citernes, et cette localisation permet de définir les sous-compartiments de la voie de biosynthèse-sécrétion). Clairement, une simulation numérique permettrait de mettre en lumière les facteurs cinétiques-clés, et de caractériser quelles distributions à l'équilibre permettent réellement de trancher pour l'un ou l'autre des modèles.

Une approche alternative a été initiée dans le groupe d'A. Luini qui consiste à étudier le transport de cargos de taille beaucoup plus grande que celle des vésicules qui bordent les citernes. Ces premières expériences (Bonfanti et al. 1998) et les suivantes (Mironov et al. 2001) menées dans ce groupe ont montré que ces cargos géants étaient normalement secrétés et présents dans les citernes uniquement, ce qui plaide en faveur d'un modèle d'appareil de Golgi en maturation. A nouveau le même type d'expérience réalisée par un autre groupe a conclu à l'existence de vésicules géantes capables de prendre en charge ces cargos et donc favorisait le modèle vésiculaire (Volchuk et al. 2000).

Les deux modèles ne sont pas strictement exclusifs en réalité, on peut imaginer que des vésicules circulent dans les deux sens entre des citernes qui progressent, pourvu que ces vésicules contiennent le bon cargo. Par exemple, il est possible que les citernes murent et progressent dans le sens antérograde, mais que certains cargos antérogrades «rapides» tels que VSV-G empruntent une voie vésiculaire plus rapide⁵, parallèle à celle du flux des citernes (passant de citerne en citerne et y rencontrant les enzymes de modification, VSV-G est en effet glycosylée lors de son transport antérograde). L'existence de processus de sauvetage de cargos après une erreur de tri permet aussi par exemple de justifier la présence de protéines résidentes dans les citernes—si celles-ci sont accidentellement incorporées dans des vésicules de transport dans une direction donnée, elles se retrouvent dans une citerne trop distale ou proximale, et il doit exister des mécanismes pour transporter ces protéines résidentes dans la direction opposée pour réparer cette erreur de tri, utilisant par exemple des vésicules circulant dans cette direction opposée.

Finalement, je voudrais souligner qu'il est possible d'imaginer d'autres stratégies de transport intra-Golgi—par exemple, il n'existe pas de données prouvant que le transport

⁵ Le mutant thermo-sensible tsO45 de VSVG est bloqué dans le RE à 39.5°C. Lorsque les cellules sont incubées à 32°C, VSVG est transporté du RE à l'appareil de Golgi puis à la membrane plasmique. L'appareil de Golgi est atteint en 20 minutes ($t_{1/2}$), la membrane plasmique en 50 minutes ($t_{1/2}$) (Hirschberg et al. 1998). Par des expériences de photoblanchiment, le groupe de J. Lippincott-Schwartz a évalué qu'une enzyme golgienne cycle à l'équilibre entre le RE et l'appareil de Golgi avec des cinétiques de l'ordre de 30 à 60 minutes (Zaal et al. 1999).

rétrograde Golgi-RE se fasse progressivement de citerne en citerne dans la direction rétrograde jusqu'à la face cis, puis de la face cis vers le RE. Il est aussi possible que le transport rétrograde ait lieu directement depuis le TGN vers le RE (ces deux systèmes membranaires sont souvent juxtaposés dans les cellules, comme le montrent les observations par microscopie électronique (Marsh et al. 2001)). Dans ce cas, le rôle de vésicules de transport rétrograde de citerne en citerne serait moins nécessaire (voir I.A.10.c.)⁶.

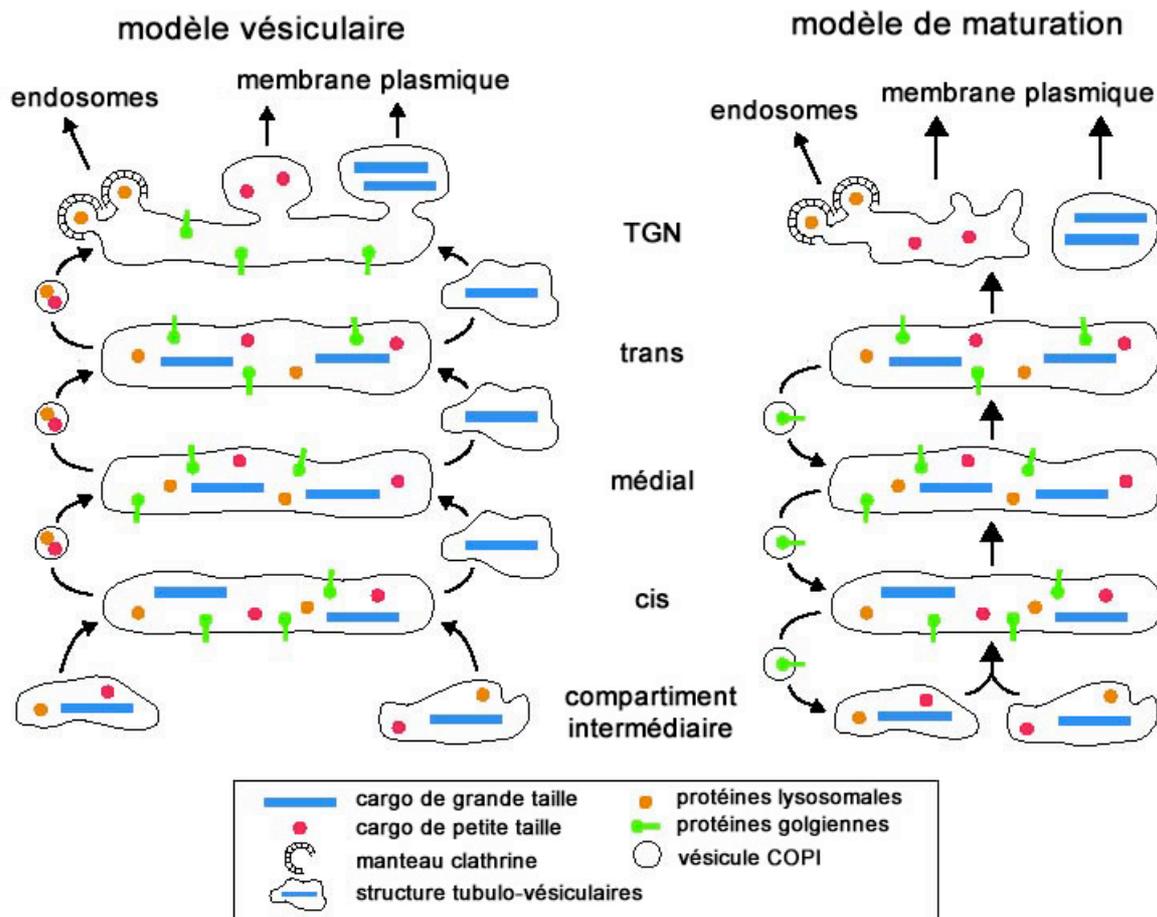


Figure 2. Les deux principaux modèles du transport intra-Golgi.

a. Le modèle vésiculaire. Les cargos, quelle que soit leur taille, progressent dans la direction antérograde au sein de vésicules échangées entre les citernes successives de l'empilement. Ces citernes restent fixes et contiennent les protéines résidentes de l'appareil de Golgi.

⁶ Cette dernière hypothèse simplifierait considérablement les mécanismes de transport vésiculaire entre citernes, elle éliminerait par exemple la nécessité de l'existence de nombreuses SNAREs spécifiques de chaque étape de transport entre deux citernes consécutives tout du moins dans le sens rétrograde. En effet, jusqu'à maintenant le nombre de SNAREs apparemment impliquées dans le transport intra-golgien est trop faible pour rendre compte du grand nombre d'événements de fusion spécifiques rendu nécessaire par les modèles présentés, en particulier le modèle purement vésiculaire (cet argument est souvent proposé pour écarter ce modèle vésiculaire).

b. Le modèle de maturation des citernes. Les citernes sont produites par fusion de membranes provenant du RE, mûrissent et progressent dans la direction antérograde, et les cargos de toutes tailles progressent ainsi en leur sein. Les protéines résidentes de l'appareil de Golgi sont retenues par transport rétrograde au sein de vésicules échangées entre citernes successives de l'empilement.

I.A.5. Machinerie du transport golgien

I.A.5.a. Physique des membranes et transport

La formation spontanée de vésicules à partir de membranes de bicouches lipidiques a été décrite expérimentalement et théoriquement, et la fusion de ces membranes est elle aussi un phénomène bien compris du point de vue physique. Les fluctuations de courbure des membranes peuvent conduire à des événements de bourgeonnement, en particulier si la membrane contient des domaines lipidiques de compositions différentes. En effet, un domaine au sein d'une membrane abaisse son énergie en réduisant la tension de la frontière qui le délimite, c'est-à-dire en réduisant la longueur de cette frontière, et une solution consiste à former un bourgeon dont le col infinitésimal sera la frontière entre ce domaine dans le bourgeon et le reste de la membrane (Julicher et Lipowsky 1993). La fusion des membranes quant à elle est thermodynamiquement favorisée par un abaissement du rapport surface/volume des vésicules. L'énergie de vésicules est proportionnelle à leur surface (tension superficielle), et donc à volume total égal la fusion de deux vésicules permet de réduire la surface totale et donc l'énergie totale.

Cependant, les membranes des compartiments intracellulaires sont des objets beaucoup plus complexes que des liposomes lipidiques artificiels à l'équilibre. Ces membranes sont composées de plusieurs types de lipides (qui forment parfois des phases bidimensionnelles au moins transitoirement), elles séparent des milieux aux propriétés chimiques très différentes (conditions oxydo-réductrices, pH, concentrations en différents ions de rapports masse/charge variés), et surtout elles contiennent des protéines. Ces protéines interagissent avec les lipides des membranes dont elles modifient les propriétés physiques, et certaines fonctionnent loin de l'équilibre thermodynamique en utilisant notamment l'énergie chimique libérée par hydrolyse de l'ATP (pour transporter des molécules à travers les membranes par exemple). Les membranes des compartiments intracellulaires sont donc hétérogènes et dans un régime hors d'équilibre thermodynamique (Ramaswamy et al. 2000). La formation de vésicules, leur transport et leur fusion avec le compartiment accepteur ne peuvent donc pas être entièrement expliquées par la Physique des membranes à l'équilibre.

I.A.5.b. Les différentes familles de protéines de la machinerie du transport

L'approche biologique consiste à caractériser la machinerie de transport, c'est-à-dire dresser l'inventaire des molécules (protéines, lipides et sucres) jouant un rôle dans ces processus et élucider leur fonction. A de très rares exceptions près^{7,8}, les protéines responsables de fonctions de transport membranaire et d'organisation des compartiments sont localisées à la surface des membranes intracellulaires, du côté cytosolique. Les fonctions de tri sont quant à elles très souvent associées à un couplage entre le domaine luminal d'une protéine, liant les cargos, et un domaine cytosolique de la même protéine ou d'une protéine d'un même complexe, liant la machinerie de transport⁹. Mais l'essentiel des protéines de transport proprement dites sont situées du côté cytosolique des membranes, en étant parfois associées à celles-ci par des domaines transmembranaires ou des modifications lipidiques (de type myristoylation, prénylation ...). Plusieurs familles de protéines constituent la machinerie de transport, qui agissent successivement lors des étapes de tri des cargos, de bourgeonnement

⁷ Une exception que j'ai rencontrée au cours de ma thèse était proposée par B. Glick, qui a suggéré en séminaire que le facteur d'échange de Sar1p, Sec12p, possédait un domaine luminal différent entre les levures *S. cerevisiae* et *P. pastoris*, et que cette différence induisait une distribution différente de Sec12p. Sec12p est distribué quasi-uniformément sur le RE chez *S. cerevisiae* tandis qu'il a une distribution concentrée sur un domaine du RE chez *P. pastoris*. En conséquence, la distribution de l'appareil de Golgi, en aval de la voie de biosynthèse-sécrétion, est dispersée, au voisinage des sites de sortie du RE, chez *S. cerevisiae*, et concentrée en un empilement compact chez *P. pastoris* (Rossanese et al. 1999).

⁸ De même, un modèle pour la localisation spécifique des enzymes golgiennes par l'intermédiaire d'interactions spécifiques de leurs queues lumineuses a été proposé (Nilsson et al. 1994) les enzymes dont les queues lumineuses sont capables d'interagir «se retiendraient» mutuellement au niveau de certaines citernes. Ce modèle de *kin recognition* n'a pas été complètement validé, une partie des résultats pourrait s'expliquer éventuellement par un mécanisme trivial la surexpression d'une enzyme (NAGTI) chimérique localisée artificiellement dans le RE en amont de la voie de biosynthèse-sécrétion (par un segment transmembranaire différent) entraîne la relocalisation dans le RE d'une enzyme qui était initialement dans le même sous-compartiment. Il est possible qu'une interaction entre les queues lumineuses de ces enzymes soit responsable de cette relocalisation de la seconde enzyme, mais il est aussi possible que la machinerie de tri soit titrée par la surexpression de l'enzyme chimérique (la surexpression de certaines enzymes chimériques altère la structure de l'appareil de Golgi (Nilsson et al. 1996)). En fait la surexpression d'une enzyme golgienne native entraîne très souvent sa localisation partielle au RE, probablement pour de telles raisons de perturbation de la machinerie de transport.

⁹ Citons par exemple les protéines transmembranaires de la famille p24, dont la fonction supposée est de servir de récepteur des cargos dans la lumière des membranes entre le RE et l'appareil de Golgi, et d'interagir avec les manteaux COPII et COPI.

des vésicules, de leur fission, leur déplacement vers le compartiment accepteur, leur arrimage à celui-ci et enfin leur fusion□

1. Les protéines constituant les manteaux vésiculaires (clathrine, COPI, COPII), les adaptateurs de manteau de type clathrine APs et GGAs, participant à la formation des vésicules et au tri des cargos (Bonifacino et Lippincott-Schwartz 2003). Ce premier événement de formation d'un bourgeon contenant des cargos triés est la première condition nécessaire à la spécificité du transport intracellulaire¹⁰.

2. Les lipides, dont la distribution inhomogène sur les membranes intracellulaires est un facteur-clé des processus de tri, voire de bourgeonnement. De plus, les enzymes de modification des lipides (kinases, phospholipases ...) entraînent des modifications locales des propriétés physico-chimiques des membranes. Les modifications lipidiques ont d'abord été considérées comme un moyen de générer localement des récepteurs lipidiques pour différentes molécules se liant aux membranes, et plus récemment leur influence sur l'élasticité de courbure et la courbure moyenne des membranes a été considérée plus en détail (Sprong et al. 2001).

3. Les protéines régulant la fission, telle la dynamine et l'endophiline (Hinshaw et Schmid 1995□Farsad et al. 2001). Une fois le bourgeon formé, ces protéines agissent au niveau du col du bourgeon et y régulent la fission membranaire.

4. Les moteurs moléculaires associés au cytosquelette (myosines, dynéine et kinésines), qui déplacent les membranes au sein de la cellule (Allan et Schroer 1999). En général, les moteurs interagissent simultanément avec le cytosquelette et les membranes à l'aide de complexes qui régulent ces interactions.

5. Les «CLIPs» (*cytoplasmic linker proteins*), couplant la dynamique membranaire à celle du cytosquelette de microtubules. Cette famille émergente de protéines a la double fonction d'une part de lier le cytosquelette de microtubules et d'autres structures (comme les membranes), et d'autre part de réguler la dynamique de croissance/décroissance des microtubules (Galjart et Perez 2003).

6. Les facteurs d'arrimage qui favorisent le rapprochement des membranes destinées à fusionner. Cette étape constitue le premier événement qui contribue au rapprochement des membranes (de la vésicule et du compartiment accepteur) destinées à fusionner (voir I.A.8.).

¹⁰ Les sucres comme le mannose-6-phosphate des enzymes lysosomales sont aussi des éléments de la machinerie de transport contribuant au tri.

7. Les protéines SNAREs, assurant la spécificité de fusion membranaire (voir I.A.7). Des combinaisons particulières de ces protéines, distribuées chacune à la surface d'un ensemble particulier de membranes intracellulaires, sont capables d'interagir fortement et spécifiquement, et donc ces protéines fournissent la base moléculaire rendant compte de la spécificité des événements de fusion. Leur rôle dans le processus de fusion lui-même est de plus proposé.

8. Certaines petites GTPases de la superfamille Ras (Rabs, Arfs, Sar), qui régulent spatio-temporellement le transport en recrutant certaines de ces protéines effectrices (familles ci-dessus) en se liant aux membranes et en basculant dans un état actif lié au GTP (voir I.A.6.). Ces protéines sont elles aussi présentes spécifiquement sur certains compartiments ou vésicules destinées à fusionner avec un compartiment donné, et contribuent donc à la spécificité des événements de transport.

Certaines de ces familles de protéines de la machinerie du transport ont été essentiellement découvertes à l'aide de cribles génétiques chez *S. cerevisiae* ou l'utilisation de systèmes in vitro de reconstitution du transport. Les groupes de P. Novick et R. Schekman ont en effet caractérisé une collection de groupes de complémentations de mutants de sécrétion, nommés SEC, qui ont ensuite été subdivisés en fonction de l'étape à laquelle le transport est bloqué (sortie du RE, sortie de l'appareil de Golgi, fusion avec la membrane plasmique) (Novick et al. 1980 □ Novick et al. 1981). Les GTPases régulatrices du transport, certains composants des manteaux COPII et COPI, l'ATPase NSF, parmi de nombreux autres facteurs, ont ainsi été identifiés.

Un système in vitro de transport intra-Golgi (passage d'un cargo d'une citerne à la suivante) mis au point dans l'équipe de J. Rothman a permis de découvrir les acteurs-clés du transport golgien (Balch et al. 1984). Le processus de transport reconstitué dans ce système in vitro est sensible au N-Ethylmaléimide (NEM, un agent alkylant), ce qui aboutira à la découverte de l'ATPase NSF et des SNAREs, au GTP[S (analogue non-hydrolysable du GTP) et d'autres composés inhibant les GTPases, tels AlF_4 , ainsi qu'à RabGDI (une protéine régulatrice de l'activité de plusieurs Rabs, qui sert de chaperone aux Rabs dans l'état GDP et donc finit par les séquestrer dans cet état ce qui inhibe très efficacement leur passage à l'état GTP). En utilisant ces inhibiteurs, des vésicules contenant le cargo ont pu être isolées, en fait gelées dans un état artificiel (incapables de fusionner avec le compartiment accepteur). Le facteur alkylé lors de l'inhibition par le NEM a été identifié en tant que l'ATPase NSF (*NEM-*

sensitive factor, une AAA ATPase), qui s'associe à ses co-facteurs, les SNAPs (*soluble NSF attachment proteins*), eux-mêmes possédant des récepteurs sur les membranes, les SNAREs (*soluble NSF attachment protein receptors*) (voir I.A.7.). Lors de l'inhibition par le GTP γ S, les vésicules obtenues sont recouvertes d'un manteau, différent de la clathrine, qui a pu être caractérisé en tant qu'hétéroheptamère et nommé COPI. Le blocage du transport avec le GTP γ S a permis de mettre en évidence le rôle de Arf1 (*ADP-ribosylation factor 1*), dont COPI est un effecteur (voir I.A.10.b.).

I.A.5.c. Approches protéomiques de la machinerie du transport

Le scénario du transport vésiculaire a été considérablement détaillé et approfondi ces dernières années, mais plusieurs points restent obscurs, en particulier les transitions entre les étapes assurées par les acteurs-clés déjà identifiés. Probablement, la connaissance de cette machinerie de transport n'est pas encore exhaustive, et il reste de nombreuses autres molécules à identifier et caractériser, qui joueraient des rôles au niveau de ces étapes déjà connues ou de l'enchaînement entre ces étapes. Avec le développement des bases de données génomiques, les approches de type protéomique ont vu le jour. L'analyse par spectrométrie de masse, par exemple, permet de dresser un panorama de l'ensemble des protéines associées à un organe donné que l'on sait purifier, du moins celles qui sont suffisamment abondantes pour être micro-séquencées et dont la séquence est présente dans les bases de données génomiques. Cette méthode a été appliquée à l'appareil de Golgi purifié à partir de foie ou de glande mammaire de rat (Taylor et al. 2000 [Wu, Taylor et al. 2000 [Wu, Yates et al. 2000 [Bell et al. 2001 [Wu et al. 2003]). Ces études ont permis de confirmer l'identité de certaines protéines golgiennes et d'en identifier de nouvelles, mais sont limitées pour plusieurs raisons. L'appareil de Golgi purifié n'est pas pur à 100%, et quelques «contaminants» ont été séquencés. Le problème est qu'il n'y a pas de moyen simple de dire si une protéine «surprenante» est un contaminant ou un nouveau composant golgien, ce que seule une étude complète de la protéine en question peut trancher. D'autre part, on ne sait purifier efficacement l'appareil de Golgi en grande quantité qu'à partir de foie (ou d'autres tissus destinés à sécréter énormément), et souvent les protéines séquencées proviennent d'animaux (constituant une source illimitée de tels tissus frais) dont le génome n'est pas complètement séquencé à l'heure actuelle, ce qui complique l'identification de ces protéines. Enfin et surtout, il est difficile de distinguer a priori les protéines luminales telles les enzymes, les chaperones, des protéines de la machinerie de transport, essentiellement cytosoliques. La liste

obtenue ne permet de classer les protéines golgiennes que selon leur taille et les familles déjà définies par des études fonctionnelles antérieures.

I.A.6. *Petites GTPases*

I.A.6.a. Petites GTPases Définitions et généralités

Il existe deux familles de GTPases, les protéines Arfs (6 membres connus chez les mammifères) et les protéines Rabs (60 membres connus chez les mammifères) (Chavrier et Goud 1999), en plus de la GTPase Sar1, qui contrôlent l'ensemble des voies de transport intracellulaire. Chacune de ces GTPases est associée à un compartiment donné et y régule une voie particulière. L'étude de ces GTPases, la caractérisation de leurs protéines régulatrices (voir ci-dessous), de leurs effecteurs, sont des points centraux de la compréhension globale du trafic membranaire chez les eucaryotes.

Plus généralement, les petites GTPases de la superfamille Ras sont les régulateurs-clés de nombreux processus cellulaires (Valencia et al. 1991; Dasso 2002; Etienne-Manneville et Hall 2002; Do Heo et Meyer 2003). La sous-unité α des GTPases hétérotrimériques utilise la même stratégie pour contrôler certaines cascades de signalisation. Ces GTPases oscillent entre deux états, l'un lié au GTP et l'autre au GDP, auxquels correspondent deux conformations moléculaires bien distinctes et deux jeux d'interacteurs bien distincts (Bourne et al. 1990; Bourne et al. 1991). De plus, dans le cas des GTPases Rabs, Arfs et Sar, un cycle d'association/dissociation aux membranes est couplé au cycle GDP-GTP. L'hypothèse communément admise est que ces GTPases sont essentiellement cytosoliques sous forme GDP et associées aux membranes sous forme GTP grâce à une modification lipidique (Chavrier et Goud 1999). Les effecteurs, protéines effectrices spécifiques de chaque GTPase, lient les GTPases sous forme GTP. Dans le cas des Rabs, il existe des chaperones (*GDP dissociation inhibitor*, GDI) spécifiques de l'état GDP. De plus, en particulier dans le cas des Rabs, le passage d'un état à l'autre n'est pas toujours spontané (les cinétiques de passage spontané sont trop lentes) et nécessite une catalyse assurée par des protéines régulatrices, les facteurs d'échange (*guanosine exchange factor*, GEF, passage GDP-GTP) et les protéines activatrices (*GTPase activating proteins*, GAP, passage GTP-GDP). Si ce mode de fonctionnement est bien connu depuis quelques années, la coordination entre la fixation des effecteurs est l'action des protéines GAP par exemple, et même la possibilité pour une GTPase de recruter plusieurs effecteurs simultanément, ne sont pas encore comprises.

Des mutants ponctuels de la GTPase Ras, bloqués dans un état conformationnel de type GDP ou GTP, ont été caractérisés. Des mutations similaires des petites GTPases génèrent très souvent des protéines bloquées dans un état GDP ou GTP. L'utilisation de ces mutants a été systématiquement utilisée en tant que dominants négatifs et positifs pour étudier la fonction de ces GTPases, déterminer la structure moléculaire des deux conformations, ou bien pour identifier des partenaires spécifiques de chacun des deux états (double-hybride, *GST-pull down*).

I.A.6.b. GTPases du transport

Les familles Sar et Arf ont une fonction de régulation des étapes de tri des cargos et de bourgeonnement des vésicules (Chavrier et Goud 1999). Elles ont pour effecteur les manteaux vésiculaires (respectivement COPII et COPI), qui interagissent avec les cargos (et donc participent directement au tri) et déforment les membranes (produisent des vésicules à partir de liposomes *in vitro*). Les GTPases de la famille Arf, en particulier Arf1, possèdent de nombreux effecteurs supplémentaires, comme par exemple des enzymes de modification des lipides (dont l'action module l'élasticité de courbure des membranes et la capacité à bourgeonner, en plus de permettre le recrutement de certains facteurs se liant aux lipides modifiés).

La famille des GTPases Rab est de loin la plus large, et ces différentes GTPases semblent réguler le transport à de nombreuses étapes, du bourgeonnement à la fusion (Zerial et McBride 2001). Elles possèdent des effecteurs de nature très diverses □ des enzymes de modification des lipides, des moteurs moléculaires, des facteurs d'arrimage, des SNAREs (et NSF) ...

L'état nucléotidique de ces GTPases lors des différentes phases du transport est en fait mal connu, l'hypothèse de base de bijection entre la fraction cytosolique et la forme GDP d'une part et la fraction membranaire et la forme GTP d'autre part n'a pas été testée du moins systématiquement. Par exemple, Rab5 semble pouvoir exister en grande proportion dans l'état GDP associé aux membranes (Stahl et al. 1994). La fréquence du cycle nucléotidique et celle du cycle d'association/dissociation membranaire n'ont pas été non plus systématiquement caractérisées.

I.A.7. *SNAREs*

La famille des SNAREs, conservée dans tous les organismes eucaryotes, est constituée de protéines transmembranaires associées aux membranes d'un compartiment accepteur donné ou des vésicules qui sont destinées à fusionner avec un compartiment donné. Nous avons vu que leur rôle dans le transport a été identifié grâce au système *in vitro* de transport intra-Golgi. Leur rôle a aussi été mis en évidence dans l'étude de la sécrétion de neurotransmetteurs (Schiavo et al. 1992), des études génétiques chez *D. melanogaster* (Schulze et al. 1995), et leur conservation chez les eucaryotes a été révélée par la découverte d'homologues chez *S. cerevisiae* (Bennett et Scheller 1993). Elles sont classées en tSNAREs (*target SNAREs*, présentes sur le compartiment-cible) et vSNAREs (*vesicle SNAREs*, présentes sur les vésicules). Lorsque ces protéines sont présentées sur des liposomes artificiels *in vitro*, seules certaines combinaisons de quatre SNAREs (trois tSNAREs et une vSNAREs) sont capables de former un complexe en trans¹¹ très stable (grâce à leur motif SNARE en hélice) qui rapproche les membranes, et peut-être catalyse la fusion des membranes ainsi rapprochées¹² (McNew et al. 2000). Comme je l'ai précisé dans le paragraphe sur la machinerie du transport golgien, la sensibilité du transport intra-Golgi *in vitro* au NEM a conduit à la découverte de l'ATPase NSF (Block et al. 1988 □ Malhotra et al. 1988 □ Beckers et al. 1989), puis à celles des SNAREs (Wiedman et al. 1989 □ Clary et al. 1990 □ Söllner et al. 1993). La fonction générale de NSF (nous verrons plus loin que d'autres fonctions dans la dynamique membranaire sont proposées) serait de catalyser le désappariement des SNAREs juste après l'événement de fusion¹³, afin de recycler les SNAREs en vue de leur prochain appariement. NSF serait sous sa forme liée à l'ATP pour interagir avec les SNAREs (par l'intermédiaire de cofacteurs, les SNAPs), et l'hydrolyse de l'ATP serait couplée au désappariement des SNAREs. Les SNAREs (en conjonction avec NSF et les SNAPs) constituent la machinerie déterminant la spécificité de la fusion membranaire, à une étape très proche de ou correspondant à l'événement de fusion lui-même (McNew et al. 2000).

I.A.8. Facteurs d'arrimage

¹¹ Il existe aussi des complexes cis-SNAREs, mis en jeu dans la fusion membranaire homotypique.

¹² L'action postérieure de protéines comme la sous-unité V_0 de la pompe à protons, une AAA ATPase, capable de former un canal protéo-lipidique au site de contact des membranes, serait responsable de la fusion proprement dite dans certains cas au moins, comme la fusion homotypique des vacuoles chez *S. cerevisiae* (Peters et al. 2001).

¹³ au moment où celles-ci sont associées en un complexe très stable, résistant au dodécylsulfate de sodium (SDS), sur la membrane du compartiment accepteur

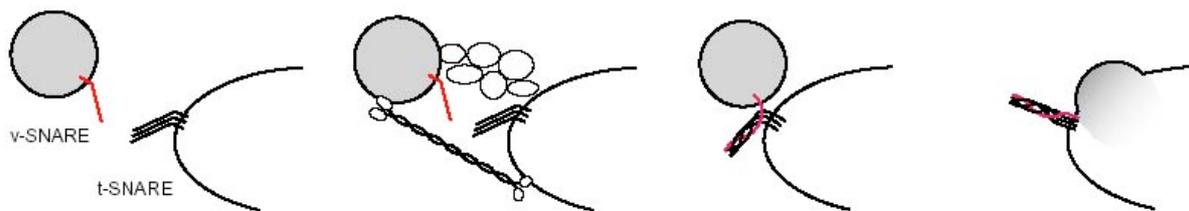


Figure 3. L'arrimage des vésicules à leur membrane-cible est assuré par des facteurs d'arrimage, et favorise l'étape suivante d'amarrage effectuée par les SNAREs (Whyte et Munro 2002).

La fonction d'arrimage des vésicules au compartiment accepteur a été récemment proposé pour plusieurs protéines (en général de grande taille) et complexes multi-protéiques (Figure 3) (Pfeffer 1999 □ Whyte et Munro 2002). Cette fonction d'arrimage précède l'étape d'accostage dépendante de la formation des complexes SNAREs □ le rapprochement des membranes destinées à fusionner semble s'effectuer en deux étapes qui s'enchaînent successivement, par formation de complexes ou d'interactions de protéines de tailles de plus en plus petites. Quelques points communs existent entre certains des complexes d'arrimage, mais la définition de facteurs d'arrimage est encore très floue, que ce soit du point de vue de la structure ou de la fonction de ces protéines. En général il n'existe pas de phénotype commun à tous les facteurs d'arrimage, ni de système *in vitro* permettant de caractériser une telle fonction (comme pour la fusion, le bourgeonnement, le déplacement de membranes sur le cytosquelette) hormis pour la voie RE-Golgi.

Uso1p (homologue de levure de p115) a été le premier facteur d'arrimage identifié justement par des systèmes *in vitro* et semi-*in vitro* chez *S. cerevisiae* (Barlowe 1997 □ Cao et al. 1998). Ces systèmes de transport du pro-facteur □ reposant sur l'incubation de membranes (préalablement lavées) avec des protéines purifiées ont permis de caractériser une combinaison minimale de facteurs solubles permettant le bourgeonnement des vésicules du RE (Sar1p-COPII), l'arrimage des vésicules (p115), et leur fusion avec les membranes golgiennes (Sec18p, homologue de NSF, et le complexe LMA1). La fonction d'arrimage est très clairement décrite par ce système □ elle est postérieure à la formation des vésicules, préalable à l'étape de fusion NSF/SNAREs-dépendante et ne nécessite pas l'action de la machinerie de fusion. RabGDI, qui inhibe l'activité des YPT/Rabs, empêche l'arrimage des vésicules. En revanche les vésicules arrimées mais pas encore fusionnées (si NSF est absent de la réaction par exemple) restent arrimées si RabGDI est ajouté à la réaction. Le système semi-*in vitro* d'incubation de cellules perméabilisées permet de caractériser très simplement les vésicules non-arrimées (et donc en suspension) des vésicules arrimées à l'appareil de Golgi □ les premières sont diluées si le tampon d'incubation est dilué en fin d'expérience, pas

les secondes. Ces expériences ont donc mis en évidence que USO1/p115 est un facteur d'arrimage, dont l'action nécessite l'activité d'une Rab, qui se révélera être YPT1/Rab1. Les interactions de p115 avec GM130 et la Giantine et leur rôle dans le transport RE-Golgi et la reformation de l'appareil de Golgi en fin de mitose ont conduit le groupe de G. Warren (voir I.A.9. et I.B.) à proposer que le complexe Giantine-p115-GM130 est un complexe facteur d'arrimage à l'appareil de Golgi dans les cellules de mammifères (GM130 et la Giantine ne possèdent pas d'homologues connus chez *S. cerevisiae*) (Seemann, Jokitalo et Warren 2000).

Contrairement aux autres facteurs assurant le transport intracellulaire (GTPases, SNAREs ...), ces premiers facteurs d'arrimage ne semblent pas former de famille définie par exemple par un consensus de séquence protéique. Leur point commun, si l'on considère les autres protéines de la matrice golgienne effectrices de Rabs, est leur grande taille, leur structure globale en longue hélice enroulée (*coiled-coil*) et leur interaction spécifique avec certaines autres protéines de la matrice. Ces protéines sont probablement très accessibles aux membranes-cibles de par leur grande taille, en interagissant à distance elles ralentissent au moins les vésicules destinées à fusionner et permettent de favoriser cinétiquement la fusion dépendante des SNAREs (Shorter et al. 2002).

Depuis, plusieurs complexes ont été identifiés grâce à des mutants de *S. cerevisiae* qui semblent avoir cette même fonction d'arrimage. La mutation de certains des huit composants du complexe exocyste chez *S. cerevisiae*, conservé jusqu'aux mammifères, entraîne l'accumulation de vésicules post-golgiennes destinées à fusionner avec la membrane plasmique (sécrétion polarisée vers le futur bourgeon), en empêchant leur arrimage. La fonction de ce complexe exocyste correspond donc à celle de p115, et dépend de même d'une YPT/Rab, Sec4p (Guo et al. 1999). Ce complexe interagit de plus avec des tSNAREs de la membrane plasmique, ce qui peut favoriser la coordination des étapes d'arrimage et de fusion.

Les complexes COG et GARP (identifiés eux aussi à l'aide de mutants de levure et conservés de *S. cerevisiae* aux mammifères) possèdent respectivement huit et quatre composants, et présentent des analogies de séquences avec le complexe exocyste. Le groupe de S. Munro a révélé les similitudes entre ces trois complexes, formés de multiples de quatre composants, et possédant un motif caractéristique N-terminal (Whyte et Munro 2001). La fonction d'arrimage du complexe COG est mal comprise, la voie dans laquelle il est impliqué fait l'objet de controverses (Golgi-RE, endosomes-Golgi). Son activité semble dépendre des YPT/Rabs (YPT1/Rab1), et un nouveau système *in vitro* a permis de caractériser un événement d'arrimage associé à ce complexe (VanRheenen et al. 1999 □ Suvorova et al. 2001 □ Morsomme et Riezman 2002 □ Suvorova et al. 2002 □ Ungar et al. 2002). Le complexe

GARP n'a pas de fonction d'arrimage bien caractérisée mais ses interactions avec la tSNARE du TGN Tg11p et YPT6/Rab6 ainsi que son rôle dans le transport endosomes/Golgi sont maintenant clairs (et probablement conservés chez les mammifères) (Siniosoglou et Pelham 2001 □ Siniosoglou et Pelham 2002).

Il existe d'autres complexes définis en tant que facteurs d'arrimage (TRAPPI et II, Class C VPS, Dsl1p), en général isolé grâce à des mutants de *S. cerevisiae* présentant des défauts de transport, et qui ne semblent pas présenter d'analogie de composition avec les trois complexes exocyste/COG/GARP. En revanche certains semblent interagir avec les YTP/Rabs, en tant que facteurs d'échange (promouvant l'activité de ces GTPases) et/ou effecteurs (Barrowman et al. 2000 □ Wang et al. 2000 □ Reilly et al. 2001; Sacher et al. 2001 □

Notons aussi le facteur d'arrimage des endosomes précoces, EEA1, effecteur de Rab5, qui favorise la fusion homotypique des endosomes en conjonction avec des SNAREs (McBride et al. 1999 □ Dumas et al. 2001).

En conclusion, l'existence de protéines et complexes dont la fonction est d'arrimer les vésicules destinées à fusionner avec leur compartiment-cible semble désormais acquise. Les YPT/Rabs régulent leur fonction, et leur interaction avec les tSNAREs du compartiment-cible coordonnent probablement les étapes successives d'arrimage et de fusion.

I.A.9. Périphérie de l'appareil de Golgi □ matrice golgienne, facteurs d'arrimage

Je vais ici présenter les familles de protéines présentes dans la périphérie de l'appareil de Golgi, qui sont accessibles aux molécules et aux membranes depuis le cytosol. Tout d'abord ces protéines ont été identifiées au cours de la caractérisation d'une matrice golgienne hypothétique, sorte de squelette statique structural. Comme nous le verrons ensuite, ces protéines se sont souvent révélées posséder des comportements et fonctions dynamiques, en tant que facteurs d'arrimages.

I.A.9.a. Matrice structurale

La matrice golgienne est un ensemble de protéines périphériques de l'appareil de Golgi. Ce sont des protéines de grande taille en général, qui adoptent une conformation en hélice enroulée (*coiled-coil*) sur une grande partie de leur longueur, et situées quasi-uniquement du côté cytosolique des membranes (avec parfois un domaine transmembranaire très court ou une

modification lipidique assurant leur association avec les membranes). Ces protéines de grande taille ne possèdent en général pas d'activité enzymatique connue à ce jour. Elles interagissent spécifiquement entre elles, certaines sont supposées oligomériser. Leur fonction n'est pas complètement caractérisée. Il est possible que ces protéines soient des facteurs d'arrimage, des sortes de pré-SNARES à longue portée (voir I.A.8.). Une autre hypothèse, proposée par les équipes de H.M. Ellerby et S. Lee, est que des hélices amphiphiles possédant une terminaison hydrophobe sont capables de générer au moins *in vitro* des objets membranaires de morphologie comparable à celle des organites de la voie de biosynthèse-sécrétion (éléments golgiens) à partir de liposomes lipidiques artificiels (Lee et al. 2001). Ces protéines de la matrice golgienne pourraient donc intrinsèquement générer la structure et la morphologie des membranes golgiennes.

La notion de matrice golgienne avait été initialement proposée par le groupe de Graham Warren pour définir une structure protéique servant de squelette aux membranes golgiennes afin d'assurer la maintenance de sa morphologie en empilement de saccules (Slusarewicz, Nilsson et al. 1994). Des filaments ont été observés par microscopie électronique entre les citernes et le long des citernes, qui laissaient supposer l'existence de cette structure (Cluett et Brown 1992 □ Orci et al. 1998). De plus, les empilements golgiens purifiés sont dissociés par protéolyse ménagée, ce qui suggère qu'effectivement des protéines sont responsables de la structure en empilements de citernes (Cluett et Brown 1992). La première approche visant à caractériser cette matrice a donc consisté à adapter la méthode utilisée pour isoler la lamine nucléaire à partir des noyaux (Dwyer et Blobel 1976) □ des empilements golgiens intacts purifiés à partir de foie de rats ont été extraits avec un détergent non-ionique (Triton TX100) puis lavés à faible force saline (Slusarewicz, Nilsson et al. 1994). La structure protéique obtenue est capable de fixer les enzymes golgiennes médiales.

Afin de caractériser la composition de cette matrice golgienne, cette structure protéique a été ensuite injectée dans des lapins pour produire des anticorps et identifier leur cible par criblage de banque d'expression. La protéine GM130 a été ainsi identifiée (Nakamura et al. 1995). Elle n'interagit pas avec les enzymes golgiennes, et donc d'autres protéines, qui n'ont pas été identifiées par cette méthode, doivent entrer dans la composition de la matrice structurale. Une approche de type «*protéomique*», d'identification systématique par spectrométrie de masse, pourrait en fait révéler cette composition (cette technique est nettement plus performante actuellement, elle n'était pas encore disponible au moment où cette étude a été réalisée).

I.A.9.b. Matrice fonctionnelle

D'autres protéines, telle la Giantine ou p115, découvertes antérieurement et indépendamment (Linstedt et Hauri 1993 □ Sapperstein et al. 1995), font aussi partie de la matrice golgienne, mais désormais la définition de celle-ci (toujours proposée par le groupe de G. Warren) n'est plus biochimique mais davantage fonctionnelle. Ces protéines ne sont pas nécessairement résistantes à une extraction au Triton TX100. En revanche, certaines d'entre elles sont présentes sur des structures ponctiformes bien distinctes, dispersées dans le cytoplasme, lorsque les enzymes résidentes de l'appareil de Golgi sont redistribuées dans le RE par l'action de la drogue Bréfeldine A (BFA) (Seemann, Jokitalo, Pypaert et al. 2000). Ces structures correspondraient en réalité aux sites de sortie du RE, COPII-positifs (voir I.A.10.), dont la morphologie et la fonction de tri ne sont pas affectées par cette drogue (Ward et al. 2001). De façon intéressante, des analyses de séquences que j'ai effectuées suggèrent que la plupart des protéines de la matrice golgienne (et surtout p115) contiennent en fait un motif d'interaction avec COPII (contrairement aux enzymes résidentes de l'appareil de Golgi), ce qui pourrait expliquer leur enrichissement aux sites de sorties du RE sous l'action de la BFA (voir I.A.10.a. et la partie Résultats). Les structures ponctiformes dispersées serviraient de point de départ dans la reformation de l'appareil de Golgi lorsque la drogue BFA est retirée des cellules (Seemann, Jokitalo, Pypaert et al. 2000)¹⁴. En conséquence, les protéines qui sont accumulées dans les structures ponctiformes sous traitement par la BFA et/ou qui interagissent avec des protéines de la matrice golgienne sont à leur tour incluses dans cette nouvelle définition de la matrice. Par exemple la Golgine84 est extraite par le Triton TX100 (Bascom et al. 1999), redistribuée dans le RE par traitement par la BFA, mais sa similarité de séquence avec la Giantine¹⁵ et ses rôles dans la structure et la fonction de l'appareil de Golgi en font un composant de la matrice golgienne (Diao et al. 2003 □ Satoh et al. 2003).

I.A.9.c. Golgines

Un grand nombre des protéines de la matrice golgienne appartiennent à la famille des «golgines» (Chan et Fritzler 1998). Ce sont des protéines de grande taille en général, de

¹⁴ De même, le groupe de Warren propose que la matrice golgienne est héritée indépendamment du RE lors de la mitose et sert de point de départ lors la reformation de l'appareil de Golgi en télophase (voir I.B.).

¹⁵ elle-même redistribuée au RE par traitement par la BFA mais résistante au Triton TX100

structure essentiellement en hélice enroulée (*coiled-coil*), et qui ont la particularité d'avoir initialement été caractérisées en tant qu'auto-antigènes associés à des pathologies rhumatismales¹⁶. Certaines sous-familles de golgines sont définies par similarité de séquence et topologie membranaire. Une de ces sous-familles comprend la Giantine, Golgine84, et CASP (Gillingham et al. 2002). Ces trois protéines sont transmembranaires (sans segment luminal), et leur association avec l'appareil de Golgi semble due à un motif présent à proximité du segment transmembranaire (Misumi et al. 2001). Comme pour le reste des golgines (et des protéines de l'appareil de Golgi en fait), le problème de l'adressage spécifique à l'appareil de Golgi n'est pas compris. Dans le cas de GM130 et GRASP65, deux protéines de la matrice golgienne qui ne possèdent pas de segment transmembranaire¹⁷, un adressage à l'appareil de Golgi post-traductionnels sans passage par le RE ont été proposés (Yoshimura et al. 2001). Pour les protéines transmembranaires comme la Giantine, l'association aux membranes se ferait au RE post-traductionnellement, puis après transport à l'appareil de Golgi ces protéines seraient retenues par un mécanisme inconnu (Linstedt et al. 1995), mettant en jeu le motif cytosolique C-terminal (Misumi et al. 2001). Une possibilité est que ces protéines interagissent entre elles au moins deux par deux, et que seulement certaines soient ancrées à l'appareil de Golgi stablement.

I.A.9.d. GRASPs

Les protéines GRASPs (*Golgi reassembly stacking proteins*) constituent la sous-famille de la matrice golgienne la plus énigmatique. Ces protéines sont cytosoliques et leur myristoylation leur permet de s'ancrer aux membranes (GRASP55 est de plus palmitoylée), mais la proportion entre les fractions «membranaire» et «soluble» varie de 0% à 100% selon les publications. Elles ont été proposées être uniquement associées aux membranes (par des méthodes biochimiques de fractionnement subcellulaires) (Barr et al. 1997) ou bien être essentiellement solubles (par ces mêmes méthodes) et en rapide échange continu avec les membranes (par des expériences de photoblanchiment de fluorescence *in vivo*) (Ward et al. 2001). GRASP65 et GRASP55 interagissent avec les membranes golgiennes par leur extrémité N-terminale qui est myristoylée et avec l'extrémité C-terminale de respectivement GM130 et Golgine45 par leur extrémité C-terminale (Barr et al. 1998; Short et al. 2001). Ces

¹⁶ L'existence de nombreux auto-antigènes golgiens n'est pas encore comprise.

¹⁷ GM130 est cytosolique et s'associe aux membranes par son récepteur GRASP65, qui est prénylé.

protéines sont beaucoup mieux conservées que celles dont elles sont supposées être les récepteurs, elles possèdent un homologue potentiel commun chez *S. cerevisiae*, Grh1p (Norman et al. 1999 □ Shorter et Warren 2002). Leur conservation rend plausible leur fonction dans la structure en empilement de citernes de l'appareil de Golgi, elle-même extrêmement bien conservée, en revanche les autres protéines de la matrice golgienne (supposées elles aussi contribuer à cette structure) comme les golgines n'ont pas d'homologue connu chez *S. cerevisiae* (voire *D. melanogaster* ou *C. elegans*)¹⁸. Les GRASPs forment des complexes de très grande taille (détectés par filtration sur gel) contenant les golgines associées, ce qui renforce l'idée qu'elles font partie d'une matrice golgienne. Initialement GRASP65 a été découverte en tant que protéine accessible à la surface des membranes golgiennes uniquement en mitose¹⁹ et utilisée dans un mécanisme sensible au NEM de reformation de l'appareil de Golgi en sortie de mitose (voir I.B.) (Barr et al. 1997). GRASP55 a été identifiée par analogie de séquence avec GRASP65 (Shorter et al. 1999). Le rôle de ces protéines dans la reformation de l'appareil de Golgi en fin de mitose a été établi in vitro, mais pas encore confirmé in vivo²⁰. En revanche, GRASP65 semble jouer un rôle crucial dans le désassemblage de l'appareil de Golgi en début de mitose et même le contrôle de l'entrée en mitose (voir I.B.3.). De plus, la fragmentation de l'appareil de Golgi déclenchée lors de l'apoptose repose sur un clivage de GRASP65 (et Golgine 160 (Mancini et al. 2000)) par une caspase (Lane et al. 2002). Une vue synthétique de la fonction des GRASPs reste à établir (l'existence d'éventuels variants d'épissage alternatif, suggérée par Northern blot, a été jusqu'ici ignorée (Barr et al. 1997 □ Shorter et al. 1999)), mais il semble dorénavant et déjà que GRASP65 (et peut-être en général la famille des GRASPs) constitue la clé de voûte de l'appareil de Golgi.

I.A.9.e. Une fonction de la matrice golgienne dans le transport golgien

Le rôle des protéines de la matrice golgienne dans l'établissement et le maintien de la structure de l'appareil de Golgi reste à démontrer. Des expériences de RNAi (*RNA interference*) ont montré que la déplétion de certaines d'entre elles induit une fragmentation de l'empilement golgien en structures dispersées dans le cytoplasme et affecte le transport

¹⁸ mis à part p115, dont l'homologue est Uso1p

¹⁹ Cette propriété d'accessibilité de GRASP65 au cytosol exclusivement en mitose est difficile à réconcilier avec son rôle en tant que récepteur de GM130 (protéine cytosolique qui détecte GRASP65 tout au long du cycle), et surtout la dynamique proposée d'échange continu entre membranes et cytosol en interphase.

golgien (Short et al. 2001 □ Diao et al. 2003). Une étude récente a été effectuée à l'aide d'une lignée de cellules CHO présentant un défaut thermo-sensible de structure golgienne accompagné d'un blocage de la sécrétion (Vasile et al. 2003). Ce phénotype thermo-sensible semble être dû à une perturbation de l'expression de GM130. En fait GM130 est indétectable dans ces cellules à toute température tandis que le défaut de structure et fonction de l'appareil de Golgi survient à 39,5°C et pas à 34°C. Le phénotype est réverté par expression de GM130 exogène, ce qui confirme son rôle dans la structure et la fonction de l'appareil de Golgi à 39,5°C bien qu'à 34°C ce rôle soit dispensable. Le phénotype est aussi réverté par surexpression de NSF (le niveau endogène de NSF est normal dans ces cellules). Cette interaction génétique de GM130 et de la machinerie NFS/SNAREs assurant la spécificité de fusion doit maintenant être comprise en termes d'interactions moléculaires, mais ce résultat rappelle les mécanismes moléculaires de réassemblage de l'appareil de Golgi en fin de mitose proposés par le groupe de G. Warren (voir I.B.2.e.). Mais ces effets de la déplétion de protéines de la matrice sur la morphologie de l'appareil de Golgi ne sont pas spécifiques à ces protéines, des phénotypes comparables sont observés lors de la déplétion de Rabs par exemple (comme Rab2, F. Barr, communication personnelle).

Le rôle de ces protéines dans le transport golgien, en particulier dans la voie RE-Golgi, a été mis en évidence par des inhibitions observées à des stades successifs du transport de VSV-G à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines de la matrice (p115, GM130, Giantine) et des peptides inhibant leurs interactions mutuelles, dans un système semi-in vitro et in vivo. Ces travaux suggèrent que ces trois protéines interviennent donc dans des étapes successives de ce transport (Alvarez et al. 1999 □ Seemann, Jokitalo et Warren 2000 □ Alvarez et al. 2001). Ces trois protéines interagissent au moins deux à deux (p115-GM130, p115-Giantine), et d'après G. Warren forment même ensemble un complexe de facteurs d'arrimage (Lesa et al. 2000). Comme nous le verrons, c'est en étudiant la modulation du trafic intervenant en mitose (et les phosphorylations mitotiques de ces protéines affectant leurs interactions) que leur rôle dans l'arrimage des membranes golgiennes (avant leur amarrage assuré par les SNAREs) a été démontré de la manière la plus convaincante (voir I.B.2.).

Un schéma général du mécanisme utilisé par les protéines de la matrice golgienne pour réguler le transport a été récemment proposé par F. Barr. Il était déjà connu que p115 interagit avec Rab1 dans son état lié au GTP, indiquant que p115 est un effecteur de la GTPase Rab1

²⁰ Le rôle de GRASP65 dans le réassemblage de l'appareil de Golgi vient en fait d'être

qui régule le transport entre les sites de sortie du RE et l'appareil de Golgi²¹ (Allan et al. 2000). Certaines golgines, de fonction dans le transport pour leur part inconnue, porteraient dans leur domaine assurant leur association aux membranes de l'appareil de Golgi une séquence consensus d'interaction avec Rab6 nommé GRIP (Barr 1999□Kjer-Nielsen et al. 1999; Munro et Nichols 1999□ Deux autres protéines de la matrice golgienne, telles GM130 et Golgine 45, sont cytosoliques et possèdent des récepteurs sur les membranes golgiennes, GRASP65 et GRASP55, deux protéines qui sont myristoylées afin d'interagir avec les membranes et qui sont aussi considérées comme faisant partie de la matrice golgienne. Les groupes de W. Balch et F. Barr ont montré que ces complexes golgine-GRASP se comportent aussi comme des effecteurs des GTPases régulatrices du transport Rab1 et Rab2²² (Moyer et al. 2001□ Short et al. 2001). Très récemment, la protéine Golgine 84, de structure très similaire à celle de la Giantine (court segment transmembranaire C-terminal et masse cytosolique essentiellement de type hélice enroulée), et tout comme elle redistribuée dans le RE par la BFA, a aussi été caractérisée en tant qu'effecteur de Rab1 (Diao et al. 2003□ Satoh et al. 2003). La connexion entre la matrice golgienne et la famille des Rabs confirment l'idée d'une fonction de ces protéines de matrice dans le transport, en tant que facteurs d'arrimage.

I.A.10. Différentes voies de transport entre le RE, l'appareil de Golgi, et la membrane plasmique

Comme je l'ai précisé au début de cette partie Introduction, l'appareil de Golgi est au carrefour de très nombreuses voies de transport intracellulaire. Je vais ici résumer les mécanismes moléculaires et la caractérisation de certaines de ces voies, qui ont comme point de départ ou d'arrivée l'appareil de Golgi, et que j'ai étudié au cours de ma thèse□ la voie de biosynthèse-sécrétion (RE-Golgi-membrane plasmique), dite antérograde, la voie rétrograde correspondante (membrane plasmique-Golgi-RE), ainsi que le recyclage endosomal qui semble connecté à la fonction du TGN.

démontré *in vivo* (Wang et al. 2003).

²¹ Si p115 contient réellement un motif d'interaction avec COPII (comme je le propose à la fin de la partie Résultats), alors cette protéine jouerait un rôle de pivot depuis la sortie du RE dépendante de COPII (Kondylis et Rabouille 2003) jusqu'à l'arrimage à l'appareil de Golgi (par interaction avec GM130) et la transition vers l'étape de fusion dépendante des SNAREs (Shorter et al. 2002).

²² Les GRASPs interagissent aussi avec des protéines de la famille p24, qui sont des récepteurs pour cargos cyclant entre l'appareil de Golgi et le RE (Barr et al. 2001).

I.A.10.a. biosynthèse-sécrétion □ première étape, export depuis le RE

L'événement initial en amont de la voie de biosynthèse-sécrétion est le passage de la petite GTPase Sar1 de son état lié au GDP à son état lié au GTP, catalysé par son facteur d'échange Sec12 (Weissman et al. 2001). Ce facteur d'échange est une protéine transmembranaire du RE, et provoque l'activation de Sar1 et son association aux

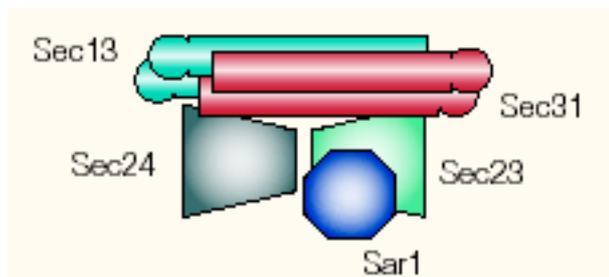


Figure 4. Manteau COPII. La GTPase Sar1 liée au GTP recrute le manteau COPII formé de deux hétérodimères, Sec13-31 et Sec23-24.

membranes du RE. Sar1 activé recrute ensuite un effecteur, le complexe qui constitue le manteau vésiculaire COPII. Ce complexe est composé de deux hétérodimères, Sec23/24 et Sec 13/31 qui interagissent et forment un complexe lors de la formation du manteau COPII²³ (Figure 4). Cette cascade d'interaction est à l'origine de la formation de sites spécialisés du RE, les sites de sortie (ou éléments de transition).

L'analyse par diffusion de lumière en temps réel de liposomes incubés avec des molécules purifiées (Sar1, Sec23/24, Sec 13/31, GDP, GTP ou analogues non-hydrolysables de ces nucléotides) a révélé l'aspect dynamique de ce processus (Antonny et al. 2001). Cette technique originale consiste à détecter à 90° la lumière diffusée par une suspension de liposomes, ce signal dépendant uniquement de la forme, la taille, et la masse de ces liposomes (plus exactement du facteur de structure, lui-même fonction de ces trois grandeurs). Une variation du signal de diffusion (mesuré en temps réel) a pu être spécifiquement attribuée à la fixation de Sar1 et des deux dimères Sec23/24 et Sec13/31 aux liposomes. Des observations par microscopie électronique de ces liposomes ont confirmé le recrutement du manteau COPII sur ceux-ci, et ont de plus apporté des informations précises sur la taille et la morphologie des liposomes et des vésicules qui en bourgeonnent. Le manteau COPII, contrairement au modèle longtemps en vigueur, ne polymérise pas lentement pour déformer la membrane du RE. Au contraire, COPII est très rapidement recruté (en 1 à 2 s, à la limite de résolution temporelle de l'appareil) puis agit en tant que GAP (protéine activatrice d'une GTPase catalysant son passage GTP->GDP) de Sar1, et donc le manteau COPII induit une boucle de rétroaction négative de sa propre association aux membranes du RE, qui ne dure par conséquent que 5 à

²³ Les composants du manteau COPII tirent leur nom du crible génétique chez *S. cerevisiae* qui a permis de les identifier.

10 secondes²⁴. Cette dynamique est complètement bloquée en présence de GMP-PMP, analogue non-hydrolysable du GTP, Sar1 est maintenu activé, des vésicules sphériques de petite taille (50-70 nm) sont formées et COPII reste figé sur ces vésicules²⁵.

Dans un système semi-in vitro à base de cellules NRK semi-perméabilisées, le rôle de Sar1 et COPII dans le tri des cargos (VSVG) et la biogenèse de ces sites de sorties du RE ont été mis en évidence (Aridor et al. 2001). Une kinésine serait de plus recrutée (détectée par l'anticorps H1) et pourrait être responsable des déformations des membranes du RE induisant la formation des sites de sortie. Sar1-COPII

Une polémique existe quant aux mécanismes de tri des cargos au niveau du RE (Warren et Mellman 1999). Les cargos sont-ils empaquetés par défaut au sein de la lumière du RE (hypothèse du *bulk flow*) et éventuellement transportés de manière rétrograde, par un mécanisme de contrôle en aval qui permet aux protéines résidentes du RE d'y être retenues? Ou bien au contraire existe-t-il un mécanisme de tri spécifique des cargos destinés à progresser le long de la voie de biosynthèse-sécrétion au niveau des sites de sortie du RE? Ces deux possibilités ne sont pas exclusives, et en fait il est probable que les deux mécanismes co-existent dans les cellules eucaryotes, même si leur poids relatif peut varier. Des preuves expérimentales des deux mécanismes ont été produites. Il existerait par exemple une séquence consensus (contenant une tyrosine puis un motif acide DXE, EXE ...) d'interaction des cargos comme la protéine G du VSV (virus de la stomatite vésiculaire) avec Sar1/COPII permettant à VSV-G d'être efficacement triée puis exportée du RE (Nishimura et Balch 1997; Nishimura et al. 1999). D'autres motifs de type FF ont été proposés comme responsables de l'interaction de certaines protéines de la famille p24 avec Sec23, et de l'export du RE de ces protéines (Dominguez et al. 1998). Ces interactions avec le manteau COPII devraient permettre à ces cargos de la voie de biosynthèse-sécrétion d'être accumulés

²⁴ Cette dynamique rappelle celle des microtubules, polymères d'une autre GTPase, la tubuline. Les microtubules présentent des phases successives de croissance et de décroissance liées à l'alternance entre les formes GDP et GTP de la tubuline. De façon très comparable, cette instabilité dynamique peut être reproduite in vitro à partir de quelques composants purifiés (Kinoshita et al. 2001).

²⁵ Même s'il ne s'agit que de la dynamique en présence de cinq protéines purifiées et que beaucoup d'autres composants interviennent en réalité au sein des cellules, ces observations sont à considérer dans l'analyse des résultats d'études utilisant des mutants de Sar1 constitutivement actifs ou inactifs pour bloquer la sortie du RE, ainsi que les tentatives de purification de compartiments COPII-positifs systématiquement effectuées en présence de GMP-PMP (autre analogue non-hydrolysable du GTP).

dans les sites de sortie du RE en vue de leur export²⁶. Mais le groupe de J. Klumperman a montré, par analyse quantitative d'expériences d'immunolocalisation par microscopie électronique, que plusieurs cargos ne sont pas concentrés dans les sites de sortie du RE par rapport au reste du RE, ils ne sont concentrés qu'une fois le compartiment en aval de la voie de sécrétion atteint (Martinez-Menarguez et al. 1999)²⁷. Il est probable que les protéines destinées à être sécrétées rapidement et efficacement contiennent de tels motifs d'interaction avec COPII qui leur permettent d'atteindre l'appareil de Golgi en aval en 10 minutes (par exemple VSV-G, voir I.A.4.). D'autres protéines progressent par défaut et atteignent l'appareil de Golgi en 30-60 minutes et les compartiments suivants ensuite, à moins qu'elles ne soient éventuellement transportées rapidement en retour au RE si elles possèdent un signal de rétention au RE (d'où une localisation à l'équilibre quasi-uniquement au RE)²⁸.

I.A.10.b. biosynthèse-sécrétion □ deuxième étape, le compartiment intermédiaire

I.A.10.b.i. Le manteau COPI

L'étape suivante de la voie de biosynthèse-sécrétion voit les structures bourgeonnées à partir des sites de sortie du RE perdre leur manteau COPII et de manière concomitante être recouvertes du manteau COPI, effecteur de la GTPase Arf1, elle-même recrutée sur les membranes et activée à cette étape (Figure 5). La coordination entre ces deux systèmes GTPase/COP est mal comprise. Seules certaines protéines de la famille des p24 semblent posséder la capacité de lier directement COPI et COPII (Dominguez et al. 1998). La GTPase Rab1 intervient elle aussi à cette étape, elle se lie aux membranes COPII-positives sous forme active avec ses protéines effectrices qui sont les facteurs d'arrimage p115 et GM130, et un complexe SNARE qui permettra la fusion de ces vésicules avec le cis-Golgi (Allan et al. 2000).

²⁶ Cette hypothèse n'est pas nécessaire en réalité, il est possible que les cargos interagissent avec COPII mais que cette interaction soit limitante □ si la formation des vésicules à partir des sites de sortie est trop rapide, par exemple dans une cellule qui sécrète intensément, la concentration des cargos dans ces sites de sortie n'est pas possible.

²⁷ Voir aussi une autre étude récente (Oprins et al. 2001).

²⁸ De plus, il a récemment été proposé que la séquence di-acide de VSV-G lui permet d'interagir avec l'adaptateur de manteau AP3 au niveau du TGN pour faciliter son transport vers la membrane plasmique (Nishimura et al. 2002).

Le fonctionnement du système Arf1/COPI est très débattu, les différentes techniques utilisées pour l'étudier fournissent des conclusions très différentes. Arf1/COPI a été impliqué dans le transport antérograde depuis les sites de sortie du RE à la face cis de l'appareil de Golgi, dans le transport rétrograde Golgi-RE, et dans le transport intra-Golgi, antérograde ou rétrograde selon les publications. Pour résumer, le manteau COPI a d'abord été identifié dans le système *in vitro* de transport intra-Golgi de l'équipe de J. Rothman²⁹ (Orci et al. 1986□ Malhotra et al. 1989). Des cribles biochimiques (*GST-pull down* de séquences consensus déterminant la rétention de protéines du RE (Cosson et Letourneur 1994)) et génétiques dans la levure *S. cerevisiae* (recherche de mutants de rétention, nommés RET, laissant échapper le récepteur du facteur □ de conjugaison étiqueté avec une séquence de rétention KKXX vers la membrane plasmique (Letourneur et al. 1994)) ont ensuite identifié COPI comme jouant un rôle essentiel dans le transport rétrograde³⁰. En particulier, le manteau COPI était alors pensé non seulement influencer sur la courbure des membranes et participer mécaniquement au bourgeonnement, mais aussi était impliqué directement dans une interaction avec le cargo (ceux portant une séquence KKXX), c'est-à-dire participer au tri. Cette double fonction correspondrait aux fonctions simples remplies par la clathrine (le manteau déformant les membranes) et ses adaptateurs (facteurs contribuant au tri des cargos). Effecteur de la GTPase Arf1, COPI serait donc recruté aux membranes sur lesquelles Arf1 serait préalablement associé et activé par son facteur d'échange. Ensuite COPI participe aux événements de tri et de bourgeonnement (le recrutement de COPI précède son association aux signaux KKXX (Gomez et al. 2000)), Arf1 hydrolyse son GTP, puis est dissocié des membranes ce qui provoque le re-largage simultané de COPI.

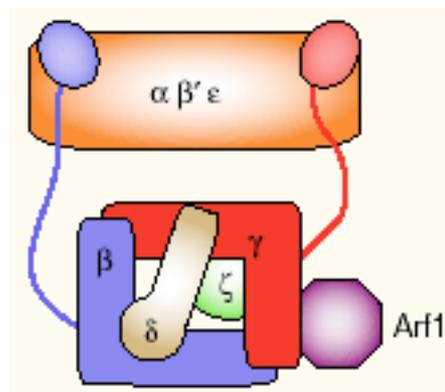


Figure 5. Manteau COPI. La GTPase Arf1 liée au GTP recrute le manteau COPI formé de sept sous-unités.

Ces événements dépendants de COPI seraient responsables de la formation de vésicules à partir des citernes golgiennes contenant un cargo destiné à être transporté vers une autre citerne, mais la direction pose alors problème. En fait la notion-même de vésicule COPI pose

²⁹ En fait un des composants de COPI, □COP, avait été isolé auparavant en tant que protéine liant les microtubules (de façon artefactuelle) (Allan et Kreis 1986).

³⁰ Cette hypothèse est aussi soutenue par l'inhibition de transport rétrograde induit par la BFA après la micro-injection d'anticorps bloquants EAGE anti-□COP, composant de COPI (Scheel et al. 1997).

problème, car comme dans le cas de Sar1/COPII, elles ne sont observées que par fractionnement biochimique de systèmes contenant des analogues non-hydrolysables du GTP, ou bien au voisinage des citernes golgiennes par microscopie électronique de cellules fixées. L'hypothèse de l'existence de vésicules repose essentiellement sur ces observations directes par microscopie électronique, qui montrent que les citernes golgiennes aplaties sont fenêtrées à leurs bords, avec une densité en trous croissant avec la proximité de leur contour, et que les vésicules se trouveraient près de ces régions propices à une fragmentation et au bourgeonnement plus ou moins spontanés, et semble-t-il exagérés quand l'hydrolyse du GTP est inhibée (Weidman et al. 1993). De plus, seules de récentes techniques de tomographie permettent d'obtenir une vue tridimensionnelle des structures, et ces méthodes ne semblent pas confirmer l'existence des vésicules au voisinage des citernes, mais plutôt de tubules reliant les citernes et dont la section sur une coupe ultra-fine ressemblerait à un profil vésiculaire sphérique. Le manteau COPI, ainsi que les protéines comme la Giantine qui sont présentes sur des vésicules COPI bloquées au GTP ou accumulées en présence d'un mutant bloqué sous forme GTP de Arf1, sont en fait immunolocalisés dans les cellules observées par microscopie électronique sur ces vésicules bordant les citernes mais aussi sur les extrémités fenêtrées des citernes et le long des citernes (Sonnichsen et al. 1998; Martinez-Menarguez et al. 2001). Nous verrons à la fin de ce paragraphe que le rôle de l'activité GTPasique de Arf1 est central, et donc que les vésicules isolées dans les études de biochimie en bloquant le cycle GDP-GTP de Arf1 ne représentent probablement pas des intermédiaires de transport existant au sein des cellules.

Une autre structure est positive pour COPI, celle qui vient de re-larguer son manteau COPII au voisinage des sites de sortie du RE. Cette fois-ci, par microscopie électronique, on distingue des structures de géométrie globulaire et tubulo-vésiculaire et de grande taille qui se déplacent le long des microtubules vers l'appareil de Golgi (Presley et al. 1997; Polishchuk et al. 2000), et sur lesquelles COPI serait en fait enrichi au niveau des zones de courbure maximale. Cette distribution permettrait de ségréger les protéines résidentes, interagissant avec COPI par leur séquence de rétention, des cargos antérogrades qui seront acheminés dans ces structures tandis que des vésicules COPI seront produites et transportées dans le sens rétrograde pour récupérer les protéines résidentes (Martinez-Menarguez et al. 1999; Shima et al. 1999).

I.A.10.b.ii. Dynamique de Arf1/COPI observées par microscopie de fluorescence *in vivo*

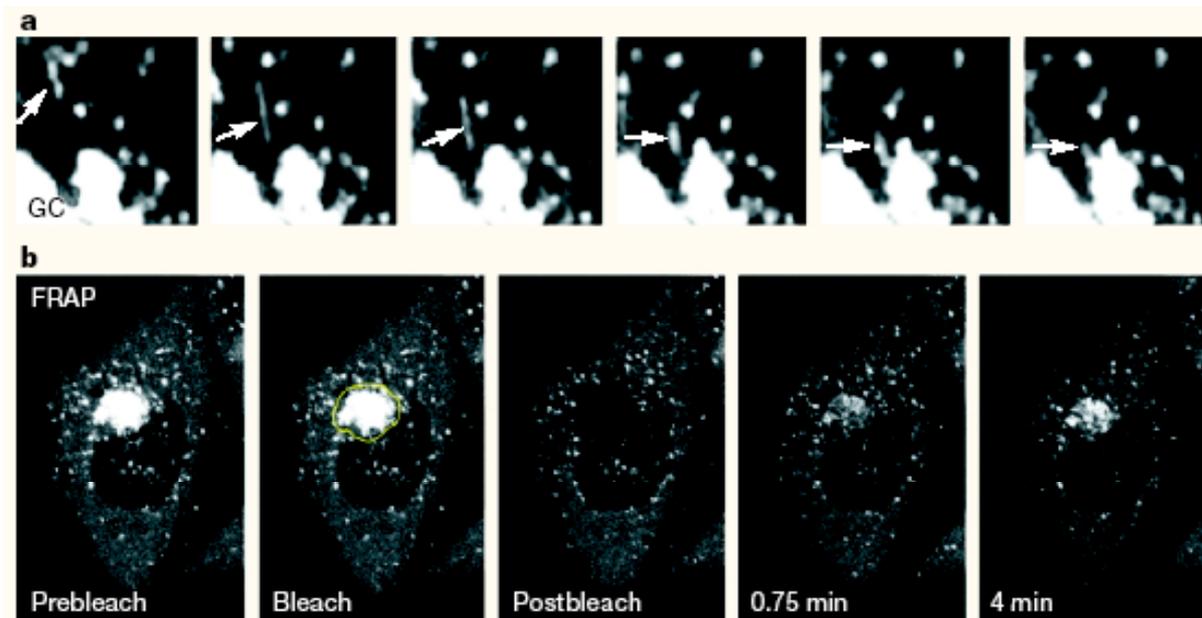


Figure 6. Dynamique du manteau COPI *in vivo*, visualisée par microscopie de fluorescence de cellules exprimant \square COP-GFP (Presley et al. 2002).

- a. Un tube positif pour COPI se déplace depuis la périphérie de la cellule, en sortie du RE, vers l'appareil de Golgi, puis fusionne avec l'appareil de Golgi.
- b. Lorsque le signal fluorescent de \square COP-GFP est éteint par photoblanchiment sur l'appareil de Golgi, la relaxation vers l'équilibre du signal entre membranes périphériques, appareil de Golgi et cytosol s'effectue en quelques minutes. Cette relaxation est due à un échange entre les fractions associées aux membranes et cytosolique, puisque cette même relaxation a lieu en l'absence de trafic membranaire (basse température).

Comme pour la diffusion de lumière dans le cas de Sar1/COPII, une technique bouscule ces modèles. Des fusions des protéines du manteau COPI avec la GFP (*Green Fluorescent Protein*) ont été construites³¹, et qui au bout de quelques heures sont incorporées dans le manteau COPI heptamérique avec les six autres composants endogènes (ce processus d'incorporation est lent car COPI est un complexe très stable) après expression dans des cellules animales (Figure 6). Cette fois-ci, l'image obtenue par microscopie de fluorescence sur cellules animales vivantes, très reproductiblement par différents groupes, est la suivante (Scales et al. 1997 \square Shima et al. 1999 \square Presley et al. 2002) \square les structures chargées de cargo

³¹ suffisamment fonctionnelles pour compléter un phénotype nul de leur homologue dans la levure *S. cerevisiae*, un critère nécessaire (mais pas suffisant) souvent utilisé pour tester la fonctionnalité des chimères fluorescentes recombinantes.

antérograde (VSV-G) perdent leur manteau COPII au voisinage des sites de sortie du RE, deviennent COPI-positives, sont de géométrie globulaire et tubulo-vésiculaire, et sont déplacées le long des microtubules vers l'appareil de Golgi (situé au voisinage du centrosome), lui-même COPI-positif. Pas de vésicule visible, ce qui signifie que même si des vésicules existent elles ne portent pas COPI à une concentration qui approche celle de l'appareil de Golgi ou des ces «compartiments intermédiaires»³². A moins que l'appareil de Golgi soit en fait uniformément recouvert de vésicules COPI-positives que la résolution du microscope ne nous permettent pas de les distinguer et donne une apparence continue. Des expériences de photoblanchiment de fluorescence (FRAP et FLIP) désormais classiques ont permis de quantifier les cinétiques d'association/dissociation de Arf1 et COPI aux membranes de l'appareil de Golgi et des compartiments intermédiaires (Presley et al. 2002). Comme dans l'expérience de diffusion de lumière sur les liposomes Sar1/COPII, les auteurs ont trouvé que Arf1 et COPI s'associent aux membranes (en quelques dizaines de s cette fois) et sont relargués avec une cinétique similaire, en permanence, que le transport membranaire ait lieu ou pas (ces cinétiques d'association/dissociation ne sont pas sensibles à une baisse de température, tandis que le transport est ralenti à 15°C et bloqué à 4°C). De plus, Arf1 est dissocié des membranes deux fois plus vite que COPI, et donc contrairement à l'idée jusqu'ici admise COPI persiste associé aux membranes en l'absence de Arf1, pendant la moitié de son temps d'association aux membranes.

Le cycle «rapide» de Arf1, rappelant celui de Sar1 *in vitro*, est peut-être la conséquence de l'association de ArfGAP1 avec le manteau COPI (elle aussi réminiscente de la présence de Sec23/24, GAP de Sar1, dans le manteau COPII). Des modèles ont été récemment proposés qui lient cette association précoce de ArfGAP1 à une fonction de tri (Figure 7) (Pepperkok et al. 2000; Lanoix et al. 2001; Yang et al. 2002; Weiss et Nilsson 2003). Notons que ces modèles sont en accord avec le mode de fonctionnement proposé par J. Goldberg suite à une étude structurale (Goldberg 1999), qui suggérait elle aussi que Arf1 est capable de lier simultanément le manteau heptamérique COPI et ArfGAP1.

³² Voir l'annexe technique dans la partie Résultats un objet de taille (même 1000 fois) plus petite que la taille minimale résolue par un microscope est détectable s'il concentre suffisamment de fluorescence. Ainsi, si on ne détecte pas de vésicule COPI, on détecte en revanche facilement les vésicules d'endocytose recouvertes de clathrine dans des cellules vivantes (Gaidarov et al. 1999).

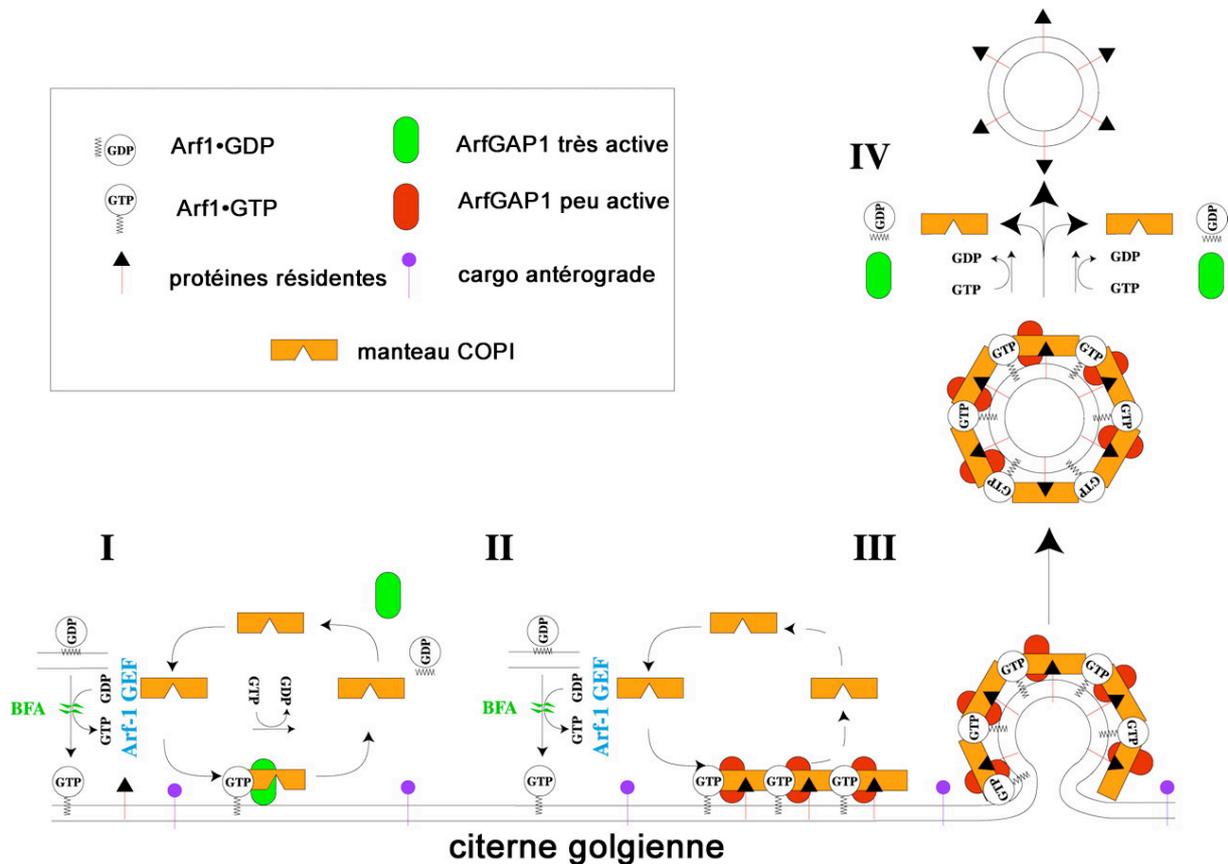


Figure 7. Modèle de tri effectué par le système Arf1/COPI (Lanoix et al. 2001). I. La GTPase Arf1 cycle entre les états GDP et GTP très rapidement pendant la formation d'une vésicule, à cause de l'activité de ses protéines régulatrices Arf1-GEF et ArfGAP1. Au cours de ce cycle rapide, la concentration locale de cargos qui interagissent avec COPI augmente progressivement au niveau de certains domaines. II. Le cycle GDP-GTP de Arf1 est ralenti sur ces domaines, car les cargos inhibent l'activité GAP de ArfGAP1. III. Le manteau COPI est alors progressivement assemblé et une vésicule contenant les cargos est formée. IV. Le manteau COPI est relargué lorsque l'activité résiduelle de ArfGAP1 permet l'hydrolyse du GTP. Ce rôle de la modulation de la fréquence du cycle GDP-GTP d'une GTPase pourrait être plus général (voir partie Discussion).

I.A.10.b.iii. Brefeldine A

La Brefeldine A (BFA) est un métabolite de champignon auquel les membranes cellulaires sont perméables et qui induit d'une part la redistribution des composants golgiens au RE (Sciaky et al. 1997) et la fusion du TGN avec les endosomes de recyclage (qui sont eux-même tubularisés). La BFA constitue un inhibiteur non-compétitif de l'activation de Arf1 (Chardin et McCormick 1999) cette molécule s'associe au complexe Arf1•GDP/facteur d'échange et le neutralise, c'est-à-dire que Arf1 et son facteur d'échange restent en interaction sans que la

réaction d'échange puisse avoir lieu (Peyroche et al. 1999)³³. L'incubation de cellules avec cette drogue permet donc d'obtenir pratiquement instantanément une inactivation totale de Arf1 et son re-largage des membranes (compte tenu de sa dynamique d'association/dissociation). La BFA a aussi d'autres cibles cellulaires qui jouent un rôle important dans le trafic golgien. Elle catalyse l'ADP-ribosylation de GAPDH et BARS50 (Di Girolamo et al. 1995), et semble capable de lier *in vitro* de nombreuses autres protéines (sur une colonne de BFA immobilisée, T. Kapoor et T. Mitchison, communication personnelle). L'enzyme GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), hormis sa fonction enzymatique, est associée aux compartiments intermédiaires, et régule en conjonction avec la GTPase Rab2 le trafic membranaire de ces structures vers l'appareil de Golgi et/ou le RE, ainsi que la dynamique des microtubules dans ce processus (Tisdale 2000; Tisdale 2001; Glaser et al. 2002; Tisdale 2002). BARS50 (*BFA ADP-ribosylated substrate of 50 kDa*) est une protéine associée à l'appareil de Golgi qui régule, dans un système *in vitro*, la fission de tubules formés à partir de Golgi purifié ou de liposomes artificiels de composition lipidique golgienne (Weigert et al. 1999). La ribosylation de ces deux protéines participe à « l'effet BFA » en plus de l'inactivation de Arf1 (Mironov et al. 1997; Spano et al. 1999).

Dans les cellules animales, l'incubation avec la BFA entraîne donc le re-largage très rapide de Arf1 puis de COPI (et d'autres effecteurs de Arf1), la ribosylation de GAPDH et BARS50, la formation de longs tubules à partir de l'appareil de Golgi (observés par microscopie de fluorescence *in vivo* avec des enzymes golgiennes fusionnées avec la GFP) qui se déplacent le long des microtubules pour fusionner en périphérie avec le RE (Sciaky et al. 1997). Ensuite, entre 5 minutes et 30 minutes après le début du traitement, l'appareil de Golgi disparaît brutalement³⁴, et les enzymes golgiennes sont entièrement redistribuées dans le RE, la sécrétion étant alors complètement bloquée. En l'absence de microtubules, aucun tubule n'est

³³ Il existe en réalité plusieurs facteurs d'échange de Arf1, sensibles à la BFA ou pas selon qu'ils contiennent ou pas un domaine de type Sec7, de localisations diverses et qui activent Arf1 pour des fonctions bien distinctes. Par exemple les fusions Golgi-RE et TGN-endosomes peuvent être découplées (Shinotsuka et al. 2002), ces deux processus pourraient être liés à des facteurs d'échange de Arf1 distincts. De même, le composé Exo1, récemment décrit (Feng et al. 2003), entraîne apparemment le même processus de fusion Golgi-RE que la BFA sans pour autant affecter les endosomes et le TGN (et n'entraîne pas la ribosylation de BARS50).

³⁴ Cet « effet buvard » a conduit J. Lippincott-Schwarz, en collaboration avec le physicien E. Siggia, à conclure que l'appareil de Golgi se trouve dans un état d'énergie libre supérieur à celui du RE, et que lorsque les mécanismes permettant de maintenir l'appareil de Golgi isolé du RE sont rompus par la drogue BFA, le système RE-Golgi abaisse rapidement son énergie en induisant brutalement une fusion entre les membranes des deux organites (Sciaky et al. 1997).

formé, mais l'appareil de Golgi disparaît de la même manière (après un temps légèrement plus long). Chez *S. cerevisiae*, l'effet de la BFA, observé par microscopie électronique, semble être de bloquer la formation de l'appareil de Golgi à partir des sites de sortie du RE (Deitz et al. 2000). Ainsi la BFA met en lumière l'existence d'un transport rétrograde constitutif au sein des cellules de l'appareil de Golgi vers le RE, soit suractivé par cette drogue (formation exagérée de tubules très longs alors qu'ils sont assez rares dans les cellules non-traités), soit simplement parce que cette drogue bloque le transport antérograde (maturation des compartiments intermédiaires impossible). Les deux possibilités ne sont pas mutuellement exclusives, et la rapidité d'action de la drogue ainsi que la multiplicité de ses cibles suggèrent que les deux mécanismes sont utilisés.

Enfin, Arf1 possède un grand nombre d'effecteurs, dont la machinerie d'ancrage du moteur dynéine aux membranes golgiennes (un réseau de type spectrine/ankyrine) (Godi et al. 1998 [De Matteis et Morrow 2000; Holleran et al. 2001 [Muresan et al. 2001] et des enzymes de modification des lipides (qui contribuent probablement au bourgeonnement en modifiant les propriétés de courbure des membranes) (Godi et al. 1999).

I.A.10.c. Transport rétrograde Golgi-RE

Des signaux de rétention des protéines au RE ont été identifiés par analyse de séquence de protéines résidentes du RE, comme le signal C-terminal dylisine KKXX (Jackson et al. 1990 [Jackson et al. 1993) ou la séquence KDEL (Munro et Pelham 1987). Nous avons vu que ce signal KKXX interagit avec COPI, or la localisation de COPI est en aval du RE le long de la voie de biosynthèse-sécrétion. Par conséquent, ces cargos maintenus dans le RE doivent au moins par accident échapper au RE et y être efficacement transportés en retour. En plus de l'effet de la drogue BFA, d'autres données en faveur de l'existence d'un tel transport rétrograde Golgi-RE constitutif. Elles sont issues d'études du trafic RE-Golgi lors de la dépolymérisation des microtubules et l'effet de mutants dominants négatifs de Sar1.

Lorsqu'on dépolymérise les microtubules de cellules animales, les enzymes de l'appareil de Golgi sont relocalisées au voisinage des sites de sortie du RE sur des mini-empilements golgiens fonctionnels pour le transport, même en l'absence de néo-synthèse protéique (bloquée par la cycloheximide). Ceci suggère que ces membranes golgiennes (les enzymes sont transmembranaires) ont été transportées de façon rétrograde et indépendante des microtubules vers le RE, ont ré-émergé aux sites de sortie du RE, se sont arrangées en empilements localement mais n'ont pas pu migrer vers le centrosome en l'absence de

microtubules (ce phénomène a été observé par microscopie de fluorescence *in vivo*) (Cole et al. 1996 □ Storrie et al. 1998).

De même, le blocage de la sortie du RE par un mutant dominant négatif de Sar1 bloqué sous sa forme GDP entraîne la redistribution complète des composants golgiens dans le RE (cette fois-ci même l'accumulation aux sites de sortie du RE est bloquée) (Miles et al. 2001 □ Ward et al. 2001).

En plus de Arf1, une autre GTPase a été proposée en tant que régulateur de ce transport rétrograde. La GTPase Rab6 est présente sur l'appareil de Golgi, plutôt sur sa face trans (Martinez et al. 1994). Elle régule le transport golgien, la surexpression de Rab6 bloqué sous sa conformation GTP entraîne la relocalisation des enzymes résidentes golgiennes dans le RE (Martinez et al. 1997). Cette GTPase régule donc le transport dit rétrograde, de l'appareil de Golgi vers le RE, comme celui illustré par la BFA (sans pour autant qu'un rôle de Rab6 dans l'effet BFA ait été démontré).

L'observation de Rab6 couplé à la GFP dans des cellules animales par microscopie de fluorescence *in vivo* révèle d'ailleurs que GFP-Rab6 est non seulement localisée à l'appareil de Golgi mais aussi présente sur des tubes parfois très longs qui émanent de l'appareil de Golgi, se déplacent le long des microtubules et semblent fusionner avec le RE en périphérie (White et al. 1999). La protéine Rabkinésine6 (Echard et al. 1998), apparentée à la super-famille des kinésines, moteurs se déplaçant sur les microtubules vers leur extrémité «*plus*» et donc vers la périphérie, est localisée à l'appareil de Golgi (quoique cette localisation soit désormais débattue (Hill et al. 2000)) et interagit avec Rab6 (par double-hybride), ce qui renforce cette hypothèse. En fait, Rab6 existe sous deux isoformes ubiquitaires A et A³⁵, issues de l'épissage alternatif d'un même gène et qui ne diffère que par trois acides aminés et donc partagent l'essentiel de leurs partenaires, mais seulement Rab6A interagit avec Rabkinésine6 (Echard et al. 2000). Un argument supplémentaire pour soutenir le modèle ci-dessus est que Rab6A est plus efficace que Rab6A' pour induire la relocalisation des enzymes résidentes de l'appareil de Golgi dans le RE (voir aussi la partie Résultats), ce qui s'expliquerait par l'interaction différentielle de la kinésine avec les deux isoformes. La micro-injection de l'anticorps EAGE dirigé contre □COP (protéine du manteau COPI), ou la surexpression d'un mutant de Arf1 bloqué dans sa conformation GTP, figent le manteau COPI sur les membranes et bloquent le transport dépendant de COPI Golgi-RE de la lectine du compartiment intermédiaire ERGIC53 (qui contient un signal KKXX) et du récepteur du

³⁵ et une troisième spécifique des neurones Rab6B

signal KDEL (KDELr) (Girod et al. 1999). Cette expérience de micro-injection n'inhibe pourtant pas le transport rétrograde constitutif des enzymes golgiennes vers le RE³⁶. En revanche le transport des enzymes est bloqué par la surexpression d'un mutant dominant négatif de Rab6 (bloqué sous sa forme GDP), celles-ci sont séquestrées dans l'appareil de Golgi tandis que ERGIC53 et KDELr sont transportés normalement de l'appareil de Golgi au RE.

Il existerait donc deux voies rétrogrades Golgi-RE, une contrôlée par Arf1/COPI qui transporte certains cargos comme ERGIC53 et KDELr (et qui serait inhibée par l'association irréversible de Arf1/COPI aux membranes), une seconde contrôlée par Rab6 qui transporte les enzymes golgiennes, ainsi que la sous-unité B de la toxine de Shiga dans les cellules HeLa (qui serait inhibée cette fois par le déplacement de Rab6 des membranes)³⁷ (Storrie et al. 2000). La différence entre les mécanismes d'inhibition des voies Arf1 et Rab6 provient peut-être d'une différence fondamentale du mode de fonctionnement de ces deux types de GTPases, à moins que la directionnalité de ces deux voies soit encore mal comprise. Notons aussi que dans le système de transport *in vitro* (Happe et Weidman 1998), la déplétion de Arf1/COPI n'inhibe pas le transport intra-Golgi. De plus, des allèles thermo-sensibles de COPI n'inhibent pas le transport de certains cargos chez *S. cerevisiae* depuis le RE vers des compartiments post-golgiens (le milieu extracellulaire, la vacuole) (Gaynor et Emr 1997). Ceci signifie qu'il existe une voie de transport COPI-indépendante, ou bien que le système est capable de se ré-adapter au moins en partie en réponse au blocage par déplétion (*in vitro*) ou l'association irréversible aux membranes (*in vivo*) de COPI.

I.A.10.d. Transport rétrograde endosomes précoces-TGN

Comme nous l'avons vu en introduction, certaines protéines progressent selon une voie de transport rétrograde le long de la voie de biosynthèse-sécrétion. Cette voie permet par exemple à TGN38 et certaines toxines de progresser entre la membrane plasmique et le TGN sans passer par les endosomes tardifs (Mallard et al. 1998 □ Nichols et al. 2001). En réalité, Rab6 semble contrôler le transport rétrograde de cargos comme la sous-unité B toxine de

³⁶ révélé par l'expression d'un dominant négatif de Sar1 qui bloque la sortie du RE (la micro-injection de l'anticorps EAGE inhibe pourtant l'effet BFA (Scheel et al. 1997))

³⁷ Cette voie dépendante de Rab6 pourrait être une voie rétrograde reliant directement le TGN au RE (voir I.A.4.). Quand la sous-unité B de la toxine de Shiga parvient au TGN, puis remplit les citernes de l'appareil de Golgi et atteint le RE, rien ne prouve que sa progression au sein des citernes est nécessaire pour son transport vers le RE.

Shiga depuis les endosomes précoces jusqu'à l'appareil de Golgi puis au RE (Mallard et al. 2002). En effet, des anticorps anti-Rab6 ou le mutant de Rab6A' bloqué dans l'état GDP inhibent le transport de ce cargo dans des cellules pré-perméabilisées depuis les endosomes précoces (définis ici par un bloc à 19,5°C) jusqu'au TGN (défini par la présence de sulfotransférase). L'expression d'un mutant de Rab6A' bloqué sous sa forme GDP a un effet similaire cette fois dans des cellules intactes. Nous verrons dans la partie Résultats que ce mutant de Rab6A' déplace très efficacement les deux isoformes de Rab6 des membranes (Nizak et al. 2003).

Les isoformes de Rab6 A et A' sont localisés par immunofluorescence uniquement sur l'appareil de Golgi et de petites structures (1-2 μm) dispersées dans le cytoplasme (les anticorps anti-Rab6 connus ne distinguent pas les deux isoformes). GFP-Rab6 (A ou A') surexprimé est détecté sur l'appareil de Golgi, des tubules membranaires émanant de l'appareil de Golgi qui se déplacent le long des microtubules vers la périphérie et parfois vers l'appareil de Golgi, et si la surexpression est assez forte GFP-Rab6 est localisé au RE (White et al. 1999). Rab6A et A' surexprimés simultanément (en fusion avec des protéines fluorescentes différentes) colocalisent parfaitement sur l'appareil de Golgi et ces tubules³⁸. Donc Rab6 serait présent sur le compartiment accepteur de l'étape endosomes-Golgi et le compartiment donneur de l'étape Golgi-RE, éventuellement sur les intermédiaires de transport et le compartiment accepteur de cette voie Golgi-RE quand il est surexprimé, mais jamais sur les endosomes.

Les effecteurs connus de Rab6 sont soit des moteurs/protéines associées aux moteurs se déplaçant sur les microtubules, soit des facteurs d'arrimage. Parmi les protéines impliquées dans un mouvement basé sur les microtubules, Rabkinésine6 interagit avec Rab6A uniquement (Echard et al. 1998□ Echard et al. 2000), et a une fonction probablement essentiellement mitotique (Hill et al. 2000; Fontijn et al. 2001□ BicaudalD1 et 2 et p150^{glued} régulent la fonction de moteurs dynéine et kinésine dans le mouvement des membranes golgiennes en interphase (Matanis et al. 2002; Short et al. 2002□ Les rôles de Bicaudal (Hoogenraad et al. 2001) et surtout du complexe dynactine (King et Schroer 2000) contenant p150^{glued} dans la processivité du moteur de bout moins de type dynéine sont bien connus. Des données récentes suggèrent que p150^{glued} est capable de lier non-simultanément une dynéine et une kinésine présentes sur la même membrane et ainsi réguler le mouvement des membranes aussi bien vers le bout plus que vers le bout moins des microtubules (Roghi et Allan 1999□

³⁸ Observations en partie non-publiées réalisées au laboratoire.

Deacon et al. 2003). Ceci pourrait expliquer les mouvements bidirectionnels des tubes GFP-Rab6-positifs³⁹ (White et al. 1999; Matanis et al. 2002).

Des études effectuées chez *S. cerevisiae* ont montré que des facteurs d'arrimage effecteurs de l'homologue de Rab6, YPT6, forment le complexe GARP/VFT (VPS51/52/53/54). Ce complexe interagit avec la SNARE du TGN Tlg1p (par l'intermédiaire de VPS51) et YPT6 contrôle ainsi le transport endosomes-TGN⁴⁰ (Siniosoglou et Pelham 2001; Siniosoglou et Pelham 2002). Il est possible que YPT6 régule le transport rétrograde Golgi-RE, et que les fonctions de YPT6 et Rab6 dans le transport intracellulaire soient très similaires (Luo et Gallwitz 2003). Il existe des homologues des composants du complexe VFT et de la SNARE Tlg1p chez les mammifères, et des données préliminaires indiquent que l'interaction entre ce complexe et Rab6 sont bel et bien conservée (Données non-publiées obtenues au laboratoire).

Les rôles des deux isoformes de Rab6 dans les cellules de mammifères est difficile à comprendre. La quasi-identité des séquences protéiques de Rab6A et B implique qu'ils partagent pratiquement tous leurs partenaires, et possèdent en partie des fonctions similaires. Il existe cependant des partenaires spécifiques de chacune de ces deux isoformes (Rabkinésine6 qui n'interagit qu'avec Rab6A, et probablement d'autres; voir la partie Résultats), et ceci suffirait à leur conférer deux fonctions bien distinctes. Rab6A serait par exemple spécifiquement impliqué dans le contrôle mitotique. La description récente des effets de mutants de l'homologue de Rab6 chez le parasite *T. gondii* suggère la conservation de la fonction de transport rétrograde vers le trans-Golgi, et aussi une fonction dans l'accomplissement de la mitose et la cytokinèse (Stedman et al. 2003).

La sous-unité B de la toxine de Shiga suit donc depuis la surface des cellules une voie de transport rétrograde contrôlée par Rab6 qui lui permet d'atteindre l'appareil de Golgi puis le RE. Sa localisation dans des domaines lipidiques particuliers (insolubles dans certains détergents non-ioniques comme le Triton X100) lui permettrait d'échapper à la voie de dégradation classique et de parvenir à l'appareil de Golgi depuis les endosomes précoces, même si le lien entre l'association de son récepteur Gb3 aux domaines lipidiques «micro-domaines lipidiques» et le rôle de Rab6 n'a pas été élucidé (Falguieres et al. 2001).

³⁹ Des microtubules à polarité inversée, nombreux dans les cellules HeLa, pourraient aussi expliquer ce phénomène. Les cellules Vero semblent être davantage «polarisées» et l'observation de la dynamique de Rab6 dans ces cellules pourrait permettre de trancher cette question.

⁴⁰ Le complexe Ric1p/Rgp1p serait un facteur d'échange de Ypt6p sur le trans-Golgi-TGN, lui aussi impliqué dans cette voie (Siniosoglou et al. 2000).

La sous-unité B de la toxine de Shiga endocytée dans les cellules HeLa emprunte aussi la voie de recyclage, définie par la transferrine et son récepteur (Mallard et al. 1998□Nichols et al. 2001). La transferrine est internalisée par un mécanisme «classique» dépendant de la clathrine dans les endosomes précoces Rab5-positifs (et n'est pas présente dans les *rafts*) (Subtil et al. 1994), puis progresse dans des endosomes de tri Rab4-positifs et finalement dans des endosomes de recyclage Rab11-positifs (péricentriolaires) (Sonnichsen et al. 2000). Son retour à la surface peut s'effectuer par un recyclage rapide depuis les endosomes rab4-positifs ou bien par un recyclage lent depuis les endosomes Rab11-positifs (Sheff et al. 1999). Cette cascade de Rabs le long de la voie de recyclage pourrait être coordonnée par des effecteurs communs entre Rab5 et Rab4 d'une part et Rab4 et Rab11 d'autre part (de Renzis et al. 2002). L'idée élégante de coordination entre voies successives par l'intermédiaire des Rabs, partageant un effecteur, ou bien dont un effecteur de la première est un facteur d'échange de la suivante, a été récemment proposée par le groupe de P. Novick (Ortiz et al. 2002□Wang et Ferro-Novick 2002). L'existence d'effecteurs communs entre Rab6 et Rab11 pourrait aussi expliquer pourquoi la sous-unité B de la toxine de Shiga emprunte la voie de recyclage et la voie de transport rétrograde⁴¹, il est possible que ces deux voies «communiquent» par l'intermédiaire des Rabs qui les contrôlent (des anticorps anti-Rab11 ou un mutant dominant négatif de Rab11 inhibent aussi le transport endosomes-TGN de la sous-unité B de la toxine de Shiga (Mallard et al. 2002)).

Enfin, mentionnons le rôle d'une protéine de la famille des CLIPs, CLIPR59, qui se lie aux membranes du TGN (Perez et al. 2002). Les CLIPs définissent une famille de protéines liant les microtubules, sans pour autant être des moteurs, et dont la fonction serait d'interagir aussi avec d'autres structures qu'elles ancrent au cytosquelette. La surexpression massive de CLIPR59 entraîne une agrégation des endosomes précoces à proximité du TGN, bloque le transport de la sous-unité B de la toxine de Shiga des endosomes à l'appareil de Golgi mais n'affecte pas considérablement le recyclage de la transferrine. Par ailleurs par microscopie de fluorescence *in vivo*, les endosomes marqués par GFP-CLIPR59 (légèrement surexprimé) et ceux contenant la sous-unité B de la toxine de Shiga pendant son transport vers l'appareil de Golgi sont «dynamiquement juxtaposés», c'est-à-dire qu'ils sont très proches et entrent souvent en contact, et que leurs mouvements sont corrélés.

⁴¹ Un effecteur commun à Rab6 et Rab11 a été identifié au laboratoire, ce résultat n'est pas publié.

I.B. Mitose et appareil de Golgi

Cette partie est consacrée à un aspect très particulier du transport membranaire que j'ai étudié au cours de ma thèse. Il s'agit de l'étude du devenir des membranes intracellulaires, en particulier celles de l'appareil de Golgi, au cours de la mitose. Cette étude s'inscrit dans le cadre de problématiques comme l'héritage des organites et leur biogénèse, et a pour but de rendre compte du rôle de la fine régulation du trafic membranaire lors de ces processus. Je vais donc présenter les différents modèles et résultats concernant le devenir des membranes golgiennes au cours de la mitose, puis détailler les mécanismes moléculaires proposés. Je finirai cette partie en présentant deux sujets d'étude liés à cette problématique d'héritage de l'appareil de Golgi en mitose □ l'existence possible de mécanismes de contrôle du déroulement de la mitose (et en général du cycle cellulaire) par des composants de l'appareil de Golgi, et le rôle du transport golgien dans la phase terminale de la mitose, la cytokinèse.

I.B.1. Héritage des organites

Lors de la mitose, les organites sont en général équitablement hérités par les cellules-filles (Warren et Wickner 1996). Cette équipartition des organites permet aux cellules-filles de disposer de tous les organites sans avoir à les synthétiser de novo. En effet, la synthèse de novo des organites cellulaires est à la fois très rarement observée et parfois même supposée impossible, en particulier dans le cas des mitochondries et des chloroplastes (qui contiennent de l'ADN codant pour certaines de leurs protéines constitutives). De même, le mode d'héritage du centrosome par duplication des centrioles exclut en général la possibilité d'une synthèse de novo, et dans le cas du RE les membranes et les ribosomes associés semblent difficilement pouvoir être synthétisés de novo. Cependant, d'autres compartiments membranaires comme l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes pourraient a priori être néo-synthétisés (le système endomembranaire est entièrement dérivé du RE). Dans le cas de l'endosome de recyclage péricentriolaire, des expériences de microchirurgie ont montré qu'un cytoplaste dépourvu de ce compartiment Rab11-positif est capable d'une part de continuer à recycler la transferrine (rapidement depuis les endosomes proches de la membrane plasmique directement), mais aussi de reformer un compartiment Rab11-positif par lequel la transferrine recycle plus lentement (Sheff et al. 2002). La même expérience de microchirurgie a montré en revanche qu'un cytoplaste dépourvu d'appareil de Golgi est incapable de sécréter, le marqueur sécrété restant accumulé aux sites de sortie du RE (Pelletier et al. 2000).

Probablement au bout d'un temps beaucoup plus long, la néo-synthèse de certaines protéines golgiennes essentielles permettrait de reformer l'appareil de Golgi et de reprendre la sécrétion. Mais il est clair que si une cellule-fille était largement dépourvue d'appareil de Golgi en sortie de mitose, elle serait pénalisée fortement par son incapacité à sécréter immédiatement et procéder à de nombreuses modifications post-traductionnelles, et au final l'équipartition de l'appareil de Golgi constitue un avantage évolutif bien conservé. D'une manière générale, même dans les cas où la biogenèse de novo des organites est possible, leur héritage peut s'effectuer par équipartition entre les cellules-filles pour de telles raisons.

I.B.2. Trafic et mitose, cas de l'appareil de Golgi

I.B.2.a. Problématique

Le trafic intracellulaire est interrompu lors de la mitose dans les cellules de mammifères, tandis que les compartiments membranaires sont hérités par les cellules-filles (Warren 1989□Lowe, Nakamura et al. 1998). La sécrétion et l'endocytose par exemple sont fortement inhibées en début de mitose. Dans le cas de la sécrétion, l'inhibition semble être due à l'inactivation de la voie à de nombreuses étapes, de la formation des sites de sortie du RE à la fusion des vésicules assurant le transport golgien. De manière concomitante, le ruban golgien est progressivement désassemblé en mini-empilements de citernes, qui sont ensuite progressivement désempilées tout en générant des fragments tubulo-vésiculaires de taille hétérogène et des vésicules de 50-70 nm de diamètre (Lucocq et al. 1987□Lucocq et Warren 1987□Jokitalo et al. 2001). Une polémique existe quant au devenir de ces fragments (Figure 8)□ils persistent tels quels dans le cytoplasme en métaphase ou bien fusionnent avec le RE en prophase pour en re-sortir en télophase (Roth 1999). Dans les deux cas, l'appareil de Golgi se reforme en télophase à partir de fragments qui coalescent pour re-donner l'empilement de citernes golgiennes, tandis que l'enveloppe nucléaire et le RE sont reformés et que le trafic intracellulaire reprend (Souter et al. 1993). Notons que dans les cellules végétales et certaines levures, parce qu'elles sont délimitées par une paroi, la sécrétion doit être maintenue tout au long de la division, et l'appareil de Golgi reste structuré et fonctionnel en permanence (Rossanese et Glick 2001).

I.B.2.b. Héritage de l'appareil de Golgi

La question concernant le devenir des fragments golgiens mitotiques vis-à-vis du RE a été abordée de plusieurs manières □ par immunolocalisation de marqueurs golgiens dans des cellules mitotiques par microscopie électronique et de fluorescence, par microscopie de fluorescence *in vivo* de ces mêmes marqueurs golgiens, et par des méthodes biochimiques. Malgré le grand nombre de groupes ayant abordé cette problématique, la controverse n'est pas levée. Même lorsque des techniques identiques ont été employées, les conclusions ont divergé. Toutefois, la plupart des articles publiés sur ce sujet présentent des faiblesses qui remettent en doute au moins une partie de leur contenu, comme le choix du marqueur golgien suivi (curieusement souvent proximal ou distal), sa surexpression excessive, la méthode de synchronisation des cellules, la faiblesse des contrôles ... Certaines études proposent un modèle mixte, les deux modes d'héritage de l'appareil de Golgi n'étant pas mutuellement exclusifs (Rossanese et al. 2001). Comme nous le verrons dans la partie Résultats, notre étude est en faveur d'un tel modèle mixte.

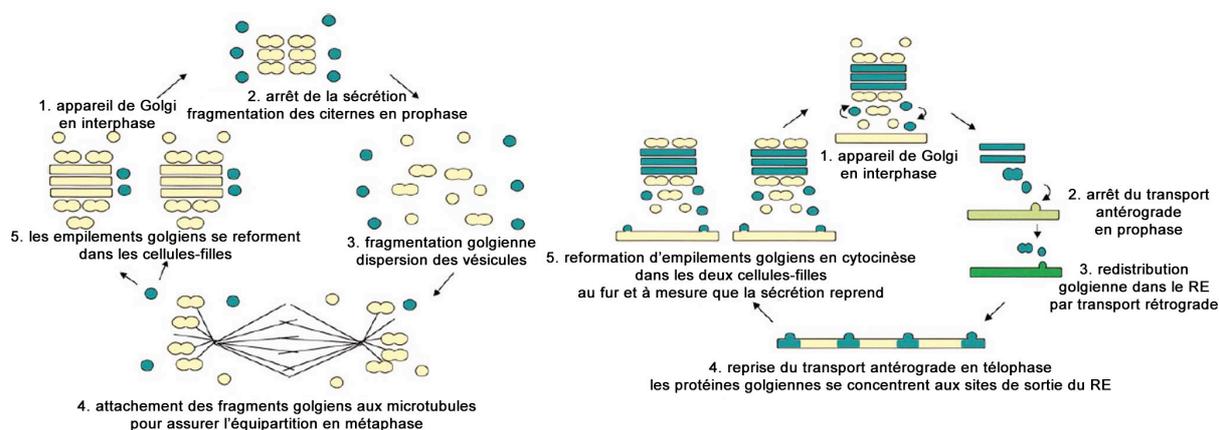


Figure 8. Les deux modèles extrêmes de l'héritage de l'appareil de Golgi lors de la mitose (Roth 1999).

A gauche, le modèle d'héritage par fragmentation. Lors de l'entrée en mitose, le trafic golgien cesse car la fusion membranaire est inhibée, ce qui provoque la fragmentation de l'appareil de Golgi. Ces fragments s'associent aux microtubules du fuseau mitotique en métaphase, assurant ainsi leur héritage équitable par les cellules-filles, dans lesquelles l'appareil de Golgi est réassemblé à partir de ces fragments.

A droite, le modèle d'héritage dépendant du RE. Les membranes golgiennes sont transportées vers le RE lors de l'entrée en mitose. Les membranes du RE sont elles-mêmes réparties dans l'ensemble de la cellule, en mitose comme en interphase, et donc elles sont équitablement héritées par les cellules-filles. En fin de mitose, l'appareil de Golgi est reformé à partir des membranes du RE.

La difficulté essentielle rencontrée par les groupes étudiant le devenir des membranes golgiennes au cours de la mitose est que ces membranes sont affectées grandement du point de vue morphologique lors de l'entrée en mitose (Lucocq et al. 1987). Ceci est aussi vrai pour d'autres organites délimités par des membranes de grande surface, comme le RE. Ainsi il est très difficile de suivre l'appareil de Golgi à travers la mitose par des techniques de microscopie optique ou électronique.

I.B.2.c. Observations directes microscopiques et biochimiques

I.B.2.c.i. Par microscopie optique, éventuellement in vivo

L'observation de marqueurs de l'appareil de Golgi par microscopie optique montre que les membranes golgiennes sont fragmentées à partir de la prophase et fortement dispersées dans le cytoplasme en métaphase, et cette localisation diffuse devient souvent indistinguable de marqueurs cytosoliques ou d'autres organites comme le RE (Zaal et al. 1999). En fait, pour certains marqueurs, on observe en métaphase des structures clairement distinctes d'un marquage diffus de type RE, parfois alignées sur les microtubules du fuseau mitotique (Shima et al. 1997 □ Shima et al. 1998 □ Jokitalo et al. 2001), et dont le nombre varie grandement en fonction de la lignée cellulaire. Une différence essentielle entre la localisation des marqueurs du RE et celle des marqueurs de l'appareil de Golgi est qu'en métaphase, les marqueurs du RE sont localisés uniformément à travers le cytoplasme mais sont exclus de la région du fuseau mitotique, tandis que les marqueurs golgiens sont répartis uniformément y compris dans cette région et uniquement exclus du volume occupé par les chromosomes. Donc une partie au moins de ces marqueurs golgiens, en particulier des enzymes et des protéines de matrice transmembranaires (et donc une partie des membranes golgiennes) ne sont pas redistribués dans le RE.

Par microscopie de fluorescence de cellules vivantes, différentes constructions basées sur des enzymes golgiennes (leur segment transmembranaire, nécessaire et suffisant pour assurer la localisation correcte à l'équilibre) en fusion avec la GFP ont été exprimées dans des cellules animales et observées au cours de la mitose. Les deux situations extrêmes ont été caractérisées. Un marqueur golgien est présent sur des structures que l'on peut suivre tout au long de la mitose, et qui s'associent aux bras du fuseau mitotique lors de leur équpartition entre les cellules-filles (Shima et al. 1998). En revanche, un autre marqueur (exprimé dans un autre type cellulaire) est clairement re-distribué dans le RE en métaphase (Zaal et al. 1999), puisque son coefficient de diffusion apparent mesuré par des expériences de

photoblanchiment diffère de celui d'un analogue fluorescent de lipide golgien □ ces deux coefficients de diffusion devraient coïncider si les deux marqueurs fluorescents étaient présents sur de vésicules de petite taille, ce serait celui de la marche aléatoire des vésicules dans le cytoplasme (Figure 9). Mais il est probable que la surexpression du marqueur et surtout des problèmes de repliement correct soient en partie responsables de l'accumulation de ce marqueur dans le RE (Jokitalo et al. 2001). De plus la méthode désormais classique de mesure des coefficients de diffusion des protéines dans les membranes d'organites de grande taille pose problème □ elle repose sur l'hypothèse de diffusion brownienne sur un espace bidimensionnel, alors qu'en réalité on observe la marche aléatoire biaisée de molécules (il existe des domaines dans les membranes qui les piègent ou les repoussent) sur une surface de dimension fractale inconnue projetée sur un plan d'observation. Il n'existe à ma connaissance aucune preuve (ou même une tentative de démonstration) que ces diffusions sont browniennes, et donc la signification réelle de ces coefficients de diffusion est très discutable⁴².

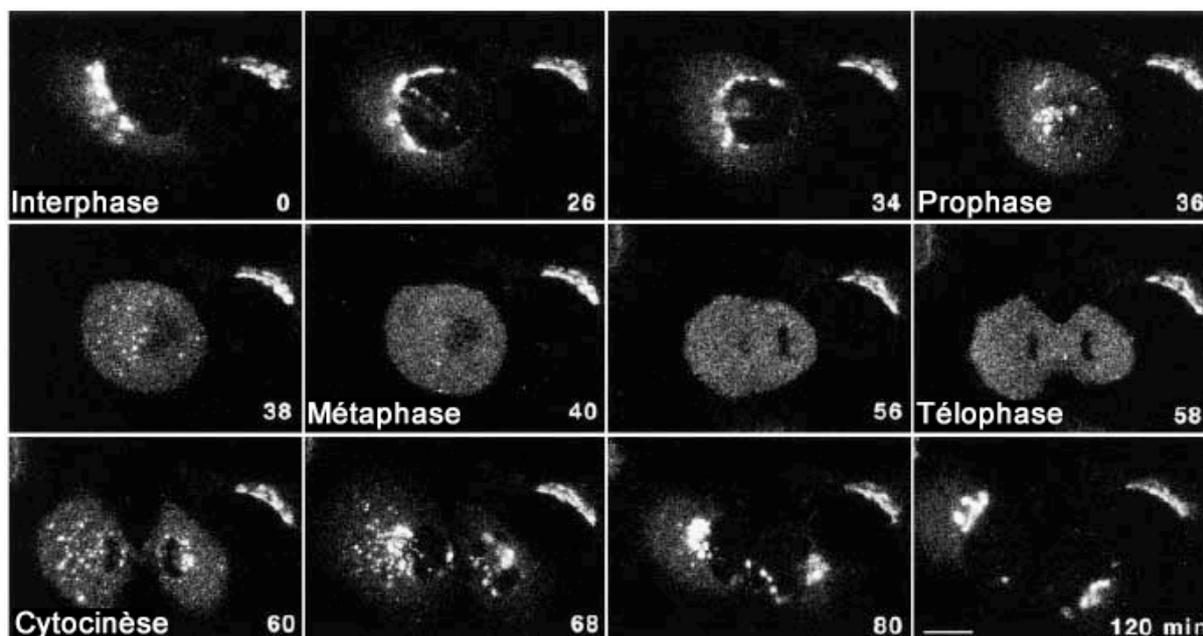


Figure 9. Dynamique des membranes golgiennes in vivo lors de la mitose (Zaal et al. 1999). Une cellule exprimant un marqueur transmembranaire trans-golgien (GalT-GFP) est visualisée au cours d'une mitose par

⁴² Une étude très récemment publiée, basée sur l'analyse des fluctuations de fluorescence à l'aide de modèles théoriques et de simulations numériques, propose justement que les protéines transmembranaires ont une diffusion anormale, de type subdiffusive (plus lente que la diffusion brownienne classique), dans les membranes du RE et de l'appareil de Golgi (Weiss et al. 2003). Ces résultats remettent en cause l'approche classique de mesure des coefficients de diffusion largement utilisée jusqu'ici (Siggia et al. 2000).

microscopie de fluorescence. L'appareil de Golgi est fragmenté lorsque la cellule s'arrondit et entre en prophase. Les fragments disparaissent petit à petit au profit d'un marquage diffus, en particulier en métaphase. C'est la nature de ce marquage diffus qui est l'objet de controverses. Ensuite l'appareil de Golgi est reformé dans les cellules-filles au fur et à mesure que le marque diffus disparaît en fin de mitose.

I.B.2.c.ii. Par microscopie électronique

Par microscopie électronique, on observe que l'empilement de citernes golgiennes est désassemblé puis fragmenté au cours de la mitose. Il existe plusieurs classes de fragments, différant par leur taille et leur morphologie, et surtout dont le nombre varie grandement selon le type cellulaire, voire dans un même type cellulaire selon les études. Des marqueurs golgiens, souvent plutôt du cis-Golgi ou du trans-Golgi, endogènes ou surexprimés, ont été localisés, selon les cas, essentiellement sur ces fragments (Figure 10) (Lucocq et al. 1987 □ Lucocq et al. 1989 □ Jokitalo et al. 2001) ou dans les membranes du RE (Zaal et al. 1999). La proportion entre ces deux populations fait l'objet de controverse □ selon les publications, le même marqueur est trouvé quasi-uniquement dans l'une ou l'autre. Toutefois une localisation d'un marqueur golgien au RE peut aussi être due à de la néo-synthèse (Zaal et al. 1999), ces expériences concluant sur une telle localisation ayant été effectuées en l'absence de cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique). Et justement, l'utilisation de cycloheximide a permis d'indiquer que la présence de protéines golgiennes dans le RE en mitose semble essentiellement due à la néo-synthèse (Farmaki et al. 1999).

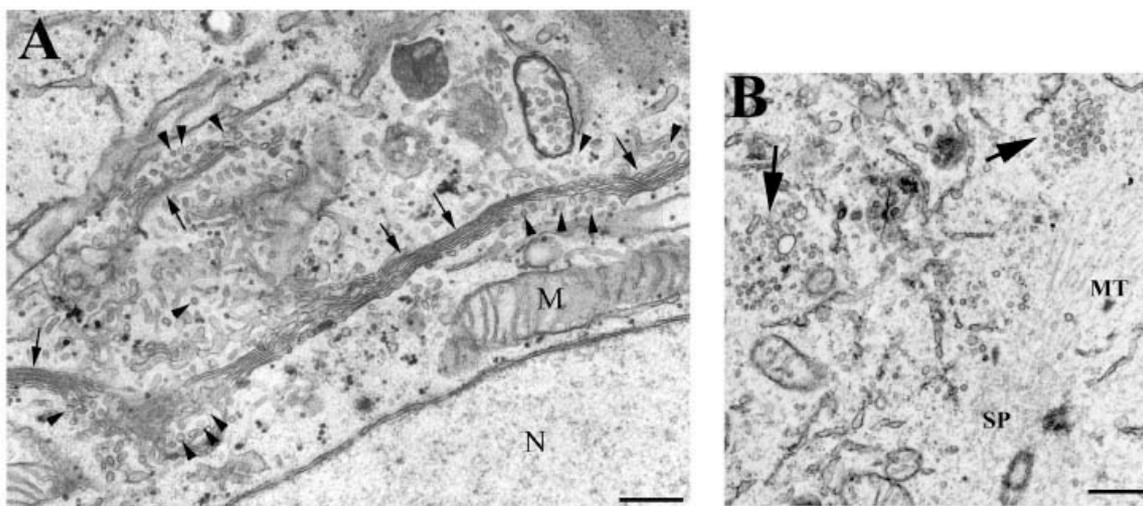


Figure 10. Morphologie des membranes golgiennes en interphase et en mitose (Shorter et Warren 2002).
Visualisation par microscopie électronique de la morphologie des membranes golgiennes dans des cellules

fixées. L'empilement de citernes périnucléaire visible en interphase (A) laisse place à une collection de fragments en mitose, composée de fragments hétérogènes et de vésicules de 50-70 nm (B).

I.B.2.c.iii. Par des méthodes biochimiques

Différentes fractions subcellulaires de cellules mitotiques ou bloquées par traitement avec le Nocodazole (au point de contrôle de l'assemblage du fuseau, ou *spindle assembly checkpoint*), obtenues après lyse cellulaire (par différentes méthodes) et équilibration sur un gradient, ont été analysées biochimiquement et par microscopie de fluorescence. Le groupe d'A. Linstedt a ainsi isolé deux types de fractions contenant des marqueurs golgiens (transmembranaires, comme GPP130), une fraction clairement distincte de la fraction RE sur le gradient et une seconde qui n'est pas séparée du RE sur le gradient (Jesch et Linstedt 1998). La première fraction correspond à des vésicules de 50-70 nm et la seconde à des fragments tubulo-vésiculaires, dépourvus de marqueurs du RE (d'après l'analyse par immunofluorescence). Le groupe d'A. Linstedt propose donc que les membranes golgiennes mitotiques existent sous ces deux formes et ne fusionnent pas avec le RE.

Ces deux formes sont en équilibre dynamique (Jesch, Mehta et al. 2001), puisque si des cellules en métaphase sont placées à 15°C (un traitement qui affecte le transport bidirectionnel RE-Golgi et l'inhibe à un stade compris entre la sortie du RE et l'arrivée à l'appareil de Golgi en interphase), les petites vésicules (marquage diffus par immunofluorescence) disparaissent au profit d'agrégats dont la taille est plus importante que ceux habituellement visibles dans les cellules en métaphase. En fait le problème de cette étude est qu'il n'y a pas de preuve directe que les vésicules ou les fragments tubulo-vésiculaires obtenues par fractionnement ou observés par immunofluorescence dans les cellules ne sont pas des portions du RE comme les sites de sortie, qui sont naturellement enrichis en marqueurs golgiens⁴³. Donc le marquage diffus de fluorescence dans les cellules métaphasiques peut très bien être en partie du RE, et il est possible qu'une partie de l'appareil de Golgi ait fusionné avec le RE, même s'il est clair qu'une partie de l'appareil de Golgi n'est pas dans le RE en métaphase, celle qui est visible dans la région du fuseau mitotique (ce dernier résultat est souvent négligé). De plus, rien ne prouve que la partie de l'appareil de Golgi qui n'est pas dans le RE en métaphase n'a pas fusionné avec le RE puis ré-émergé, ou bien qu'un échange continu de membranes entre le RE et ces fragments golgiens n'est pas

⁴³ Notons au passage que la technique de CLEM (correlative Light/EM) appliquée à ces marqueurs pourrait aider à trancher cette question

nécessaire pour un héritage correct de l'appareil de Golgi (ou du moins utilisé par la cellule dans des conditions physiologiques).

Un autre argument utilisé par le groupe d'A. Linstedt est l'absence de fusion Golgi-RE en présence de BFA sur des cellules bloquées par traitement avec Nocodazole (observée en suivant les fractions du gradient), à moins que la BFA n'ait été ajoutée aux cellules avant le Nocodazole (Jesch et Linstedt 1998). La conclusion proposée est que le transport rétrograde Golgi-RE, mis en évidence par la BFA, est normalement actif en interphase (BFA ajoutée avant le Nocodazole), mais fortement inhibée en mitose (du moins dans des cellules qui ont déclenché la cascade de signalisation liée au point de contrôle d'assemblage du fuseau (*spindle assembly checkpoint*), quand la BFA est ajoutée 24 h après le début du blocage par traitement avec le Nocodazole). Nous verrons dans la partie Résultats pourquoi cet argument est probablement le moins convaincant. Une étude détaillée du comportement de l'appareil de Golgi aux différents stades de la mitose en réponse à un traitement BFA permet de ré-évaluer l'ensemble de ces interprétations.

I.B.2.d. Transport depuis et vers l'appareil de Golgi en mitose

Comme nous l'avons déjà mentionné, une perturbation importante du transport intracellulaire intervient de manière concomitante aux modifications de la structure et de la dynamique de l'appareil de Golgi (Warren 1989; Lowe, Nakamura et al. 1998). En réalité, la modulation du trafic golgien lors de la mitose et le mode d'héritage de l'appareil de Golgi sont des questions intimement liées. Le modèle d'héritage de l'appareil de Golgi par fusion avec le RE suppose un transport rétrograde très rapide des membranes golgiennes et leur fusion avec le RE en début de mitose, et un transport antérograde RE-Golgi en fin de mitose pour reformer l'appareil de Golgi (Zaal et al. 1999). La balance entre les voies de trafic antérograde et rétrograde serait donc modulée lors des différentes phases de la mitose (Roth 1999). Le modèle d'héritage par fragmentation ne nécessite pas l'intervention d'échanges membranaires entre l'appareil de Golgi et le RE, en revanche il repose sur une inhibition du transport intra-golgien au niveau des processus de fusion (Warren 1989).

Cette question du rôle du transport dans l'héritage de l'appareil de Golgi est à son tour liée à celle du transport intra-golgien en interphase (Glick 2002; Lowe 2002). Le modèle d'héritage par le RE s'appuie sur une hypothèse proche de celui du transport par maturation des citernes, ces deux modèles impliquent que l'appareil de Golgi est entièrement généré à partir du RE. Le modèle d'héritage par fragmentation repose quant à lui sur l'existence d'une

structure golgienne minimale indépendante des autres organites, tout comme le modèle de transport vésiculaire suppose que l'empilement des citernes de l'appareil de Golgi est une structure stable dépendant probablement d'une matrice sous-jacente et que des vésicules émergent du RE pour atteindre ces citernes stables entre lesquelles elles sont ensuite échangées.

Pour trancher entre les deux modèles d'héritage de l'appareil de Golgi, le rôle du transport bidirectionnel RE-Golgi a été évalué selon trois approches.

1. L'utilisation de la BFA pour exagérer le transport rétrograde et forcer l'héritage de l'appareil de Golgi par le RE (Seemann et al. 2002).
2. L'utilisation d'une autre drogue ou d'un mutant de Arf1 pour bloquer le transport rétrograde en début de mitose, et empêcher la redistribution de l'appareil de Golgi au RE et donc son héritage par le RE (N. Altan, J. Lippincott-Schwartz, communication personnelle).
3. La micro-injection de mutant de Sar1 qui bloquent la sortie du RE et donc le transport antérograde RE-Golgi en fin de mitose, pour empêcher la reformation post-métaphasique de l'appareil de Golgi à partir du RE (Zaal et al. 1999 □ Prescott et al. 2001).

I.B.2.d.i. Rétrograde Golgi-RE forcé en début de mitose

Lorsque des cellules sont traitées par la BFA en interphase, les enzymes golgiennes sont redistribuées dans le RE et les protéines de la matrice golgienne sur des structures ponctiformes dispersées dans le cytoplasme (Seemann, Jokitalo, Pypaert et al. 2000). Quand les cellules se divisent, ces deux localisations sont maintenues pendant toute la durée de la mitose, et même après la cytokinèse (Seemann et al. 2002). Le groupe de J. Lippincott-Schwartz a montré que les structures ponctiformes positives pour certains composants de la matrice golgienne⁴⁴ correspondent aux sites de sortie du RE (marqués par des constructions COPII-GFP in vivo), dont la fonction n'est pas altérée par la BFA (Ward et al. 2001). Le groupe de G. Warren a réalisé des immunoprécipitations de GM130, qui marque ces structures, et montré que des marqueurs du RE ne sont pas co-précipités. Cependant, de façon surprenante, cette étude n'indique aucun autre composant de la matrice golgienne qui serait co-précipité avec GM130, comme GRASP65, le récepteur de GM130 sur les membranes⁴⁵

⁴⁴ et d'autres protéines capables d'interagir avec COPII

⁴⁵ qui est pourtant suivi dans d'autres expériences de cette étude

(Seemann et al. 2002). Par conséquent, contrairement aux conclusions du groupe de G. Warren, il n'est pas clair que les structures de matrice golgienne soient indépendantes du RE, les protéines de la matrice sont probablement redistribuées sur les sites de sortie du RE par la BFA et donc cette drogue permettrait d'exagérer un mode d'héritage de l'appareil de Golgi par fusion avec le RE. Lorsque la drogue est retirée des cellules, l'appareil de Golgi se reforme et est fonctionnel pour le transport, donc ce mode d'héritage artificiel par le RE peut fonctionner.

I.B.2.d.ii. Rétrograde Golgi-RE inhibé en début de mitose

Si le transport rétrograde est inhibé en début de mitose par une autre drogue, H89⁴⁶, qui agit sur des kinases, ou par un mutant de Arf1 bloqué sous sa forme GTP (ces deux types de stratégies bloquent le transport rétrograde induit par la BFA par exemple (Zhang et al. 1994□ Lee et Linstedt 2000)), la fragmentation et la dispersion de l'appareil de Golgi sont fortement inhibées (N. Altan, J. Lippincott-Schwartz, communication personnelle). Les membranes golgiennes persistent compactées près des pôles du fuseau mitotique, ce qui perturbe par ailleurs fortement le déroulement correct de la mitose (voir I.B.3.). Ces expériences ont mené le groupe de J. Lippincott-Schwartz à conclure que le désassemblage de l'appareil de Golgi en début de mitose repose de manière essentielle sur le transport rétrograde Golgi-RE. De plus, si l'appareil de Golgi est préalablement redistribué dans le RE en interphase et maintenu dans cet état par traitement continu par la BFA tout au long de la mitose, H89 ou le mutant de Arf1 (ajoutés après la redistribution au RE des membranes golgiennes) n'ont aucun effet sur cette localisation au RE des marqueurs golgiens ou le déroulement de la mitose. Toutefois l'utilisation de la drogue H89 pose problème, on ne connaît ni son mode d'action exact ni l'identité exhaustive de ces cibles, et surtout sa forte toxicité est un inconvénient majeur. Le mutant Arf1 bloqué sous forme GTP est lui aussi très toxique, et seules quelques cellules entrent en mitose (qu'elles ne finissent pas ou alors «avec difficulté»). L'utilisation du mutant Arf1 bloqué sous sa forme GTP génère des vésicules COPI gelées (sur lesquelles le manteau est fixe et ne peut se détacher).

I.B.2.d.iii. Antérograde RE-Golgi inhibé en fin de mitose

⁴⁶ L'effet de cette drogue sur le transport rétrograde a été décrit par le groupe d'A. Linstedt (Lee et Linstedt 1999□ Lee et Linstedt 2000). H89 inhibe le transport rétrograde induit par la drogue BFA, ou un traitement hypo- ou hyperosmotique.

La micro-injection d'un mutant de Sar1 qui bloque la sortie du RE dans des cellules en interphase entraîne la redistribution des marqueurs golgiens au RE à cause de leur recyclage Golgi-RE constitutif. Cette méthode a été utilisée par les groupes de J. Lippincott-Schwartz et J. Lucocq pour tester si l'appareil de Golgi peut être régénéré en fin de mitose sans apport membranaire depuis le RE (Zaal et al. 1999 □ Prescott et al. 2001). La reformation de l'appareil de Golgi en fin de mitose est affectée dans ces conditions, un marqueur golgien étant essentiellement localisé au RE. Mais quand le bloc de sortie du RE est initié très près de la métaphase, quand l'appareil de Golgi est le plus dispersé (d'après J. Lippincott-Schwartz redistribué dans le RE, d'après G. Warren sous forme de fragments et vésicules indépendants du RE), les cellules injectées (près de la métaphase et fixées en télophase) contiennent une structure qui se localise près du centrosome et du pont intercellulaire, comme l'appareil de Golgi des cellules non-injectées (Prescott et al. 2001). Cette structure contient des marqueurs golgiens (endogènes) dont des enzymes, et est formée d'agrégats tubulo-vésiculaires et non pas d'empilements de citernes. Donc une structure ressemblant à l'appareil de Golgi (du moins par immunofluorescence) peut se former en fin de mitose sans apport de membranes du RE, c'est donc que certains composants golgiens ne cyclent pas par le RE pendant la mitose⁴⁷. Mais la vaste majorité des composants golgiens sont tout de même accumulés au RE et ne peuvent en sortir si Sar1 est affecté⁴⁸.

I.B.2.e. Mécanismes moléculaires □ systèmes in vitro et semi-in vitro

Les études menées par l'équipe de G. Warren reposent sur l'hypothèse selon laquelle la modulation du trafic lors de la mitose est directement responsable de l'altération et de la dispersion des organites (Warren 1989 □ Warren et Malhotra 1998). Des composants-clés de l'appareil de Golgi seraient modifiés en mitose ce qui entraînerait les modifications dynamiques et morphologiques. Cette hypothèse s'est trouvée largement confirmée et a permis d'identifier quelques protéines jouant un rôle majeur dans le transport au niveau de l'appareil de Golgi et dont la modification (phosphorylation) en mitose induit simultanément un bloc du trafic et la disruption de l'empilement golgien.

⁴⁷ A nouveau, ce résultat confirme l'observation que les marqueurs de l'appareil de Golgi sont présents dans la zone du fuseau mitotique, pas ceux du RE (Jesch, Mehta et al. 2001).

⁴⁸ Mais comme nous l'avons rappelé au début de ce paragraphe, ces mutants de Sar1 provoquent la relocalisation (rapide, en 1 h dans le cas de micro-injection de protéine purifiée, comparée à la mitose qui dure 1 h à 3 h) de marqueurs golgiens au RE en interphase, la proportion de marqueur localisé au RE dans ces cellules injectées est probablement exagérée.

Des systèmes *in vitro* et semi-*in vitro* ont été utilisés pour étudier le désassemblage puis le re-assemblage de l'appareil de Golgi en mitose. Le système *in vitro* mis au point dans le laboratoire de G. Warren consiste à purifier des empilements golgiens intacts et à les incubier avec un cytosol mitotique ou un cytosol interphasique (Misteli et Warren 1994 □ Misteli et Warren 1995 □ Rabouille, Misteli et al. 1995). Les membranes golgiennes sont alors fixées et observées après chaque incubation par microscopie électronique ([Figure 11](#)). Le système semi-*in vitro* mis au point dans le laboratoire de Vivek Malhotra repose sur l'incubation de cellules adhérentes NRK semi-perméabilisées avec un cytosol mitotique ou interphasique⁴⁹ (Acharya et al. 1998). L'observation de l'appareil de Golgi se fait alors par immunofluorescence ou microscopie électronique. Un troisième système a récemment été caractérisé, qui consiste à incubier des cellules polarisées MDCK semi-perméabilisées avec un extrait d'oeufs de xénope mitotique (Kano et al. 2000). Les membranes golgiennes sont caractérisées par microscopie de fluorescence (ces cellules expriment une enzyme golgienne étiquetée avec la GFP) et électronique.

En fait le choix des cytosols de désassemblage et réassemblage utilisés par les groupes de G. Warren et V. Malhotra est discutable □ le cytosol mitotique est en fait un cytosol de cellules synchronisées en prométaphase par dépolymérisation des microtubules par traitement au Nocodazole, et donc un cytosol de cellules bloquées dans une situation non-physiologique contenant une drogue dont les cibles ne sont pas toutes connues. En particulier, le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique (*spindle assembly checkpoint*) est activé dans ces cellules, Mad2 est recruté aux kinétochores (Abrieu et al. 2001) ... Le cytosol de réassemblage est, dans certains des expériences, un cytosol de cellules non-synchronisées, et donc en partie mitotiques (un «*shake-off*»⁵⁰ avant la collection de cellules permettrait de s'affranchir de ces cellules mitotiques). Ce cytosol est obtenu majoritairement à partir de cellules qui ont un appareil de Golgi interphasique intact, et il est probable que les composants du cytosol permettant la reformation de l'appareil de Golgi sont plutôt présents dans le cytosol des cellules en anaphase/télophase qui contiennent un appareil de Golgi en phase de réassemblage. L'isolation d'un tel cytosol n'est cependant pas aisée, il faudrait par

⁴⁹ Une version précédente de ce système utilisait la drogue Illimaquinone qui provoque le désassemblage de l'appareil de Golgi et produit des membranes de morphologie comparable à celles des membranes Golgi mitotiques du système *in vitro* de G. Warren, même si le mécanisme de désassemblage met en jeu une action sur les protéines G hétérotrimériques qui ne correspond pas aux mécanismes de désassemblage mitotique (Acharya, Jacobs et al. 1995; Acharya, McCaffery et al. 1995 □

exemple récupérer des cellules en prométaphase/métaphase par «shake-off» de populations idéalement non-synchronisées, les laisser progresser jusqu'en anaphase/télophase et récupérer leur cytosol.

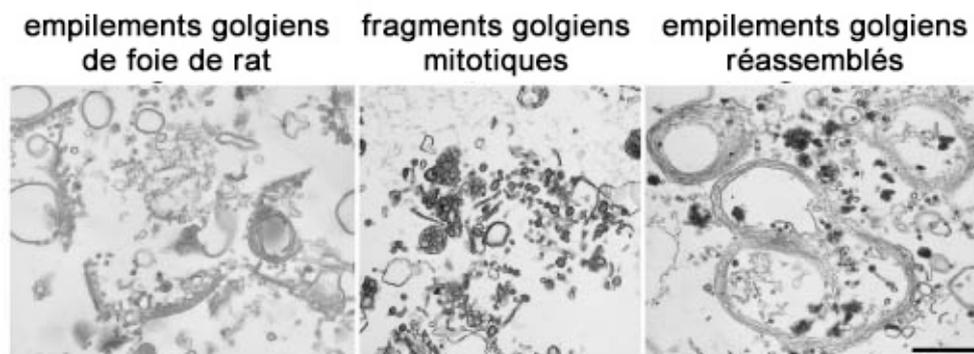


Figure 11. Dynamique des membranes golgiennes au cours de la mitose reproduite in vitro (Rabouille, Misteli et al. 1995 [Shorter et Warren 2002]). Les empilements golgiens purifiés à partir de foie de rat sont fragmentés par incubation avec un cytosol «mitotique», et reformés après incubation dans un cytosol interphasique.

Dans les trois systèmes, le cytosol ou l'extrait d'oeufs peut être modifié (immuno-déplétion, ajout de composant ou de drogues ...) et en jouant sur les conditions ces trois groupes ont mis en évidence des facteurs qui contrôlent le désassemblage et le réassemblage de l'appareil de Golgi. Je vais d'abord détailler les mécanismes moléculaires du réassemblage, le désassemblage reposant largement sur une rupture des interactions moléculaires nécessaires au réassemblage.

I.B.2.f. Mécanismes de réassemblage

Les approches de G. Warren et V. Malhotra pour étudier la reformation de l'appareil de Golgi, respectivement à partir de fragments mitotiques ou induits par la drogue Illimaquinone, ont conduit essentiellement à des conclusions similaires. Comme dans le cas du système in vitro de transport intra-Golgi de J. Rothman, l'effet de composés comme le NEM (agent alkylant) et le GTP γ S (analogue du GTP dont l'hydrolyse est très lente) ont été observés, ainsi que celui de RabGDI (qui perturbe de nombreuses protéines Rabs). Dans les deux systèmes de reformation de l'appareil de Golgi, NEM inhibe la reformation des empilements de citernes,

⁵⁰ technique consistant à agiter la boîte de culture afin de détacher les cellules les moins

tandis que GTP γ S et RabGDI n'ont pas d'effet inhibiteur sur ce processus (l'incubation en présence de GTP γ S provoque même la reformation de citernes exagérément larges)⁵¹ (Acharya, McCaffery et al. 1995; Rabouille, Misteli et al. 1995). L'effet inhibiteur du NEM sur le réassemblage de l'appareil de Golgi a mené à la découverte du rôle mitotique de deux AAA-ATPases, NSF et p97, de leurs cofacteurs associés respectifs SNAP et p47, de SNAREs golgiennes comme syntaxine 5, et du facteur d'arrimage p115 (Acharya, Jacobs et al. 1995; Acharya, McCaffery et al. 1995; Rabouille, Levine et al. 1995). Ces voies de réassemblage dépendantes de deux ATPases ont été mises en évidence en neutralisant le matériel de départ par traitement au NEM, et en trouvant une combinaison minimale de protéines (dont des ATPases connues pour leur sensibilité au NEM et leur rôle dans la fusion membranaire) à incuber avec ce matériel pour obtenir des citernes. L'implication de la machinerie de fusion (NSF, SNAREs) dans la reformation des citernes golgiennes à partir de fragments n'est pas surprenante selon le modèle du groupe de G. Warren, l'hypothèse de fragmentation en prophase par inhibition de fusion implique aussi que la fusion est ré-activée pour permettre le réassemblage de l'appareil de Golgi en fin de mitose. Notons que le rôle de la fusion de membranes pour reformer l'empilement de citernes est aussi probablement nécessaire dans le cadre du modèle d'héritage via le RE.

La SNARE syntaxine 5 interagit avec les deux co-facteurs SNAP et p47, et donc les deux voies de réassemblage sont interdépendantes (Rabouille et al. 1998). Dans le système in vitro, chacune de ces deux voies sont capables de générer des citernes de taille normale (mais de morphologies distinctes), et lorsque les deux ATPases (et les protéines associées) sont ajoutées les citernes ont une taille et une morphologie normales (Rabouille, Levine et al. 1995). Dans le système semi-in vitro, il semblait qu'un processus dépendant de NSF précède nécessairement le processus dépendant de p97 pendant le réassemblage, et qu'aucun des deux processus ne pouvait à lui seul générer des citernes (Acharya, Jacobs et al. 1995). Probablement ceci provient de la nature du désassemblage, mitotique dans le système in vitro, dû à l'illimaquinone dans le système semi-in vitro (effet sur les GTPases hétérotrimériques).

adhérentes, qui sont pratiquement toutes mitotiques

⁵¹ Notons toutefois que le GTP γ S ainsi que AlF₄, autre inhibiteur des GTPases, inhibent la reformation de l'appareil de Golgi lorsqu'ils sont présents durant le désassemblage par un cytosol mitotique, un effet «thémoire» que nous avons observé aussi dans le contexte de la reformation de l'appareil de Golgi en fin de mitose (voir partie Résultats).

Dans des études suivantes, la fonction précise de NSF dans le réassemblage s'est avérée différente de celle attendue a priori, c'est-à-dire le désassemblage des SNAREs après fusion (Muller et al. 1999 □ Muller et al. 2002). En plus de la tSNARE syntaxine 5, la vSNARE (elle aussi golgienne) GOS28 participe à la voie de réassemblage dépendante de NSF. Deux mutants de NSF incapables d'hydrolyser l'ATP (et donc de désassembler les SNAREs après fusion) permettent cependant de réassembler les citernes. En revanche l'association de NSF sous sa forme liée à l'ATP à GOS28 est bien requise pour le réassemblage, elle entraîne le recrutement de GAT16, un facteur qui empêche GOS28 de s'apparier précocement avec syntaxine 5, l'appariement ne devant se produire qu'aux stades ultimes précédant la fusion.

Dans le cas de la voie p97, un facteur favorisant le désassemblage du complexe p97/p47/syntaxine 5 catalysé par l'hydrolyse de l'ATP a été récemment identifié, VCIP135 (Uchiyama et al. 2002), dont le rôle dans le réassemblage de l'appareil de Golgi (et du RE) a été de plus confirmé in vivo par micro-injection d'anticorps bloquants.

L'équipe de G. Warren a ensuite détaillé l'effet du NEM sur le réassemblage de l'appareil de Golgi. En plus de NSF et p97 (et de leurs partenaires), présents dans le cytosol, des facteurs liés aux membranes sont affectés. En fait, la pré-incubation des fragments golgiens mitotiques avec le NEM inhibe l'empilement des citernes reformées en présence de cytosol interphasique non-traité par le NEM (Rabouille, Levine et al. 1995). Cette expérience permet de découpler l'étude de la formation des citernes et de leur empilement. Comme une pré-incubation des empilements golgiens interphasiques intacts avec le NEM n'inhibe pas les phases suivantes de désassemblage et réassemblage en présence de cytosols mitotique et interphasique respectivement, c'est donc que les cibles membranaires de NEM jouant un rôle dans le réassemblage ne sont accessibles à ce composé (et probablement au cytosol) que sur les fragments golgiens mitotiques (l'alkylation des cystéines par le NEM étant irréversible). Le groupe de G. Warren a alors tenté d'isoler de tels facteurs associés aux membranes golgiennes, qui ne seraient accessibles au cytosol qu'en mitose et pas en interphase, et dont la modification par le NEM empêcherait le réassemblage des empilements de citernes (Barr et al. 1997). En utilisant un analogue biotinylé du NEM, l'équipe de G. Warren a pu mettre en évidence par une révélation par la streptavidine trois protéines qui remplissent ces conditions, et a ainsi identifié GRASP65 en tant que cible majeure et GM130 comme l'une des deux cibles mineures (la troisième a un poids moléculaire de 160 kDa, comme Golgine160). L'empilement de citernes est inhibé par pré-incubation des fragments golgiens mitotiques

avec un anticorps anti-GRASP65 ou la protéine GRASP65 recombinante purifiée chez *E coli* (sauf si celle-ci est pré-neutralisée par le NEM). GRASP55 a ensuite été identifié par analogie de séquence avec GRASP65 (certains anticorps anti-GRASP65 détectent aussi GRASP55), et son rôle dans l'empilement de citernes a été testé et confirmé dans le même système *in vitro* (inhibition de l'empilement par un anticorps anti-GRASP55 et par GRASP55 recombinant) (Shorter et al. 1999).

Le facteur d'arrimage p115, un des composants cytosoliques minimaux de la voie dépendante de NSF, fait le lien entre les facteurs cytosoliques et les facteurs membranaires dans le processus de réassemblage. L'extrémité C-terminale de p115 interagit simultanément avec les extrémités N-terminales de GM130 (lié aux membranes golgiennes par GRASP65) et de la Giantine (ancrée dans les membranes périphériques des citernes et les vésicules qui les bordent) (Lesa et al. 2000), en particulier grâce à sa phosphorylation par une kinase de type CK II (Dirac-Svejstrup et al. 2000). Le rôle de ce complexe d'arrimage Giantine-p115-GM130 dans le réassemblage des citernes et de leurs empilements a été détaillé dans le même système *in vitro* (Figure 12) (Shorter et Warren 1999). L'immunodéplétion de p115 du cytosol de réassemblage, des anticorps dirigés contre GM130 et la Giantine ou des peptides empêchant les interactions p115-GM130 et p115-Giantine par compétition inhibent le réassemblage. Ce complexe d'arrimage permet d'une part de rapprocher les membranes destinés à fusionner et d'autre part de réaliser l'empilement des citernes (même les citernes formés par la voie p97 seule peuvent être empilés par l'action de ce complexe). De plus, ce processus d'arrimage est sensible au RabGDI (Shorter et al. 2002), ce qui suggère qu'une Rab golgienne, probablement une capable d'interagir avec GM130 (Rab1, dont p115 est un effecteur, ou Rab2, Rab6, Rab33) recrute ce complexe d'arrimage⁵². p115 participe donc d'abord à cette étape préliminaire de rapprochement des membranes, puis accomplit une fonction supplémentaire grâce à son motif de type «SNARE» p115 catalyse la formation du complexe v/tSNAREs GOS28/syntaxine 5. p115 coordonne donc l'arrimage des membranes et leur fusion (Shorter et al. 2002).

I.B.2.g. Mécanismes de désassemblage

⁵² La Golgine 84 a été récemment impliquée dans le processus d'empilement des citernes, et est aussi un effecteur de Rab1 (Diao et al. 2003 □ Satoh et al. 2003).

L'équipe de G. Warren a été la première à décrire l'évolution de la morphologie des membranes golgiennes au cours de la mitose. Comme nous l'avons vu, par microscopie électronique de cellules HeLa et NRK (sauvages ou exprimant stablement un marqueur transgolgien fusionné à la HRP), l'évolution de la morphologie des membranes golgiennes a été observée au cours des étapes successives de la mitose (Lucocq et al. 1987 □ Lucocq et al. 1989 □ Jokitalo et al. 2001). La fragmentation des empilements golgiens s'effectue par la production de vésicules sphériques de 50-70 nm de diamètre, le désempilement progressif des citernes et la production de fragments de citernes de taille hétérogène et de morphologie tubulo-vésiculaire. L'hypothèse de base des travaux suivants de l'équipe de G. Warren découle de ces observations □ le désassemblage de l'appareil de Golgi au début de la mitose serait la conséquence d'une altération de la machinerie du transport au niveau de l'appareil de Golgi. La formation de vésicules à partir des citernes ne serait pas affectée, mais leur capacité à fusionner serait fortement inhibée (Warren 1989 □ Warren et Malhotra 1998). L'incubation in vitro de préparations de Golgi purifié à partir de foie de rat avec un cytosol de cellules HeLa «mitotiques» reproduit ces observations □ elle transforme les empilements golgiens en vésicules de 50-70 nm de diamètre et en fragments tubulo-vésiculaires hétérogènes (des résidus de citernes) (Misteli et Warren 1994 □ Misteli et Warren 1995).

En présence de GTP γ S, les vésicules de 50-70 nm de diamètre sont recouvertes d'un manteau COPI (ce manteau n'est pas formé si le cytosol est déplété d'un composant de COPI). La production de vésicules COPI à partir de l'extrémité des citernes ne serait pas bloquée en mitose, et c'est parce que leur fusion avec les citernes golgiennes l'est en revanche que l'appareil de Golgi se fragmenterait et produirait ces vésicules. L'inhibition de fusion pourrait être le fruit de nombreux mécanismes moléculaires. D'abord, NSF, composant essentiel de la machinerie de fusion, est relativement déplété des membranes golgiennes mitotiques (Shorter et Warren 1999). Ensuite NSF fonctionne «normalement» à ce stade, et son activité ATPasique entraîne le désappariement des SNAREs, qui sont alors essentiellement sous forme libre (ne forment pas de complexes résistants au SDS) sur les membranes golgiennes, contrairement aux situations interphasiques et post-métaphasiques (Muller et al. 2002).

La raison pour laquelle les SNAREs sont essentiellement désappariées en début de mitose n'est pas connue, mais ceci pourrait être dû au second mécanisme d'inhibition de fusion □ l'inhibition de l'arrimage des membranes, étape précédant l'étape dépendante des SNAREs dans le processus de fusion (Figure 12). En effet, la formation du complexe Giantine-p115-

GM130 est fortement inhibée en mitose à cause de la phosphorylation de GM130 par CDK1 sur la sérine 25, ce qui rompt l'interaction p115-GM130 (Nakamura et al. 1997□Lowe, Rabouille et al. 1998). En fait p115 est même redistribué dans le cytosol en début de mitose, son interaction avec les membranes golgiennes est fortement inhibée (Levine et al. 1996□Sohda et al. 1998). La phosphorylation de GM130 par CDK1 a été caractérisée dans le système in vitro et in vivo à l'aide d'un anticorps phospho-spécifique (Lowe et al. 2000)□la mutation de cette sérine phosphorylée en début de mitose en alanine (qui rend GM130 non-phosphorylable) permet de maintenir l'interaction p115-GM130 dans un cytosol mitotique et donc probablement d'inhiber la fragmentation des citernes⁵³. La sérine 25 est déphosphorylée en sortie de mitose, ce qui permet de rétablir l'interaction p115-GM130 nécessaire à la reformation de l'appareil de Golgi.

CDK1 phosphoryle de plus Rab1 en début de mitose, ce qui augmente la proportion de Rab1 associée aux membranes (Bailly et al. 1991). Si Rab1 est bien la Rab golgienne qui recrute le complexe d'arrimage et en particulier p115 en fin de mitose et en interphase, sa phosphorylation pourrait empêcher ce recrutement et inhiber la fusion de vésicules COPI avec les citernes. La Golgine84, un autre effecteur de Rab1 impliqué dans l'empilement des citernes, est elle aussi phosphorylée, ce qui peut contribuer aussi au désassemblage de l'appareil de Golgi (Diao et al. 2003). En revanche l'association exagérée de Rab1 aux membranes est difficile à comprendre dans ce cadre. Il est possible que sa phosphorylation l'empêche d'interagir avec ses partenaires dans son état GTP, à la fois ses effecteurs (p115 serait donc relargué des membranes puisque son interaction avec GM130 est aussi abolie), et sa GAP, qui ne pourrait plus catalyser l'hydrolyse du GTP et donc la dissociation des membranes de Rab1. Son état nucléotidique n'ayant pas été déterminé, il est aussi possible que Rab1 exagérément associé aux membranes soit essentiellement sous sa forme liée au GDP.

GRASP65 est elle aussi phosphorylée, c'est même la phosphoprotéine mitotique majeure de l'appareil de Golgi (Barr et al. 1997□Diao et al. 2003). L'identité d'une kinase phosphorylant GRASP65 a été obtenue dans le système semi-in vitro de l'équipe de V. Malhotra (Lin et al. 2000□Sutterlin et al. 2001)□la polo-kinase 1, dont l'action est nécessaire au désassemblage mitotique de l'appareil de Golgi dans ce système (même si d'autres cibles encore inconnues de cette kinase pourraient être aussi mises en jeu). Ces phosphorylations

⁵³ mais l'expression de cette construction in vivo n'est pas concluante□elle n'empêche pas la

n'inhibent pas pour autant l'interaction GRASP65-GM130, et donc ne contribuent probablement pas à l'inhibition du processus d'arrimage. En revanche elles pourraient contribuer au désempilement des citernes, puisque GRASP65 est le facteur membranaire qui a été spécifiquement identifié comme jouant un rôle dans l'empilement des citernes en fin de mitose. Cette hypothèse est renforcée par le fait que GRASP55, elle aussi impliquée dans le ré-empilement des citernes, est phosphorylée par ERK2 (Jesch, Lewis et al. 2001). Rappelons que GRASP65 a été initialement décrit comme accessible au cytosol uniquement en mitose, mais que paradoxalement son interaction avec GM130 (et donc son accessibilité à GM130) semble maintenue tout au long du cycle cellulaire.

La voie indépendante de COPI régissant la fragmentation des citernes en résidus tubulo-vésiculaires hétérogènes n'est pas aussi bien décrite. Il est possible que la relative déplétion de p97 des fragments mitotiques golgiens en soit une cause (Shorter et Warren 1999), et que cette déplétion soit due à la phosphorylation de p97 et son cofacteur p47⁵⁴ par CDK1 (Mayr et al. 1999). En effet, la voie dépendante de p97 de réassemblage des citernes pourrait essentiellement correspondre à des événements de fusion homotypique tandis que la voie dépendante de NSF pourrait correspondre à la fusion hétérotypique de vésicules COPI avec des citernes en formation (cette seconde voie met en jeu GOS28 et syntaxine 5, un couple v/tSNARE tandis que la vSNARE GOS28 n'est pas requise par la voie p97) (Rabouille et al. 1998).

La voie de transport indépendante de COPI définie par Rab6 en interphase pourrait être mise en jeu dans le processus de désassemblage du «cœur» des citernes de l'appareil de Golgi (Rab6 n'est pas phosphorylée en début de mitose et donc peut-être toujours active (Bailly et al. 1991)). La formation de fenestrations à la périphérie des citernes et de tubules les prolongeant a été observée dans un système *in vitro* de transport intra-golgien (du type de celui du groupe de J. Rothman) par incubation avec un cytosol déplété de Arf1/COPI, des conditions qui sont d'ailleurs compatibles avec un transport intra-Golgi fonctionnel (Happe et Weidman 1998). Donc la fission de membranes golgiennes entraîne la formation de vésicules COPI sous l'action de Arf1/COPI et de tubules émergeant des extrémités fenêtrées des

fragmentation de l'appareil de Golgi (Martin Lowe, communication personnelle)

⁵⁴ Une étude très récente montre que la phosphorylation de p47 en début de mitose est nécessaire au désassemblage de l'appareil de Golgi *in vivo* l'expression d'un mutant non-phosphorylable de p47 est suffisante pour empêcher le désassemblage des empilements golgiens au cours de la mitose. Ce résultat est l'une des plus belles confirmations *in vivo* des prédictions des systèmes *in vitro*, et de plus il relativise l'importance des stratégies d'héritage

citernes par un mécanisme indépendant de COPI mais peut-être dépendant de Rab6, dans le système de transport intra-Golgi comme très probablement dans celui de désassemblage mitotique de l'appareil de Golgi.

Le système de cellules MDCK semi-perméabilisées et incubées avec un extrait d'œufs de *X. laevis* physiologiquement synchronisés a permis de révéler les actions successives de deux kinases, MEK1 et CDK1, dans le processus de fragmentation mitotique de l'appareil de Golgi (Kano et al. 2000). Les rôles respectifs de ces deux kinases avaient été précédemment établis dans les systèmes de V. Malhotra et G. Warren, mais ces deux systèmes ne mettaient en évidence le rôle que d'une seule des deux kinases. Dans le système de cellules NRK semi-perméabilisées à la digitonine (puis lavées avec un tampon à 1M KCl) et incubées avec un cytosol «mitotique», l'appareil de Golgi se fragmente en mini-empilements de citernes mais ne produit pas de vésicules isolées, et donc ce système rend compte probablement uniquement de la première étape de désassemblage de l'appareil de Golgi, ce qui expliquerait qu'il ne mette en évidence que l'activité de MEK1 (Acharya et al. 1998). Le système in vitro de G. Warren met en lumière l'action de CDK1 uniquement et dans ce système la seconde étape de désassemblage est reproduite (Lowe, Rabouille et al. 1998). Il est plus difficile de comprendre l'absence de fonction de MEK1 dans ce système. Peut-être le Nocodazole présent dans l'extrait «mitotique» perturbe-t-il son action. Comme nous l'avons vu, des cibles de CDK1 ont été caractérisées et l'action de cette kinase affecte au moins le complexe d'arrimage et la machinerie de fusion. MEK1 serait quant à elle activée par Raf1 sur l'appareil de Golgi en prophase (Colanzi et al. 2003). En revanche l'action de MEK1 reste très obscure, aussi bien du point de vue des cibles de la machinerie de transport golgien que de celui du substrat (qui semble n'être ni ERK1 ni ERK2, les deux seuls substrats connus de MEK1) (Colanzi et al. 2000).

des membranes golgiennes en mitose□elles peuvent rester complètement intactes sans que leur héritage ou le déroulement de la mitose ne soient altérés (Uchiyama et al. 2003).

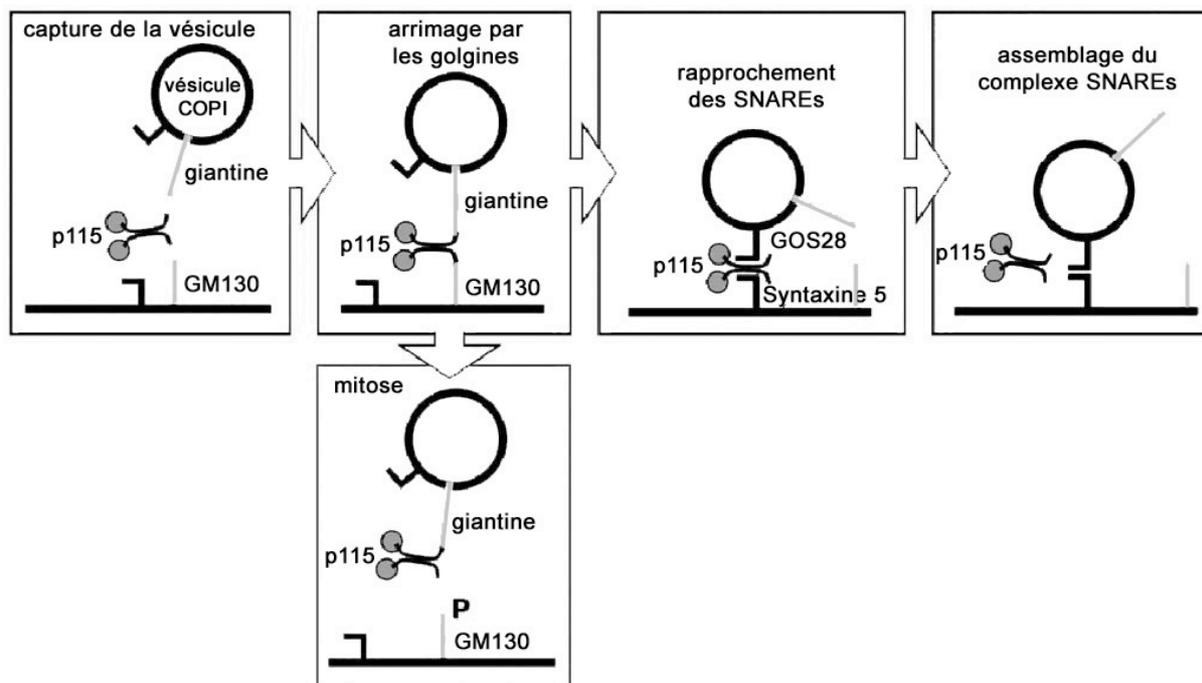


Figure 12. Mécanismes proposés de fusion des vésicules péri-golgiennes avec les citernes, et leur inhibition en mitose (Shorter et Warren 2002). p115, faisant le lien entre GM130 sur la citerne et la Giantine sur la vésicule, permet d'abord la phase d'arrimage, puis catalyse l'étape d'amarrage dépendante des SNAREs. Ce processus permet la reformation de l'appareil de Golgi en fin de mitose. La phosphorylation de GM130 en début de mitose rompt son interaction avec p115, ce qui empêche l'étape d'arrimage, inhibe la fusion vésicule/citerne et au final provoque la fragmentation de l'appareil de Golgi.

1.B.3. Appareil de Golgi et contrôle mitotique

Un dernier aspect intéressant de la problématique concernant l'héritage de l'appareil de Golgi en mitose est la découverte récente d'un lien possible entre l'appareil de Golgi et le contrôle de la mitose. Deux études ont montré qu'en empêchant la fragmentation de l'appareil de Golgi lors de l'entrée en mitose en bloquant par exemple le transport rétrograde, des défauts de karyocinèse voire un bloc de l'entrée en mitose ont été observés.

Ces observations ne sont pas réellement surprenantes si l'on considère que certaines protéines jouant un rôle majeur dans le déroulement de la mitose sont localisées sur l'appareil de Golgi en interphase, telle la cycline B2 (Jackman et al. 1995 □ Draviam et al. 2001). Une étude non-publiée a même fait l'inventaire des protéines golgiennes en interphase et qui ont un rôle bien établi dans le déroulement de la mitose, comme la myosine II (au niveau de l'anneau de contraction en cytokinèse) ou Rabkinésine6 (au milieu du pont intercellulaire en cytokinèse) par exemple (N. Altan, J. Lippincott-Schwartz, communication personnelle).

Le rôle de GRASP65 dans le contrôle mitotique a été révélé par l'inhibition d'entrée en mitose induite par l'injection d'un anticorps anti-GRASP65 ou du peptide contre lequel l'anticorps est dirigé (ce peptide correspond à un domaine de GRASP65 ne contenant ni le site de liaison de GM130 ni les sites de phosphorylation caractérisés) (Sutterlin et al. 2002). Cette inhibition d'entrée en mitose serait due à un blocage de la fragmentation de l'appareil de Golgi et la relocalisation de l'essentiel de ses composants à distance du centrosome. En effet si l'appareil de Golgi est désassemblé préalablement par traitement avec la Bréfedine A ou par dépolymérisation des microtubules par traitement avec le Nocodazole, l'anticorps anti-GRASP65 et le peptide n'ont plus d'effet inhibiteur sur l'entrée en prophase (et dans le cas de la BFA la mitose s'effectue normalement jusqu'à son terme). Aucun mécanisme n'a été proposé, mais il semble que cette protéine golgienne puisse intervenir dans un processus de type «point de contrôle». Au cours d'un crible *in vivo* chez *S. cerevisiae* de peptides inhibiteurs du *spindle assembly checkpoint*, l'homologue potentiel de GRASP65, Grh1p, a été identifié en tant que cible d'un tel peptide, et son rôle dans le contrôle mitotique confirmé par délétion du gène chez *S. cerevisiae* (Norman et al. 1999).

Il est tout à fait possible que l'injection d'anticorps anti-GRASP65 induirait un bloc dans des étapes plus tardives en mitose, ce qui serait visible dans des lignées ayant perdu ce premier point de contrôle et conservé les éventuels suivants (la perte de points de contrôle étant probablement de fréquence élevée, croissant au fur et à mesure des passages, dans les lignées cellulaires immortalisées en culture). Un tel résultat serait en accord avec l'étude menée au laboratoire sur le rôle de Rab6 et de sa protéine activatrice GAPCenA dans le contrôle de la mitose, et à laquelle j'ai participé en mettant au point les méthodes de déplétion spécifiques des isoformes de Rab6 par siRNA (voir partie Résultats). Nous avons en effet observé qu'il était possible de dépler spécifiquement chacun des deux isoformes Rab6A et Rab6A' bien qu'ils soient issus de l'épissage alternatif d'un même gène et ne diffère que par un exon (soit trois acides aminés). La déplétion de Rab6A' induit une mort cellulaire en métaphase (voir partie Résultats), et ce type de phénotype est aussi observé sous l'effet de mutants de Rab6 et de perturbation de GAPCenA ou de l'effecteur de Rab6 Rabkinésine6. Cette mort cellulaire pourrait être due à un mauvais fonctionnement d'un point de contrôle comparable à celui où GRASP65 est actif⁵⁵. De plus GAPCenA est l'homologue mammifère

⁵⁵ en particulier parce qu'une inhibition d'entrée en mitose (ralentissement ou blocage de la phase S) est aussi observée

proposé pour la protéine de contrôle mitotique de *S. cerevisiae* Bub2p⁵⁶, comme elle associée au centrosome. Si la proximité des membranes golgiennes et du centrosome est un facteur qui contrôle l'entrée en mitose et son déroulement correct (Sutterlin et al. 2002), alors ce lien pourrait dépendre de l'interaction (suggérée par un crible double-hybride) entre Rab6 à l'appareil de Golgi et GAPCenA au centrosome.

Ces données très récentes méritent des études plus approfondies pour conclure sur l'existence de *checkpoint* contrôlés par des protéines golgiennes, il est aussi possible qu'une altération de l'appareil de Golgi en interphase ait des répercussions indirectes sur le déroulement de la mitose. Toutefois dans le cas de Rab6, il est déjà établi que son effecteur Rabkinésine6 joue un rôle dans la cytokinèse (Hill et al. 2000 □ Fontijn et al. 2001), et donc il est possible que Rab6 contrôle la mitose à différentes étapes⁵⁷, depuis son initiation jusqu'à sa conclusion. De plus, la déplétion de Rab1 (qui contrôle le transport RE-Golgi et pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de désassemblage et réassemblage de l'appareil de Golgi) par siRNA dans des cellules de mammifères bloque aussi la progression des cellules à travers leur cycle⁵⁸. Il est possible que plusieurs Rabs golgiennes contrôlent le cycle cellulaire en plus de leur fonction dans transport membranaire.

I.B.4. Trafic et cytokinèse

La cytokinèse des cellules animales peut se décomposer en deux événements successifs □ la formation du pont intercellulaire et l'abscission. L'origine des membranes composant le pont intercellulaire n'est pas clairement caractérisée. Une hypothèse est que comme dans le cas de la cytokinèse des plantes, qui voit la formation d'une paroi entre les cellules-filles, la sécrétion selon la voie classique antérograde est utilisée (Bednarek et Falbel 2002). L'appareil de sécrétion et en particulier l'appareil de Golgi est polarisé grâce à un ré-arrangement du cytosquelette de microtubules vers le site de formation de la paroi. Par conséquent l'appareil

⁵⁶ Bub2p est la GAP, localisée au centrosome, de la GTPase Tem1p, qui coordonne le réseau de sortie de mitose (*mitotic exit network*, MEN), un système similaire à celui existant chez *S. pombe* et qui y contrôle la septation (*septation initiation network*, SIN). Dans le MEN et le SIN, la GAP présente de grandes similitudes de séquences avec GAPCenA (Bardin et Amon 2001).

⁵⁷ Le rôle de Rab6 dans les phases finales de la division chez *T. gondii* a été récemment proposé (Stedman et al. 2003).

⁵⁸ Les cellules cessent de se diviser et ne changent pas de taille pendant plusieurs jours (F. Barr, communication personnelle).

de Golgi pourrait jouer un autre rôle essentiel pour l'accomplissement de la mitose, cette fois-ci directement relié à sa fonction en interphase dans le transport membranaire.

L'isolation de mutants de gènes classiquement impliqués dans le transport présentant des défauts de cytokinèse a été réalisée dans plusieurs organismes, en particulier *D. discoideum* (qui se prête particulièrement bien à l'étude de la cytokinèse), *S. cerevisiae*, *C. elegans* et *D. melanogaster* (O'Halloran 2000 □ Finger et White 2002). Ces mutants correspondent à des fonctions connues dans la voie de sécrétion et dans la voie d'endocytose. Le rôle de la sécrétion dans la cytokinèse est suggéré par des mutants de tSNAREs de l'appareil de Golgi (Xu, Brill et al. 2002) et de la membrane plasmique (Burgess et al. 1997), de septines, protéines essentielles à la cytokinèse et qui interagissent avec les tSNAREs (Beites et al. 1999) et le complexe exocyste⁵⁹ (Vega et Hsu 2003), l'effet de la déplétion par RNAi de certaines de ces protéines (Jantsch-Plunger et Glotzer 1999) et l'inhibition provoquée par traitement avec la BFA dans certains cas. Le rôle de l'endocytose est suggéré par des mutants de la dynamine (Wienke et al. 1999), de la clathrine (Niswonger et O'Halloran 1997), et la localisation de ces protéines et de l'adaptateur de clathrine AP2 au niveau du fourreau intercellulaire (Dornan et al. 1997).

En fait les mécanismes de la cytokinèse diffèrent selon le modèle étudié. Par exemple la cellularisation dans les embryons de *D. melanogaster* nécessite clairement la sécrétion polarisée de membranes pour former les cellules autour des noyaux du syncytium (Lecuit et Wieschaus 2000 □ Sisson et al. 2000), tandis que la BFA n'a pas d'effet sur la cytokinèse dans les embryons d'oursins de mer (Conner et Wessel 1999). Si un apport de membrane pour délimiter les deux cellules-filles en particulier au niveau du pont est toujours nécessaire, l'origine de ces membranes ajoutées dépend du système. Elles proviennent soit du trafic antérograde post-golgien, soit d'un recyclage depuis les endosomes, comme le suggère l'effet inhibiteur du RNAi de Rab11 dans des embryons de *C. elegans* (Skop et al. 2001). Probablement ces deux sources de membranes sont utilisées en parallèle dans la plupart des systèmes, et leur importance varie en fonction du type cellulaire. En revanche le rôle de l'endocytose semble plus général, même si sa fonction dans la cytokinèse n'est pas a priori évidente. En fait la constriction qui mène à la formation du pont et l'augmentation de la tension des membranes formant le pont nécessitent le retrait de membranes au niveau de la membrane plasmique. Des mécanismes d'endocytose peuvent aussi être requis pour la fission membranaire au moment de l'abscission (la dynamine est extrêmement enrichie sur le

⁵⁹ dont la fonction est nécessaire pour la cytokinèse (Wang et al. 2002)

midpiece, la région très dense en protéines au centre du pont où la rupture s'effectue, M. Mc Niven, communication personnelle).

En résumé, le rôle de la sécrétion polarisée et donc de l'appareil de Golgi dans la cytokinèse est clair chez les plantes et en général les cellules qui sont entourées d'une paroi, mais pas systématique dans les cellules animales. L'endocytose, le recyclage de membranes depuis les endosomes et les déformations purement dues au cytosquelette sont parfois suffisantes, tant que la surface de la membrane qui délimite les cellules est compatible avec leur survie. Par exemple, les cellules de mammifères en culture sont capables de se séparer au moment de la cytokinèse selon un mode qui semble régulé et physiologique aussi bien que selon un mode apparemment mécanique de traction sur le pont, les deux cellules-filles migrant en sens opposés jusqu'à ce que le pont casse (Piel et al. 2001).

I.C. Antibody Phage Display

La dernière partie de l'introduction est consacrée à la présentation de la technique de sélection *in vitro* de fragments d'anticorps recombinants présentés à la surface de phages, ou *Antibody Phage Display*. Le développement de cette technique et son utilisation dans le cadre de la biologie cellulaire constituent en quelque sorte l'originalité de ma thèse—comme nous le verrons, cette technique a été créée il y a quelques années, et ses applications ont été démontrées peu après. Mes travaux ont consisté à pousser plus avant les méthodes de sélection *in vitro* et développer une utilisation nouvelle des anticorps recombinants en tant que sondes pour imager la dynamique des molécules dans les cellules vivantes (voir partie Résultats).

Nous allons d'abord aborder le principe général des méthodes de présentation de protéines à la surface de phages en vue de leur sélection *in vitro*. Ensuite nous aborderons plusieurs points-clés de cette technique dans le cas où les protéines présentées sont des fragments d'anticorps d'une banque combinatoire. Finalement, je vais présenter les nouvelles possibilités offertes par cette technique (en plus de ses avantages en termes de coûts et de rapidité)—la production d'anticorps très difficiles à obtenir par les méthodes traditionnelles d'immunisation d'animaux, et leur versatilité découlant de leur caractère recombinant.

I.C.1. *Principe*

La présentation de peptides à la surface de phages (*Phage Display*) fait partie d'une famille de techniques permettant de manipuler simultanément une protéine et la séquence nucléotidique correspondante. L'application majeure consiste à sélectionner, au sein d'une banque aléatoire, une protéine pour son affinité de liaison à une entité donnée et de disposer immédiatement de la séquence qui l'encode afin de le produire et de le manipuler à volonté. Ces techniques de *Display* permettent d'une manière générale de sélectionner les caractéristiques d'une séquence peptidique en utilisant la sensibilité des méthodes d'amplification des séquences nucléotidiques⁶⁰.

⁶⁰ Typiquement, l'identification par spectrométrie de masse d'une protéine, méthode actuellement la plus sensible, requiert une femtomole, soit 10^8 molécules. En revanche, l'amplification des séquences nucléotidiques, peut être effectuée à partir d'une seule molécule, soit par PCR (dans des conditions optimales), soit en utilisant un virus (l'infectiosité des phages est pratiquement de 100%).

Plusieurs techniques permettent de manipuler simultanément une protéine et la séquence nucléotidique codante correspondante. Toutes ces techniques reposent sur un lien physique entre la protéine et l'ADN qui le code.

Dans la technique de *Phage Display* (Smith 1985□McCafferty et al. 1990□Scott et Smith 1990□Smothers et al. 2002), la protéine, fusionnée à une protéine de surface d'un phage filamenteux, est présentée à la surface de ce phage. A chaque fois que la protéine est sélectionnée, l'ADNc codant pour cette protéine, contenu dans la capsidie du phage, est lui aussi sélectionné. Dans la technique de *Ribosome Display* (Hanes et Pluckthun 1997□Hanes et al. 1998□Schaffitzel et al. 1999), la protéine est présentée par un ribosome encore lié à l'ARN messenger correspondant⁶¹. Dans les deux cas, des techniques de base de biologie moléculaire permettent de «passer» du complexe protéine-séquence nucléotidique (ARN ou ADN) à l'ADNc isolé. Le *Phage Display* repose sur l'infection de bactéries lors de laquelle le phage injecte le plasmide qu'il contient dans une bactérie, qui peut alors être utilisée pour produire un tel phage. Pour le *Ribosome Display*, des réactions in vitro de transcription/traduction d'une part et de transcription inverse d'autre part permettent de passer du plasmide d'ADN au complexe ARN-ribosome-protéine. D'autres techniques de *Display* ont été mises au point, parmi lesquelles le *Yeast Display* (Feldhaus et al. 2003), qui repose sur la présentation d'une protéine à la surface de levures qui contiennent la séquence nucléotidique de la protéine qu'elles présentent. Cette technique présente l'avantage que la protéine présentée subit de plus les modifications post-traductionnelles naturelles de la protéine (dans le cas d'une banque de protéines d'origine eucaryote) dans l'appareil sécrétoire des levures.

Pour le *Phage Display*, la manipulation des plasmides dans la bactérie limite le nombre de clones indépendants gérable en laboratoire à 10^9 ou 10^{10} (une culture exponentielle «D.O.=0,5» de 10^9 clones représentés chacun 1000 fois correspond à un volume de 2 litres), voire 10^{11} en conditions industrielles, et par conséquent cette technique ne permet pas de cribler des banques de 10^{13} à 10^{15} clones. Dans le cas du *Yeast Display*, ce nombre est logiquement trois ordres de grandeur plus petit, typiquement équivalent à la taille maximale des banques utilisables pour la technique de double-hybride (environ 10^6 à 10^7 clones indépendants). En comparaison, le *Ribosome Display* présente l'avantage d'être effectué uniquement in vitro, et permet de cribler des banques de diversité illimitée en théorie (limitée à 10^{12} en pratique pour le moment).

Un autre avantage majeur du *Ribosome Display* est l'absence de biais de sélection «*in vivo*» puisque la sélection s'effectue intégralement *in vitro*. Lors de la phase d'amplification d'un crible de Phage Display, certains clones sont plus ou moins toxiques pour les bactéries qui les produisent. Ainsi, le biais de sélection n'est pas uniquement lié à l'affinité différentielle des peptides pour la cible, mais aussi à la facilité de les produire dans la bactérie⁶². Le *Ribosome Display* ne présente pas ce type de biais, tous les clones sont transcrits, traduits puis rétro-transcrits de manière indistinguable a priori.

Cependant, dans certains cas, le crible d'une banque moins diverse peut être compensé par une étape successive de mutagénèse⁶³ des variants obtenus suivie d'une nouvelle phase de sélection. Dans le cas où les protéines présentées sont des anticorps, ce processus mime celui de maturation des anticorps par mutagénèse (*affinity maturation*), qui permet d'augmenter l'affinité de ces anticorps (Figure 14) (Hoogenboom 1997).

I.C.2. Cas particulier du Phage Display d'anticorps

Dans la suite, nous allons nous concentrer sur ce cas particulier de la présentation d'anticorps à la surface de phages en vue de leur sélection *in vitro* à partir de banques combinatoires (McCafferty et al. 1990□Clackson et al. 1991□Hoogenboom et Winter 1992□Griffiths et al. 1993□Griffiths et al. 1994□Vaughan et al. 1996□Hoogenboom 1997).

Cette méthode a été mise au point au début des années 1990 dans le laboratoire de G. Winter, rapidement après celle du *Phage Display* de protéines. En 1985, le groupe de G. Smith a d'abord démontré que la présentation d'une protéine à la surface d'un phage contenant la séquence encodant cette protéine n'affecte pas l'infectiosité du phage et donc permet de manipuler simultanément une protéine et le cDNA correspondant (Smith 1985). Dans cette étude pionnière, l'endonucléase EcoRI a été présentée à la surface d'un phage en fusion avec la protéine de surface de M13 pIII, et ce phage-EcoRI a été enrichi plus de mille fois au sein d'une population de phages non-spécifiques par affinité sur un support recouvert d'un anticorps anti-EcoRI. La première stratégie de sélection par *Phage Display* à partir d'une banque a été ensuite réalisée par le groupe de G. Smith en 1990 (Scott et Smith 1990). Dans

⁶¹ Ce complexe ARNm-ribosome-peptide est obtenu grâce à l'absence de codon-stop ou bien la présence de puromycine en 3' de l'ARNm.

⁶² En réalité, il est aussi préférable de sélectionner des anticorps faciles à produire dans la bactérie, et ce biais n'est pas complètement gênant.

⁶³ par irradiation des bactéries aux UV dans le cas du *Phage Display*, en utilisant une ADN-polymérase peu fidèle dans le cas du *Ribosome Display* ...

cette seconde étude, une banque de peptides présentés à la surface de phages de diversité théorique 10^7 a été criblée contre des anticorps monoclonaux dirigés contre la myohemerythrine. L'épitope de ces anticorps était déjà connu, et la forte similitude entre sa séquence et les séquences des peptides sélectionnés a démontré la puissance de cette technique. La même année, le groupe de G. Winter démontrait la possibilité de présenter un fragment d'anticorps à la surface d'un phage en conservant les propriétés de cet anticorps, et la possibilité de l'isoler par affinité à partir d'une population non-spécifique avec un enrichissement de 10^6 (McCafferty et al. 1990). L'année suivante, la première banque d'anticorps était construite et criblée par Phage Display avec succès, toujours dans le groupe de G. Winter (Clackson et al. 1991). Cette première banque a été obtenue à partir de souris immunisées contre un haptène, et les anticorps sélectionnés par *Phage Display* étaient spécifiques pour cet antigène et possédaient des affinités typiquement micromolaires.

I.C.2.a. ScFv ou Fab

Le *Phage Display* d'anticorps est en fait réalisé à l'aide de fragments d'anticorps de type Fab, Fv ou scFv, et non pas d'anticorps entiers, présentés à la surface des phages (Figure 13). Les anticorps entiers sont en effet plus contraignants à cloner, plus volumineux (ce qui complique leur présentation), et surtout la spécificité d'un anticorps est entièrement déterminée dans des régions comprises dans ces fragments.

Les fragments Fab «naturels», obtenus par protéolyse ménagée d'immunoglobulines, sont couramment utilisés en particulier dans des expériences de micro-injection d'anticorps en vue de bloquer la fonction de la protéine-cible. Les Fab recombinants sont obtenus par assemblage in vitro de la chaîne lourde tronquée et de la chaîne légère de l'anticorps d'intérêt. Ces deux chaînes sont encodées par deux séquences nucléotidiques distinctes, transcrites et traduites indépendamment. La difficulté essentielle repose sur la manipulation de deux séquences ADN et ensuite l'assemblage délicat in vitro, en particulier à la surface du phage, des deux chaînes en un fragment Fab correctement replié. De plus ces fragments Fabs sont en général difficile à produire et souvent dégradés. Il n'en reste pas moins que de très bonnes banques ont été construites et que l'affinité finale des Fab semble meilleure que celle d'autres fragments plus courts.

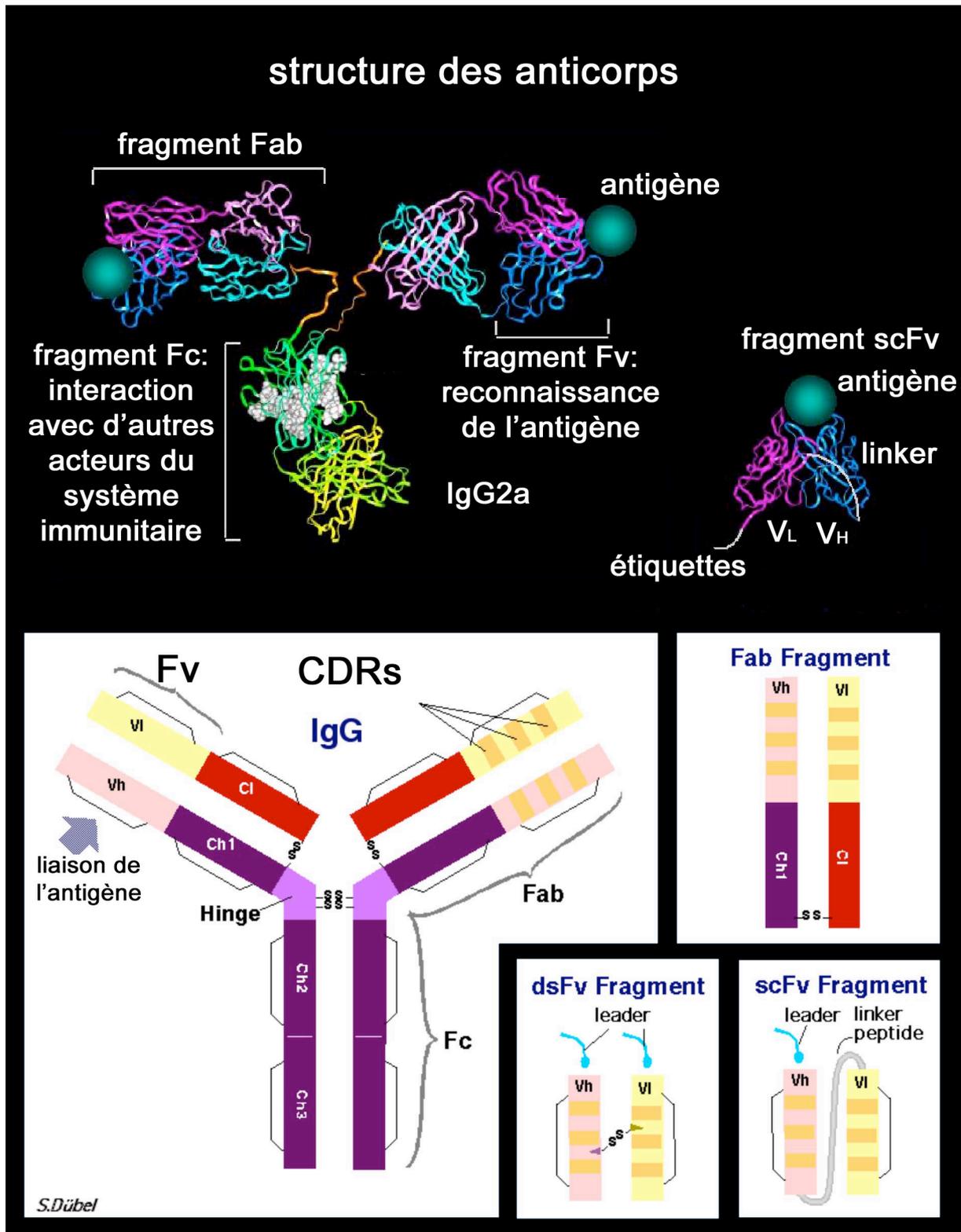


Figure 13. Structure des anticorps et des fragments d'anticorps. Le site de liaison de l'antigène est contenu au sein des fragments Fab et aussi de fragments plus courts les Fv. Ces fragments Fv contiennent les régions hypervariables nommées CDR, responsables de la spécificité de l'anticorps. En bas à droite, l'assemblage d'un fragment Fv en simple chaîne scFv est représenté.

Les fragments scFvs constituent une alternative de choix □ ils sont les fragments les plus petits contenant toute l'information nécessaire pour assurer la spécificité d'un anticorps, c'est-à-dire l'extrémité des bras, la partie de l'anticorps qui interagit avec l'antigène⁶⁴. Une séquence nucléotidique unique permet de les exprimer en tant que fusion du fragment Fv de la chaîne lourde (V_H) et du fragment Fv de la chaîne légère (V_L) reliés par un court lien peptidique flexible (*linker*), on parle alors de scFv (*single chain Fv*). Ces fragments scFvs sont donc aisés à manipuler, beaucoup plus petits que les Fabs, donc plus faciles à présenter correctement et plus stables. Leur utilisation est de plus en plus courante, il est possible de cloner un anticorps monoclonal obtenu chez l'animal dans ce format scFv⁶⁵.

I.C.2.b. Importance des CDRs

L'information déterminant la spécificité d'un scFv n'est pas répartie de manière homogène le long de sa séquence. La structure des anticorps est bien connue, et au niveau des fragments scFvs on peut distinguer les régions de type structurale (*framework*) des régions conférant à elles seules la spécificité des anticorps, les CDRs (*Complementary Determinant Regions*), le plus important étant le CDR3. Cette dichotomie est tellement marquée qu'il est parfois possible d'utiliser une banque ne contenant qu'un seul «*framework*» et des CDRs aléatoires (Desiderio et al. 2001). De nombreuses recherches ont été effectuées et sont en cours pour déterminer quel CDR3 (celui du V_H ou du V_L) est plus «*déterminant*» que l'autre, dans quel ordre il est préférable de cloner les fragments Fv dans la chaîne polypeptidique (V_H - V_L ou V_L - V_H), s'il ne serait pas mieux d'utiliser uniquement des régions «*framework*» propres uniquement aux V_H pour les deux fragments Fv du scFv ... En fait, les résultats obtenus suggèrent que ces régions Fv et surtout les CDRs (en particulier le CDR3) des anticorps déterminent la spécificité et l'affinité des anticorps, et que les régions «*framework*» et même l'architecture globale des anticorps entiers ne jouent au final qu'un rôle secondaire.

I.C.2.c. Banques

⁶⁴ c'est le fragment Fv, constitué d'un fragment de la chaîne lourde et d'un fragment de la chaîne légère reliés par un pont di-sulfure.

⁶⁵ Les applications que je décris à la fin de ce chapitre concernent aussi (et en général ont été d'abord développées avec) ces scFvs obtenus à partir d'anticorps produits chez l'animal.

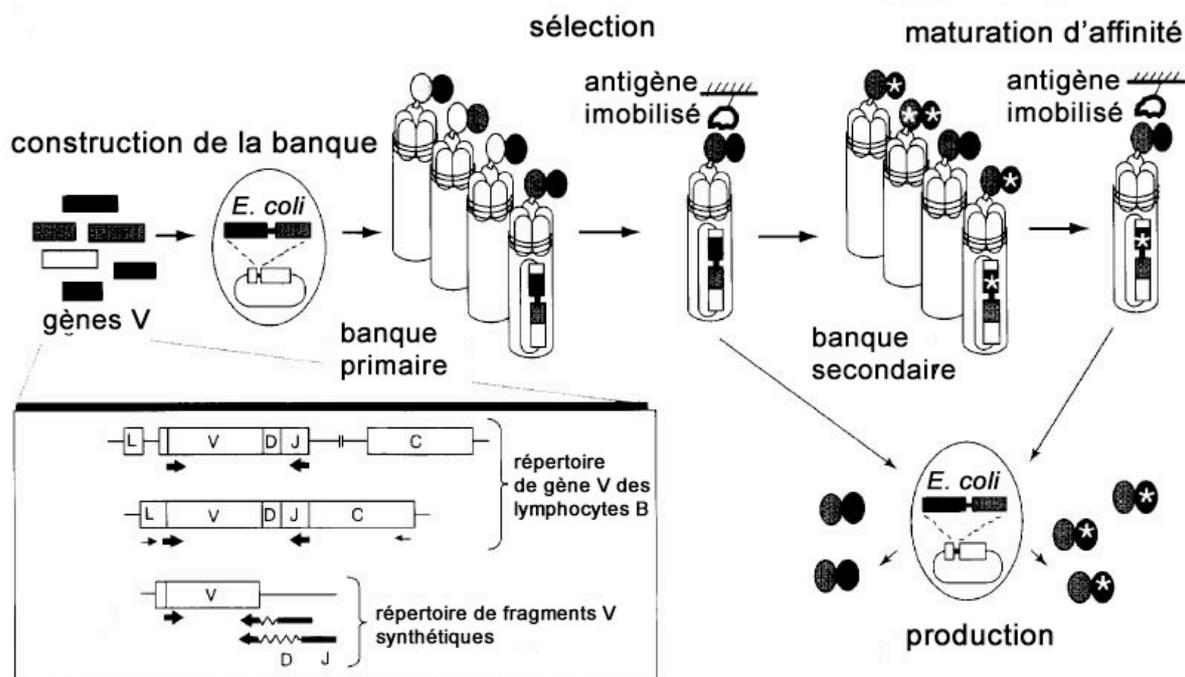


Figure 14. Construction et utilisation d'une banque d'Antibody Phage Display (Hoogenboom 1997). Les ARNm des fragments Fv sont amplifiés à partir de lymphocytes de donneurs sains par PCR, assemblés en scFv puis introduits dans *E. coli*. Les phages-anticorps sont alors produits et sélectionnés in vitro, et les phagemides récupérés dans *E. coli*. Une phase supplémentaire de maturation d'affinité par mutagenèse permet d'augmenter l'affinité des anticorps sélectionnés.

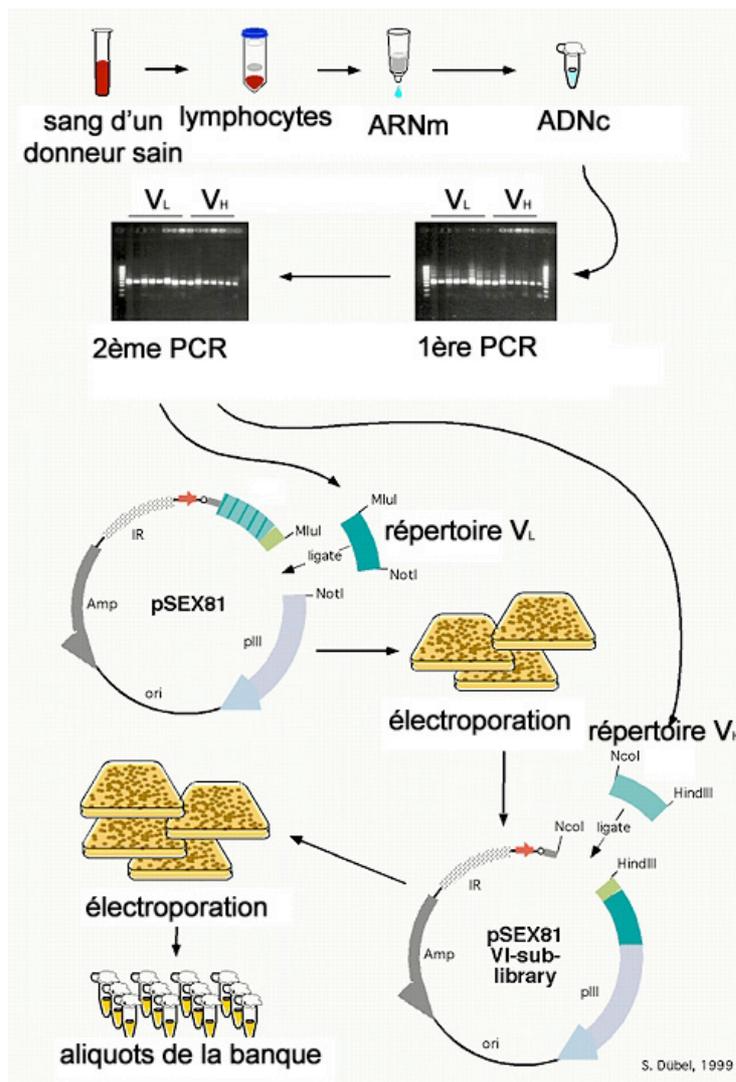


Figure 15. Une méthode de construction d'une banque d'Antibody Phage Display.

Les fragments Fv, V_H et V_L, sont amplifiés par PCR à partir des lymphocytes des donneurs sains, puis introduits dans un phagème au sein de bactéries *E. coli* par deux électroporations successives.

L'ingrédient critique de tout crible de *Phage Display* d'anticorps est la banque aléatoire d'anticorps. De nombreuses banques ont été construites depuis le début des années 1990, quand la technique de Phage Display est apparue. Certaines banques ont été réalisées à partir de lymphocytes isolés depuis des animaux préalablement immunisés contre l'antigène d'intérêt par exemple dans la première étude présentant cette technique, une banque a été construite à partir de lymphocytes de souris immunisées contre un haptène (Clackson et al. 1991). Cependant les banques les plus intéressantes sont les banques naïves, celles qui permettent d'obtenir des anticorps dirigés contre n'importe quel antigène, et celles-ci sont construites à partir de lymphocytes d'animaux ou d'humains sains (Griffiths et al. 1994 Vaughan et al. 1996).

Historiquement, l'affinité et la spécificité moyennes des anticorps obtenus par *Phage Display* ont été considérablement accrues au fur et à mesure que les banques développées ont été plus diverses. Il est clair que plus une banque contient de clones indépendants, plus il y a

de chance qu'elle contienne des anticorps spécifiques pour un antigène donné, et plus il y a de chances que leur affinité soit grande (Griffiths et al. 1994). Les banques naïves initiales obtenues à partir de lymphocytes B humains, par combinaison aléatoire des V_H et V_L de deux humains sains, contenaient environ 10^7 clones différents (Griffiths et al. 1993). Les affinités des anticorps obtenus à partir de ces banques sont typiquement micromolaires, ce qui limite l'utilisation de ces anticorps. C'est pourquoi initialement la méthode souvent préférée consistait à construire une banque immune à partir d'un animal immunisé, de façon à disposer dans un premier temps du répertoire immun de cet animal pour sélectionner un répertoire restreint de lymphocytes contenant les anticorps intéressants, et de sélectionner les meilleurs d'entre eux par *Phage Display* (les affinités ainsi obtenues sont nettement meilleures que celles obtenues à partir des banques naïves initiales). Des banques naïves plus diverses ont été ensuite construites, contenant de l'ordre de 10^9 à 10^{10} clones indépendants⁶⁶ et permettant d'obtenir en routine des anticorps spécifiques d'affinités nanomolaires⁶⁷ (Griffiths et al. 1994; Vaughan et al. 1996).

La stratégie globale de construction d'une banque consiste à isoler les lymphocytes B du sang, de purifier les ARNm afin d'amplifier par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) directement les ADNc codant pour les régions V_H et V_L à l'aide d'amorces spécifiques (Figure 14). On dispose alors de répertoires de chaînes V_H et V_L qu'il s'agit ensuite d'introduire successivement dans un plasmide (phagemide) de part et d'autre de la courte séquence du linker. Plusieurs méthodes permettent de transférer les répertoires dans un même plasmide, une étape qui constitue en général l'étape limitant la diversité d'une banque (la taille des répertoires initiaux étant a priori limitée uniquement par le répertoire immun des animaux ou humains donneurs, c'est-à-dire au moins 10^{12} anticorps différents).

Les répertoires de chaînes V_H et V_L peuvent être directement assemblés par PCR et les fragments scFv résultants clonés dans un plasmide introduit par électroporation dans *E coli*. On peut aussi introduire successivement les deux répertoires dans un même plasmide (ce qui est plus efficace en pratique mais plus long) par digestions et électroporations du plasmide en deux étapes (Figure 15). Une autre stratégie consiste à introduire un des deux répertoires dans le plasmide qui est ensuite électroporé et porte deux sites de recombinaisons de type *Lox* à

⁶⁶ En particulier la banque Griffin.1 a été obtenue par sous-clonage d'une banque réalisée à partir de répertoires de plusieurs dizaines de chaînes V_H et V_L dont les CDR3 ont été rendus aléatoires par PCR puis recombinaison aléatoire dans les bactéries-hôtes à l'aide d'un système de type Cre-Lox des chaînes V_H et V_L (Griffiths et al. 1994).

⁶⁷ Par comparaison, le *Ribosome Display* d'anticorps permet en théorie de cribler des banques de 10^{13} clones et d'obtenir des anticorps d'affinités picomolaires (Hanes et al. 2000).

l'endroit où l'on désire introduire le second répertoire, infecter les bactéries portant le plasmide par un phage contenant le second répertoire flanqué de sites *Lox* et d'exprimer la recombinase *Cre* dans ces bactéries (Griffiths et al. 1994). Cette dernière technique est encore plus efficace pour transférer les deux répertoires dans le même plasmide. La diversité de la banque est donc limitée par l'efficacité de transformation ou d'infection des bactéries et la probabilité que les deux répertoires soient au final sur le même plasmide (efficacité de la PCR dans le premier cas, efficacité de la seconde électroporation dans le deuxième, de la recombinaison dans le troisième ...).

I.C.3. Pratique □ présentation à la surface des phages, sélection, élution

I.C.3.a. Choix d'une protéine de surface du phage filamenteux M13 □ pIII, pVI, pVIII, pIX

La présentation d'un peptide à la surface d'un phage filamenteux peut être réalisée par fusion de la séquence nucléotidique correspondante à celle d'une protéine de surface du phage (Kay et al. 1996). Il existe, dans le cas du phage M13, plusieurs protéines de surface, d'abondances différentes et de localisations distinctes. L'efficacité de la présentation d'un peptide en fusion avec ces différentes protéines a été évaluée et continue de l'être. La présentation doit être réalisée (le peptide détectable en surface) dans des conditions qui n'affectent pas l'infectiosité du phage (et donc sa capacité à injecter l'ADN encapsidé dans la bactérie infectée). Selon les applications, il peut être préférable d'avoir un grand nombre ou un petit nombre de copies du peptide à la surface d'un phage donné, et en réalité chaque application nécessite une mise au point empirique. Toutefois, l'utilisation de la protéine pIII dans le cas du phage M13 s'est rapidement imposée comme étant de loin préférable à d'autres (comme la protéine pVIII) pour la présentation efficace de fragments d'anticorps⁶⁸, même si récemment des banques en fusion avec les protéines pVII et surtout pIX ont donné des résultats prometteurs (Gao et al. 2002).

I.C.3.b. Phage ou phagemide □

⁶⁸ et de protéines en général, tandis que pVIII, davantage représentée à la surface des phages, convient dans le cas de peptides

Si un phage est utilisé, la séquence codant chacune des protéines de la banque est fusionnée à celle d'une protéine de surface du phage (en général la protéine pIII) au sein du génome du phage M13. Toutes les protéines pIII de chaque phage présenteront chacune la protéine.

Dans le cas du phagemide, la séquence de chacune des protéines est contenue dans un plasmide en fusion avec celle d'une protéine de surface (pIII), ce plasmide portant une séquence de résistance à un antibiotique. Ce plasmide contient aussi les séquences permettant la répllication «simple brin» par les protéines du phage M13 et l'encapsidation subséquente (Kay et al. 1996). Ce vecteur se comporte donc comme un plasmide dans une bactérie non-infectée. Il se comporte en génome phagique (du point de vue de l'encapsidation) en présence des autres protéines du phage M13, quand la bactérie qui le contient est infectée par un phage M13. On parle donc de phagemide.

Lors de la sélection, la bactérie produit la protéine de fusion et est infectée par un phage auxiliaire dit «*helper*», qui injecte son génome et donc fournit à la bactérie de quoi produire des phages complets avec un nombre variable de peptides présentés à leur surface. En effet, un même phage est assemblé d'une part à l'aide de protéines de surface provenant du génome du phage *helper* et d'autre part à l'aide de protéines de surface recombinantes (en fusion avec la protéine) provenant du phagemide. Le phagemide porte un signal d'emballage par la capsid beaucoup plus efficace que celui porté par le génome du phage *helper*, et donc tous les phages produits par la bactérie contiennent le phagemide correspondant à la protéine qu'ils présentent à leur surface et non pas le génome du phage *helper*. De plus le phage *helper* confère à la bactérie infectée la résistance à un second antibiotique, différent de celui du phagemide, ce qui permet de sélectionner les bactéries infectées portant le phagemide en utilisant simultanément les deux antibiotiques.

Au final, le phagemide est plus commode à utiliser car on ne manipule des phages que pendant les phases de sélection, et non pendant les phases d'amplification, de clonage ou d'identification où seuls des clones bactériens sont manipulés. En outre, ceci permet de moduler le nombre moyen de protéines présentées par les phages. En particulier, il est préférable que ce nombre soit petit si l'on veut sélectionner des protéines de bonne affinité, une protéine de mauvaise affinité voyant son rendement de sélection augmenter avec le nombre de copies présentes à la surface des phages.

I.C.3.c. Sélection in vitro

Une quantité très réduite de l'antigène d'intérêt (quelques centaines de ng à quelques dizaines de μg) est mise en présence des phages présentant chacun un anticorps de la banque⁶⁹ dans un tube à essai. L'antigène doit être immobilisé sur un support solide afin d'isoler les phages-anticorps liés, puis récupérer les plasmides correspondants par infection de bactéries *E. coli*.

La production de phages présentant en moyenne un anticorps à leur surface est effectuée en infectant une culture de bactéries contenant chacune un phagemide de la banque avec un phage *helper* en excès. Ces bactéries sont ensuite cultivées en présence d'antibiotiques (voir I.C.3.b.) mais sans induction, afin de ne pas obtenir de phages présentant plusieurs anticorps.

Plusieurs stratégies sont envisageables pour immobiliser l'antigène (Figures 14 et 16)□

- L'antigène peut être adsorbé sur un immunotube, puis la solution contenant les phages-anticorps de la banque peut être incubée dans ce tube.
- L'antigène peut être légèrement biotinylé, étiqueté avec la GST ou tout autre étiquette permettant sa fixation à des billes magnétiques (de taille de l'ordre du micron). L'antigène est incubé à une concentration de l'ordre de 10 nM ⁷⁰ en présence de la solution de phages-anticorps, puis récupéré sur ces billes magnétiques. Cette méthode permet de disposer d'une surface importante, d'éviter une dénaturation excessive de l'antigène. En effet, la surface totale des billes que nous utilisons en routine est de l'ordre du m^2 , celle d'un immunotube de l'ordre du cm^2 . De plus nous avons observé que les anticorps obtenus contre des protéines adsorbées reconnaissent mieux leur cible dans des conditions dénaturantes (western blot) tandis que ceux obtenus en solution puis sur billes magnétiques reconnaissent plus souvent leur cible dans des conditions natives (in vivo, immunofluorescence, immunoprécipitation).
- Dans le cas d'organites ou de cellules intacts, la même stratégie peut être utilisée, à la différence qu'il n'est pas gênant d'immobiliser l'organite ou la cellule sur des billes magnétiques dès l'incubation par les phages-anticorps (la concentration locale des antigènes-cibles est imposée par l'organite ou la cellule, et n'est pas modifiable). La séparation sur billes magnétiques par un aimant évite la centrifugation qui pourrait endommager l'organite ou la cellule lors des lavages.

⁶⁹ pour ne pas favoriser les anticorps de basse affinité mais présentés abondamment à la surface des phages (voir paragraphe sur le phagemide)

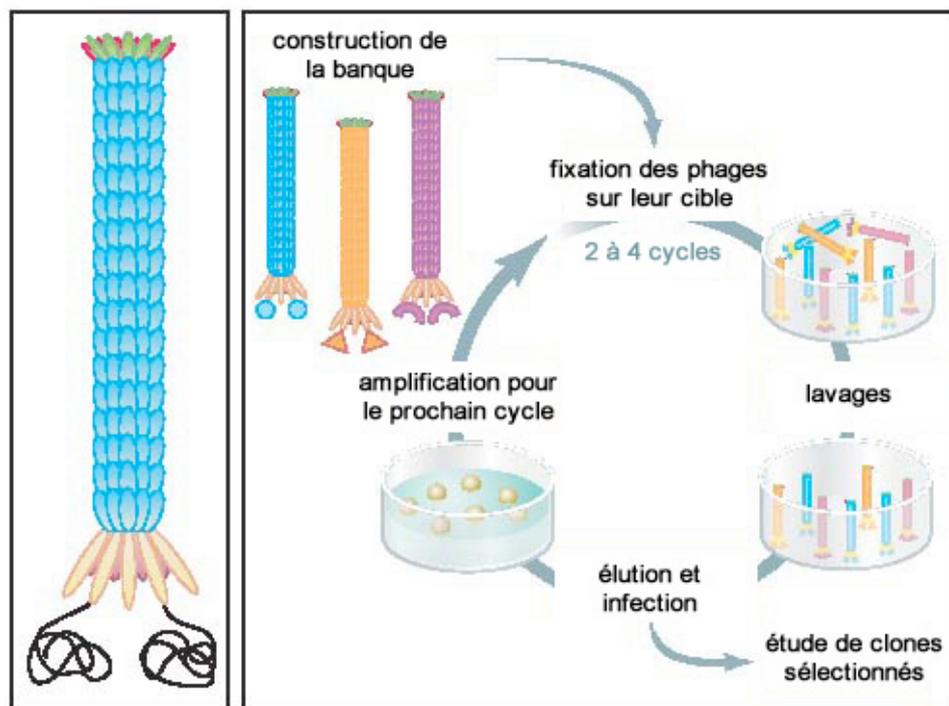


Figure 16. Cycles de sélection d'un crible d'*Antibody Phage Display* (Smothers et al. 2002). Les phages, présentant à leur surface chacun un clone d'anticorps de la banque, sont incubés en présence de l'antigène immobilisé in vitro. Après un lavage extensif, les phages liés sont élués et les phagemides correspondants récupérés dans des bactéries *E. coli* par infection. Ces bactéries peuvent être utilisées pour produire la nouvelle population de phages-anticorps pour un nouveau cycle de sélection.

L'éluat des phages-anticorps est effectuée soit par incubation dans une solution qui détruit l'interaction antigène/anticorps tout en préservant l'intégrité du phage (pH élevé par exemple), soit en présence d'une protéase qui clive le lien entre l'anticorps et le phage (ou l'anticorps lui-même), soit en présence d'un excès de l'antigène d'intérêt (voir I.C.4.a.iv.). L'éluat est ensuite utilisé pour infecter une culture de bactéries *E. coli* «vides» dans lesquelles les phagemides sont injectés par les phages sélectionnés.

Ensuite, la population de bactéries *E. coli* infectées est soit ré-amplifiée et re-sélectionnée (Figure 16), soit diluée afin d'isoler des colonies bactériennes produisant chacune un anticorps (par conséquent monoclonal).

⁷⁰ pour favoriser la sélection d'anticorps de bonne affinité (plus la concentration est basse, plus la sélection favorise les meilleures affinités)

I.C.3.c.i. Cycler la sélection pour « dépasser » le « bruit de fond »

	Phages relevants	Phages non- relevants	Population totale	Proportion de phages relevants	Rendement de sélection
Avant 1 ^{er} tour	10^6	10^{14}	10^{14}	10^{-8}	
Après 1 ^{er} tour	10^2	10^6	10^6	10^{-4}	$10^6/10^{14}=10^{-8}$
Avant 2 ^{ème} tour	10^{10}	10^{14}	10^{14}	10^{-4}	
Après 2 ^{ème} tour	10^6	10^6	10^6	50%	$10^6/10^{14}=10^{-8}$
Avant 3 ^{ème} tour	10^{14}	10^{14}	10^{14}	50%	
Après 3 ^{ème} tour	10^{10}	10^6	10^{10}	100%	$10^{10}/10^{14}=10^{-4}$

Tableau 1. Simulation d'une sélection avec un « bruit de fond » de 10^6 phages non-relevants et un rendement de 0,01% de récupération des phages relevants. Le rendement de sélection est suivi au cours des cycles les phages sont titrés par infection d'un excès de bactéries, il suffit de compter les colonies. Ce rendement permet de détecter l'enrichissement de la population en phages relevants il reste constant tant que le bruit de fond domine, et augmente soudainement (ici d'un facteur 10^4) lorsque la proportion de phages relevants dépasse celle des phages non-relevants.

Une simple « simulation » mathématique permet de comprendre la nécessité et l'intérêt de cycliser le processus de sélection-amplification (Figure 16, Tableau 1). Par exemple, supposons qu'une banque de 10^9 clones en contienne 10 d'intérêt. Après amplification initiale, il y a 10^6 clones intéressants sur 10^{14} au total en solution. Après sélection, on peut estimer par exemple que 0,01% des anticorps d'intérêt sont récupérés soit 10^2 clones, tandis qu'une proportion beaucoup plus faible d'anticorps non-relevants est récupérée. En pratique, environ 10^6 phages sont systématiquement récupérés non-spécifiquement lors des premiers cycles, ce que j'appelle ici le bruit de fond (le rendement de sélection de ces phages non-relevants est donc 10^{-8} , comparé à 10^{-4} pour les phages relevants). Une nouvelle amplification donne une population de 10^{14} clones dont 10^{10} d'intérêt. A nouveau, 0,01% de ces clones intéressants sont récupérés, soit 10^6 clones, de l'ordre du bruit de fond. Au tour suivant, l'amplification donne une population contenant une proportion importante de phages relevants, disons la moitié, et après sélection 10^{10} clones d'intérêt et 10^6 de bruit de fond.

L'évolution du rapport entre le nombre de phages injectés et le nombre de phages élus progresse de la façon suivante $10^6/10^{14}=10^{-8}$, $10^6/10^{14}=10^{-8}$, $10^{10}/10^{14}=10^{-4}$. Il est donc clair que même un très petit nombre de clones intéressants peut être isolé au sein d'une banque de diversité importante, la proportion en clones intéressants augmentant au fur et à mesure des cycles, généralement brutalement quand le bruit de fond est dépassé. Par conséquent, lors d'un

crible, il suffit de compter les phages injectés et les phages élués pour détecter l'enrichissement en clones d'intérêt par rapport au bruit de fond. Il est préférable d'arrêter la sélection dès que ce rendement augmente sensiblement, de sorte à préserver la diversité de la population. En effet, un nombre de cycles trop importants risque de ne retenir qu'un seul clone, qui peut dominer aussi bien en raison d'une affinité meilleure que, par exemple, d'une toxicité moins élevée pour la bactérie qui le produit.

I.C.3.d. Identification des clones positifs

Quand la sélection est terminée (en général quand le rendement de sélection, rapport du nombre de phages élués sur le nombre de phages introduits dans le tube, augmente sensiblement), les clones peuvent être testés de différentes manières pour leur affinité pour l'antigène d'intérêt □ ELISA, western blot, immunofluorescence ... Pour ce faire, on peut directement utiliser les phage-anticorps ou bien les scFvs, qui sont aussi sécrétés efficacement par les bactéries (une propriété que nous avons observée)⁷¹.

Ensuite, on procède au séquençage systématique des ADNc des clones positifs après purification des plasmides correspondants. Cette étape permet d'évaluer la redondance et de n'étudier que des clones uniques, ce qui constitue un gain de temps substantiel par comparaison avec les techniques classiques de production d'anticorps monoclonaux dans les souris, selon lesquelles les anticorps sont simplement criblés pour leur spécificité tout en ignorant leur redondance. Une autre méthode utilisée pour éliminer les clones redondants est la caractérisation de l'empreinte ADN (*DNA footprinting*) des scFvs, qui permet de discriminer des échafaudages différents⁷².

Une fois qu'un exemplaire de chaque catégorie de clones positifs est sélectionné, la production d'anticorps à grande échelle se fait aussi par sécrétion des scFvs dans le milieu de culture⁷³.

I.C.4. *Nouveaux anticorps, nouvelles applications*

⁷¹ Cette sécrétion des scFvs est efficace dans les souches qui suppriment le codon ambre présent entre le scFv et la protéine pIII (la suppression est seulement partielle), et est optimale après passage éventuel dans une souche de bactéries *E. coli* non-suppresseur.

⁷² mais pas deux scFvs qui ont le même échafaudage et des CDRs différents, et donc au final le séquençage est nécessaire

⁷³ Afin de permettre une purification sur colonne Ni-NTA des scFs (étiquetés poly-histidine), on fait croître les bactéries dans un milieu minimum (M9) pendant l'induction.

Dans le contexte de la biologie cellulaire, la production d'anticorps recombinants *in vitro* par Phage Display comporte plusieurs avantages en comparaison aux techniques classiques de production d'anticorps monoclonaux ou polyclonaux dans des animaux. Le *Phage Display* d'anticorps recombinants est une technique beaucoup plus rapide et beaucoup moins coûteuse, et surtout elle permet de gagner sur deux plans simultanément□ elle permet d'obtenir des anticorps qu'il est très difficile voire impossible d'obtenir chez des animaux, et les anticorps recombinants sont des outils beaucoup plus versatiles que les anticorps naturels et ouvrent ainsi la voie à de nouvelles applications.

I.C.4.a. Sélection *in vitro*□nouveaux anticorps

Parmi les possibilités de générer des anticorps difficiles ou impossibles à produire par immunisation d'animaux, il y a d'abord évidemment la sélection d'anticorps artificiels à partir de banques synthétiques (combinaisons non-naturelles de chaînes lourdes et légères, CDR3 aléatoires ...) et aussi la possibilité de produire des anticorps d'origine humaine (voir I.C.4.b.iii.). Cependant, l'avantage décisif dans le contexte de la biologie cellulaire (et de nombreux autres domaines de la biologie mais aussi de la chimie et de la physique) est le fait que la sélection soit effectuée *in vitro*. Ceci permet d'incuber la solution contenant les phages-anticorps de la banque avec un antigène de n'importe quelle nature pourvu qu'il puisse être récupéré sur un support (ou élué d'un support) dans des conditions physico-chimiques entièrement contrôlées. L'antigène peut être une protéine, éventuellement très peu immunogénique chez les animaux parce que trop conservée, ou bien transmembranaire et présentée dans son contexte natif, voire conservée dans une conformation d'intérêt. L'antigène peut aussi être une molécule en solution de nature quelconque (éventuellement toxique pour les animaux), une surface d'un solide organique ou inorganique, un nano-cristal ... Les conditions de température, de pH, oxydo-réductrices, de force saline sont ajustables à volonté (tant que l'intégrité des phages est conservée⁷⁴). De plus, l'antigène-cible ainsi que les conditions physico-chimiques de sélection peuvent être modifiés entre deux cycles de sélection successifs. Parmi les innombrables possibilités, certaines ont été réalisées et je vais en présenter ci-dessous quelques-unes.

⁷⁴ Parmi les conditions «□extrêmes□ qui n'altèrent pas l'intégrité des phages (mais probablement celle des scFvs), citons des solutions aqueuses de pH 2 ou 12, des conditions

I.C.4.a.i. Anticorps contre des protéines conservées ou toxiques pour l'animal

Il est très difficile de générer des anticorps contre des protéines très conservées au cours de l'Evolution par les méthodes classiques d'immunisation d'animaux. En effet le système immunitaire des animaux a tendance à tolérer les antigènes du non-soi qui ressemblent beaucoup à des antigènes du soi. Une solution consiste à immuniser des animaux avec un peptide plutôt que la protéine entière, et on peut ainsi déclencher dans certains cas une réponse immunitaire. De même ces techniques traditionnelles d'immunisation d'animaux ne permettent pas de produire des anticorps contre des antigènes toxiques chez l'animal. Dans le cas du *Phage Display* d'anticorps, le fait qu'une protéine soit conservée ou toxique n'importe pas, une banque naïve suffisamment diverse contient a priori des anticorps spécifiques contre n'importe quel antigène qui peuvent être isolés lors de la sélection *in vitro*⁷⁵ (voir partie Résultats).

I.C.4.a.ii. Anticorps contre des conformations, des complexes, des organites, des cellules, des tissus □ préservation de l'antigène lors de l'immunisation

Il est difficile voire impossible d'immuniser des animaux contre un antigène dans une conformation moléculaire bien précise, un antigène transmembranaire inséré dans son contexte membranaire natif (conservé lors de sa purification), ou un antigène présenté à la surface d'une cellule intacte par exemple. Rapidement après l'injection dans l'animal, ces antigènes sont extraits de leur environnement initial, dénaturés, dégradés. Lors d'une sélection *in vitro* d'anticorps par *Phage Display*, l'antigène peut être préservé dans son contexte initial, et il devient en particulier possible de produire des anticorps spécifiques d'une conformation particulière d'un antigène par exemple (voir partie Résultats).

I.C.4.a.iii. Antibody Phage Display et protéomique « □ haut débit □

La quantité d'antigène nécessaire pour effectuer une sélection d'anticorps *in vitro* est réduite (moins d'1 μg), et le support peut être de nature quelconque et sera conservé durant

dénaturantes (6 M guanidine, ou 2 M urée), ou réductrices (10 mM DTT). Les phages peuvent même être régénérés après un traitement à 1% SDS ou au phénol.

⁷⁵ Les antigènes non-accessibles à cette technique sont ceux qui sont trop hydrophobes pour être manipulés *in vitro* (perte par adsorption sur le tube à essai), les antigènes toxiques pour les phages, les protéases qui détruisent la fusion scFv-pIII-phage, les protéines de surface de phage M13 trop peu abondantes.

l'incubation. Certains groupes ont ainsi sélectionné des anticorps contre des protéines d'un extrait séparées sur gels bidimensionnels et transférées sur membrane (Liu et Marks 2000 [Liu et al. 2002]). Dans le cadre d'approches protéomiques « haut débit », cette technique permet de générer systématiquement des anticorps spécifiquement dirigés contre chacune des protéines présentes dans un échantillon d'intérêt. L'analyse par spectrométrie de masse de cette protéine séparée sur le gel bidimensionnel permet de plus de connaître immédiatement l'identité de la cible de l'anticorps. Cette méthode permet donc en principe l'identification systématique de protéines d'un extrait ou d'un mélange quelconque puis la production rapide d'anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre chacune d'elles, le tout à partir du même gel bidimensionnel.

I.C.4.a.iv. Sélection « alternée » entre cycles, élution avec compétiteurs

Un autre avantage de réaliser la sélection *in vitro* plutôt que d'immuniser un animal est de pouvoir alterner la nature de l'antigène entre deux cycles successifs. Par exemple si l'antigène d'intérêt est présent dans deux types de préparations distinctes A et B, il est possible de réaliser un crible avec un premier cycle contre une préparation A, le deuxième contre une préparation B, et d'alterner ainsi jusqu'à obtenir une population d'anticorps pertinents. Ceci a permis d'isoler des anticorps spécifiques de la forme phosphorylée d'une protéine présente dans deux échantillons distincts (Lu et Sloan 1999). Une autre possibilité consiste à sélectionner les anticorps contre la première préparation et d'éluer les anticorps avec la seconde.

I.C.4.a.v. « Pathfinder » isolation rapide de phage-anticorps dirigés contre l'environnement local de l'antigène immobilisé

Une stratégie a été récemment proposée pour sélectionner *in vitro* des anticorps dirigés contre des antigènes situés au voisinage d'une molécule donnée (molécule-appât) au sein d'un échantillon, la stratégie *Pathfinder* (Osbourn et al. 1998). Si cette molécule-appât est couplée à la HRP⁷⁶, et l'échantillon mis en présence de la banque de phages-anticorps, l'ajout de tyramine-biotine et de peroxyde d'hydrogène va entraîner la biotinylation des protéines situées au voisinage de cette HRP, en particulier celle des phages-anticorps dirigés contre la molécule-appât et des antigènes voisins. Par purification sur un support de type avidine

⁷⁶ par exemple au moyen d'un anticorps, dirigé contre cette molécule-appât, lui-même directement couplé à la HRP

éluable, les phages-anticorps biotinylés sont spécifiquement enrichis. A nouveau, ce type de stratégie est pratiquement impossible à réaliser dans un animal.

I.C.4.a.vi. Sélection par double-hybride □ anticorps intracellulaires, ou intra-anticorps

Enfin, il est très utile (comme nous le verrons dans la prochaine partie) de sélectionner des anticorps qui interagissent avec l'antigène d'intérêt *in vivo*, en particulier dans le milieu réducteur du cytoplasme. En général, le repliement des anticorps et même des fragments d'anticorps est affecté par les conditions réductrices du cytoplasme. Une solution consiste à effectuer les derniers cycles d'un crible (voire tous) après avoir transféré les séquences nucléotidiques de la population d'anticorps du phagemide à un plasmide de crible double-hybride. Après avoir placé la séquence nucléotidique de l'antigène (alors forcément un peptide ou une protéine) dans le plasmide-appât du système double-hybride, on sélectionne, en réalisant le crible, des anticorps qui interagissent avec l'antigène dans le cytoplasme des levures, et donc dont l'interaction avec leur cible n'est pas abolie par les conditions réductrices (Visintin et al. 1999 □ Portner-Taliana et al. 2000 □ der Maur et al. 2002 □ Tse et al. 2002).

I.C.4.b. Anticorps recombinants □ nouvelles applications

I.C.4.b.i. Anticorps versatiles

Le deuxième avantage majeur des anticorps recombinants sur les anticorps naturels⁷⁷ est le fait qu'on dispose immédiatement de la séquence nucléotidique codant pour les anticorps recombinants. Outre la production à bas coût des anticorps chez *E. coli* (ou bien *P. pastoris* (Shi et al. 2003), dans des cellules d'insectes (Liang et al. 2001) ...), ceci permet de les remanier à volonté par des techniques classiques de biologie moléculaire. Par exemple on peut récupérer les CDRs d'un anticorps intéressant et les « greffer » sur un nouvel échafaudage, y compris passer le scFv dans un vecteur permettant d'exprimer un anticorps entier (Liang et al. 2001) ...

On peut aussi évidemment étiqueter l'anticorps avec des étiquettes permettant diverse applications biochimiques, comme par exemple avec la GST (Glutathione S Transferase), la

⁷⁷ Les applications décrites dans cette partie concernent aussi les anticorps recombinants obtenus par clonage moléculaire d'anticorps monoclonaux obtenus à partir d'animaux.

MBP (*Maltose Binding Protein*) (Bach et al. 2001), la streptavidine (détection basée sur la biotine et tétramérisation pour augmenter l'avidité) (Dubel et al. 1995) ...

I.C.4.b.ii. Intra-anticorps

Il est aussi possible d'exprimer ces anticorps recombinants dans des cellules de mammifères (ou de n'importe quelle espèce) pour étudier la protéine-cible. Cette utilisation des anticorps recombinants en tant qu'intra-anticorps (*intrabodies*) avait initialement pour but de cibler l'antigène correspondant *in vivo* et de bloquer sa fonction cellulaire. Par exemple, il est possible d'exprimer un intra-anticorps, pour bloquer la fonction d'une protéine ou suivre son comportement endogène dans des cellules en culture (Biocca et al. 1994 □ Cochet et al. 1998 □ Cohen et al. 1998 □ Caron de Fromentel et al. 1999 □ Lecerf et al. 2001) ou dans un organisme vivant, en particulier au cours de son développement, ce qui a été réalisé chez *D. melanogaster* (Hassanzadeh Gh et al. 1998) et *X. laevis* (Abler et Sheets 2003).

Il est même possible de rediriger le complexe antigène-intra-anticorps vers une structure cellulaire aberrante en étiquetant l'anticorps recombinant avec un peptide signal ou une séquence d'interaction avec cette structure (Cohen 2002), voire de provoquer la dégradation de l'antigène cible par le protéasome (Cardinale et al. 2001). Par exemple dans le cas d'antigènes-cibles cytosoliques, il est possible d'étiqueter l'anticorps avec un signal d'import nucléaire pour séquestrer l'antigène dans le noyau et ainsi l'inactiver (Biocca et Cattaneo 1995). Comme nous l'avons mentionné auparavant, l'interaction anticorps-antigène peut être sensible aux conditions réductrices du cytosol, et en général le repliement correct de l'anticorps exprimé dans le cytosol est souvent lui-même affecté (der Maur et al. 2002). Il est donc *a priori* rare d'obtenir directement des anticorps d'une banque naïve dont l'échafaudage résiste aux conditions réductrices du cytosol lors de sa surexpression (en vue de bloquer sa cible), et de nombreux groupes tentent d'isoler des échafaudages résistants à la réduction sur lesquels on pourrait greffer les CDRs des anticorps que l'on désire utiliser en tant qu'intra-anticorps (Desiderio et al. 2001), ou bien d'effectuer au moins en partie les cycles de sélection par double-hybride (Tse et al. 2002).

Une autre application des anticorps en tant qu'intra-anticorps consiste à les étiqueter avec la GFP (*Green Fluorescent Protein*) afin d'observer le comportement de la protéine-cible dans des cellules vivantes. Comme nous le verrons dans la partie Résultats, même lorsque la surexpression des anticorps induit leur agrégation dans le cytosol, leur expression modérée en

tant que fusion GFP, si elle ne permet pas de bloquer la fonction de la protéine-cible, permet en revanche de suivre le comportement de la protéine-cible endogène.

I.C.4.b.iii. Auto-anticorps pour l'immunothérapie

Enfin, il a été clair dès le début de son développement (Griffiths et al. 1993) que cette méthode permet d'obtenir des anticorps d'origine humaine contre des protéines ou des complexes de protéines humains⁷⁸, ce qui ouvre la voie à de nombreuses opportunités dans le domaine de l'immunothérapie (Hudson 1999). Dans le contexte de maladies liées à une mutation d'un gène, il est possible de sélectionner des anticorps d'une banque d'origine humaine contre la protéine humaine mutée purifiée (ou le tissu malade, des cellules présentant l'antigène muté ...). Ces « auto-anticorps » peuvent être ensuite utilisés aussi bien dans une stratégie diagnostique pour détecter la protéine mutée dans un extrait ou un tissu, que dans une stratégie thérapeutique puisque l'anticorps d'origine humaine pourrait ne pas être rejeté et au contraire utilisé par le système immunitaire du patient pour déclencher une réponse dirigée contre cet antigène muté. Une autre utilisation de ces anticorps est la production d'immunotoxines (Azemar et al. 2000), qui sont des anticorps, spécifiques d'une tumeur par exemple, fusionnés à une toxine. Ces immunotoxines détruisent directement les cellules qui présentent l'antigène.

⁷⁸ Mentionnons par exemple la production au laboratoire de scFvs restreints à un complexe entre une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et un peptide donné (S. Moutel et al, en préparation).

II. RESULTATS

Dans cette partie Résultats, je vais présenter mon travail de thèse sous la forme d'articles en phase de rédaction, soumission, ou publiés, ainsi qu'une annexe technique décrivant succinctement les principes des techniques de microscopie et d'interférence ARN nécessaires à la compréhension de certains résultats. Chacun de ces articles repose sur la mise au point d'une technique d'étude que nous avons appliquée à l'appareil de Golgi□ la déplétion de protéines par interférence ARN dans les cellules de mammifères, des techniques d'imagerie in vivo (en particulier de photoblanchiment), la production d'anticorps recombinants et leur expression intracellulaire.

A chaque fois, la technique mise en jeu nous a permis de mettre en évidence un aspect fondamental dans le cadre des thèmes que j'ai présentés en introduction□ la complexité de la régulation du transport par la famille des GTPases de la famille des Rabs, le mode d'héritage de l'appareil de Golgi en mitose, ou la description de la périphérie de l'appareil de Golgi.

Clairement, ces techniques mises au point permettent d'aborder de nombreuses questions dans le cadre des problématiques étudiées au laboratoire, mais leur spectre d'utilisation dépasse de loin ces frontières□ la technique d'interférence ARN est déjà appliquée dans de nombreux domaines de la biologie, et notre démonstration de la possibilité de dépléter spécifiquement un isoforme issu d'un épissage alternatif ouvre de nombreuses possibilités d'étude bien au-delà du domaine des protéines Rabs. Les techniques d'imagerie cellulaire in vivo sont elles aussi devenues très répandues, malgré les artefacts et les difficultés dévoilés au fur et à mesure que la technique se développe, et nous avons montré en particulier que les techniques de photo-blanchiment (souvent réputées toxiques pour les cellules) sont applicables même en mitose (une étape du cycle cellulaire délicate à étudier). Nous proposons aussi une nouvelle technique d'imagerie in vivo pour suivre les protéines au niveau endogène et ainsi éviter les artefacts de surexpression. Je crois que la production d'anticorps recombinants, de par ses avantages intrinsèques en termes de coût et de rapidité, mais surtout en termes de catégories d'antigènes-cibles accessibles et de versatilité, devrait aussi étendre considérablement son champ d'application dès lors que les banques d'anticorps de haute diversité seront disponibles en quantité suffisante.

Je vais donc présenter ces différentes études en précisant à chaque fois la mise au point technique que j'ai effectuée, et en tentant de conclure sur l'étendue de son domaine d'application.

II.A. Rab6A et Rab6A'

Manuscrit en préparation □ del Nery, E., Nizak C., Falguières T., Johannes L., Perez F., Goud B., Specific siRNAs highlight specific functions for both closely related Rab6 isoforms.

II.A.1. *Introduction et Résultats*

La généralisation des méthodes d'interférence ARN révolutionne l'étude fonctionnelle des protéines dans les cellules de mammifères. Dans le cas de Rab6, une difficulté quasi-incontournable de l'étude fonctionnelle est l'existence de deux isoformes issues de l'épissage alternatif d'un même gène. Ces deux isoformes (A et A') ne présentent que trois acides aminés différents, et par conséquent partagent tous les interacteurs que nous leur connaissons (hormis Rabkinésine6, spécifique de A), et les anticorps anti-Rab6 dont nous disposons ne les distinguent pas non plus. L'expression de mutants dominants négatifs de A ou A' n'affecte pas forcément spécifiquement non plus la fonction de l'isoforme endogène correspondant, à nouveau probablement à cause du partage des interacteurs (Nizak et al. 2003). Nous ne disposons donc pas d'outil permettant d'étudier la fonction spécifique d'une isoforme, à part leur surexpression. Et justement, nous montrons dans la présente étude que les surexpressions de Rab6A et A' transforment toutes les deux les intermédiaires de transport positifs pour Rab6•GTP en longs tubules⁷⁹, (Nizak et al. 2003) et que ces deux isoformes surexprimées en fusion avec des variants distincts de la GFP (CFP et YFP) colocalisent parfaitement sur l'appareil de Golgi et les tubules *in vivo*. De même, les surexpressions des mutants Q72L bloqués dans l'état GTP de A et A' entraînent toutes les deux la redistribution des enzymes golgiennes dans le RE. Les deux isoformes semblent donc posséder des fonctions identiques. Plus généralement, l'hypothèse communément admise dans le domaine des Rabs (dont la plupart présentent de tels isoformes) est que ces isoformes remplissent des fonctions redondantes⁸⁰. Or dans le cas des surexpressions des mutants Q72L bloqués dans l'état GTP, les cinétiques des redistributions des enzymes golgiennes dans le RE diffèrent nettement entre A et A' □ la redistribution est observée en 6h pour A et 12h pour A'. Il est donc important de tester la possibilité que ces deux isoformes aient des fonctions distinctes, malgré la quasi-identité de leurs séquences.

⁷⁹ Pour commencer, les deux isoformes surexprimées sont sous forme GTP aussi bien sur l'appareil de Golgi que sur les intermédiaires de transport.

⁸⁰ à l'exception notable de Rab3

La technique de siRNA (voir II.F.2.) permet d'inhiber la synthèse d'une protéine en ciblant le messenger correspondant□il suffit pour cela d'introduire un oligonucléotide d'ARN double-brin spécifique de ce messenger dans les cellules. Nous avons donc choisi des oligonucléotides de séquence spécifique à Rab6A ou Rab6A' (dans l'exon alternatif), ainsi qu'un oligonucléotide présent dans un exon commun aux deux isoformes pour les dépler simultanément.

La possibilité de dépler par cette technique de siRNA spécifiquement un isoforme issu d'un épissage alternatif était en fait inconnue, et excluait certains mécanismes proposés pour l'amplification de l'effet RNAi□on ne sait pas encore si les messagers sont ciblés avant ou après épissage dans les cellules de mammifères⁸¹. Nous avons d'abord montré par RT-PCR que les messagers endogènes de A et A' sont spécifiquement détruits par transfection des oligonucléotides correspondants⁸². Nous avons ensuite confirmé ce résultat au niveau de l'expression des protéines A et A', toutes deux détectées par western blot par l'anticorps anti-Rab6 dont nous disposons. La bande de Rab6 (A et A' co-migrent) disparaît quand les deux oligonucléotides A et A' sont transfectés simultanément ou avec le oligonucléotide «A+A'». Cette bande ne disparaît qu'à moitié si un seul des oligonucléotides A ou A' est transfecté. Par conséquent, ces résultats prouvent que, dans les cellules de mammifères, il est possible de dépler spécifiquement chacun des isoformes issus d'un épissage alternatif par la technique de siRNA.

En plus de cette première expérience au niveau endogène, une seconde expérience indique qu'il est effectivement possible de dépler spécifiquement un isoforme surexprimé□ nous avons transfecté les oligonucléotides A, A' ou A+A' dans des cellules exprimant stablement GFP-Rab6A ou GFP-Rab6A'. Le signal GFP disparaît uniquement quand l'oligonucléotide correspondant à l'isoforme surexprimé est transfecté, ou quand les deux oligonucléotides simultanément ou le «A+A'» sont transfectés. Ceci implique que lorsque le messenger-cible est dégradé, les fragments générés ne sont pas utilisés par la machinerie RNAi pour dégrader les messagers contenant ces fragments. En effet, dans le cas contraire, le messenger de Rab6A par exemple, dégradé par l'oligonucléotide correspondant, générerait des fragments contenus

⁸¹ Chez *C. elegans*, le mécanisme d'amplification proposé pour rendre compte de l'efficacité du RNAi ne serait pas compatible avec cette possibilité de dépler spécifiquement Rab6A ou A'. En effet, ce mécanisme suppose que chaque oligonucléotide entraîne la production d'autres oligonucléotides à partir d'autres portions de la séquence de l'ARNm-cible qui permettent de détruire ces messagers beaucoup plus efficacement.

dans le messenger de GFP-Rab6A' (ceux contenus dans les exons communs à A et A') qui provoqueraient la dégradation de GFP-Rab6A'. Ce résultat confirme que l'on peut dépléter un messenger spécifiquement même si sa séquence est identique à celle d'un autre sur l'essentiel de sa longueur.

Nous avons ensuite utilisé cette technique pour tenter une étude des isoformes de Rab6. Les résultats suivants vont confirmer l'existence de différences fonctionnelles entre les deux isoformes⁸² les phénotypes observés lors de la transfection des oligonucléotides A ou A' diffèrent clairement. Le premier effet observé est la très forte toxicité de la déplétion par l'oligonucléotide A'⁸² pratiquement toutes les cellules meurent après 3 jours de transfection, et une analyse par vidéomicroscopie montre que ces cellules meurent en mitose de manière similaire à ce qui a été observé au laboratoire lorsque le cycle GDP-GTP de Rab6A ou les fonctions de ses partenaires Rabkinésine6 ou GAPCenA sont perturbés. Cette toxicité n'est pas observée dans le cas de la déplétion par l'oligonucléotide A. En fait l'étude du rôle de Rab6 dans le cycle cellulaire indique déjà que les isoformes A et A' ne sont pas redondants⁸² ce contrôle du cycle semble propre à la fonction de Rab6A, pas de Rab6A' (le résultat du siRNA semble contradictoire, mais peut éventuellement s'expliquer par le partage des partenaires).

Plusieurs autres observations permettent de distinguer les rôles de Rab6A et Rab6A'. La morphologie de l'appareil de Golgi observé par immunofluorescence de différents marqueurs est affectée par déplétion de A et A', mais de manière différente dans les deux cas⁸² on observe que l'appareil de Golgi est plus compact lorsque l'isoforme A est déplété et forme de longs tubules (positifs pour GM130 et GalT) lorsque l'isoforme A' est déplété. Le trafic golgien est lui aussi affecté de deux façons différentes lorsque A ou A' est déplété⁸² nous avons utilisé des méthodes biochimiques et d'immunofluorescence pour montrer que la déplétion de A' bloque le transport rétrograde de la sous-unité B de la toxine de Shiga depuis la membrane plasmique jusqu'au TGN (et donc a fortiori jusqu'au RE). La déplétion de A n'a en revanche pratiquement pas d'effet sur ce transport.

⁸² L'exon alternatif est trop court pour effectuer une amplification sélective de chacun des ARNm des deux isoformes par RT-PCR. Nous avons utilisé un site de restriction présent uniquement dans la séquence de A' pour distinguer A de A'.

Manuscrit en préparation □ del Nery, E., Nizak C., Falguières T., Johannes L., Perez F., Goud B., Specific siRNAs highlight specific functions for both closely related Rab6 isoforms.

Dans les pages suivantes, je présente les figures-clés du manuscrit en préparation accompagnées de légendes détaillées.

Séquence du gène codant pour Rab6A et A' au niveau de l'exon épissé alternativement

```

exon   CAG GCA ACA ATT GGC ATT GAC TTT TTA TCA AAA ACT ATG TAC TTG GAG GAT CGA ACA
intron   gtgagt.....-2kb-.....tttccatctcacag

6A' exon  ATC AGG CTT CAG CTG TGG GAT ACT GCG GGT CAG GAA CGT TTC CGT AGC CTC ATT
          CCC AGT TAC ATC CGT GAT TCT GCT GCA GCT GTA GTA GTT TAC GAT ATC ACA A
intron   gtaggtatattgcaacggggtgacctttcttatttttcttgcttgcttgactgattttgtgtag

6A exon   GTA CGA TTG CAA TTA TGG GAC ACA GCA GGT CAA GAG CGG TTC AGG AGC TTG ATT
          CCT AGC TAC ATT CGT GAC TCC ACT GTG GCA GTT GTT GTT TAT GAT ATC ACA A
intron   gtgagt.....-2kb-.....cctctctatactag

exon     AT GTT AAC TCA TTC CAG CAA ACT ACA AAG TGG ATT

```

Comparaison des séquences de Rab6A et A' au niveau de l'exon épissé alternativement

```

          181
Rab6A : ACA GTA CGA TTG CAA TTA TGG GAC ACA GCA GGT CAA GAG CGG TTC AGG AGC
          ||| | | | || | ||| || | || | ||| || | || | ||| || | |||
Rab6A' : ACA ATC AGG CTT CAG CTG TGG GAT ACT GCG GGT CAG GAA CGT TTC CGT AGC

          226
Rab6A : TTG ATT CCT AGC TAC ATT CGT GAC TCC ACT GTG GCA GTT GTT GTT TAT GAT
          ||| || | ||| || | ||| || | || | ||| || | ||| ||| ||| ||| |||
Rab6A' : CTC ATT CCC AGT TAC ATC CGT GAT TCT GCT GCA GCT GTA GTA GTT TAC GAT

```

Comparaison des séquences protéiques de Rab6A et A'

```

Rab6A      1  MSTGGDFGNPLRKFKLVFLGEQSVGKTSLITRFMYDSFDNTYQATIGIDFLSKTMYLEDR
Rab6A'     1  MSTGGDFGNPLRKFKLVFLGEQSVGKTSLITRFMYDSFDNTYQATIGIDFLSKTMYLEDR

Rab6A     61  TVRLQLWDTAGQERFRSLIPSYIRDSTVAVVVYDITNVNSFQQTTKWIDDVRTERGSDVI
Rab6A'    61  TVRLQLWDTAGQERFRSLIPSYIRDSTVAVVVYDITNVNSFQQTTKWIDDVRTERGSDVI

Rab6A    121  IMLVGNKTDLADKRQVSIEEBGERKAKELNVMFIETSAKAGYNVKQLFRRVAAALPGMEST
Rab6A'   121  IMLVGNKTDLADKRQVSIEEBGERKAKELNVMFIETSAKAGYNVKQLFRRVAAALPGMEST

Rab6A    181  QDRSREDMIDIKLEKPQEQPVSEGGCSC
Rab6A'   181  QDRSREDMIDIKLEKPQEQPVSEGGCSC

```

Figure 1 (Echard et al, Mol Biol Cell 2000). La séquence du gène codant pour Rab6 indique la présence d'un exon dupliqué et épissé alternativement, ce qui donne la production de deux messagers distincts □ celui de Rab6A et celui de Rab6A'. L'exon spécifique du produit Rab6A' précède celui de Rab6A. La comparaison des séquences des exons spécifiques de A et A' indique une divergence importante au niveau nucléotidique. La comparaison des séquences protéiques révèle que seuls trois acides aminés sont différents entre Rab6A et A'. Le motif TV permet à Rab6A d'interagir avec son effecteur Rabkinésine6 (Echard et al, Mol Biol Cell 2000), probablement au cours de la mitose. Rab6A' pourrait aussi posséder un partenaire spécifique □ un facteur d'échange (Nizak et al, Science 2003).

**Localisation de la forme active de Rab6A' sureprimé dans les cellules vivantes
Effet de cette surexpression sur la morphologie des intermédiaires de transport**

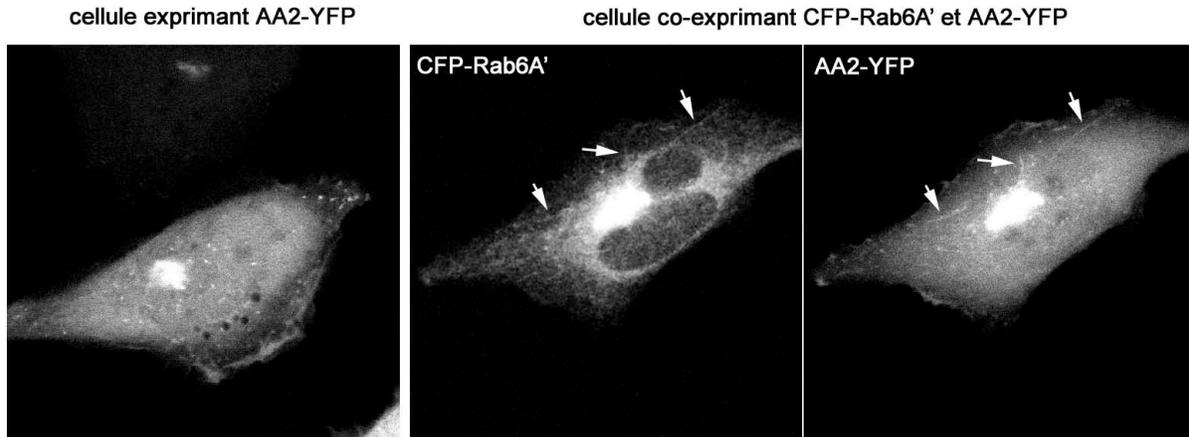


Figure 2. A gauche, pour rappel (Nizak et al, Science 2003), Rab6 endogène est présent sous sa forme active (détecté par l'intra-anticorps AA2-YFP) sur l'appareil de Golgi et des intermédiaires de petite taille (1 à 2 μm). A droite une cellule exprime de plus CFP-Rab6A' la localisation et la dynamique de la forme active de l'isoforme Rab6A' surexprimé sont très similaires à celle de l'isoforme Rab6A sureprimé. En effet, comme pour Rab6A (Nizak et al, Science 2003), la forme active de Rab6A' surexprimé est présente sur l'appareil de Golgi et les intermédiaires de transport, qui deviennent tubulaires (longueur de 5 à 20 μm , voir flèches) à cause de la surexpression.

Effet de l'expression des mutants bloqués sous la forme GTP (Q72L) de Rab6A et A' en fonction du temps

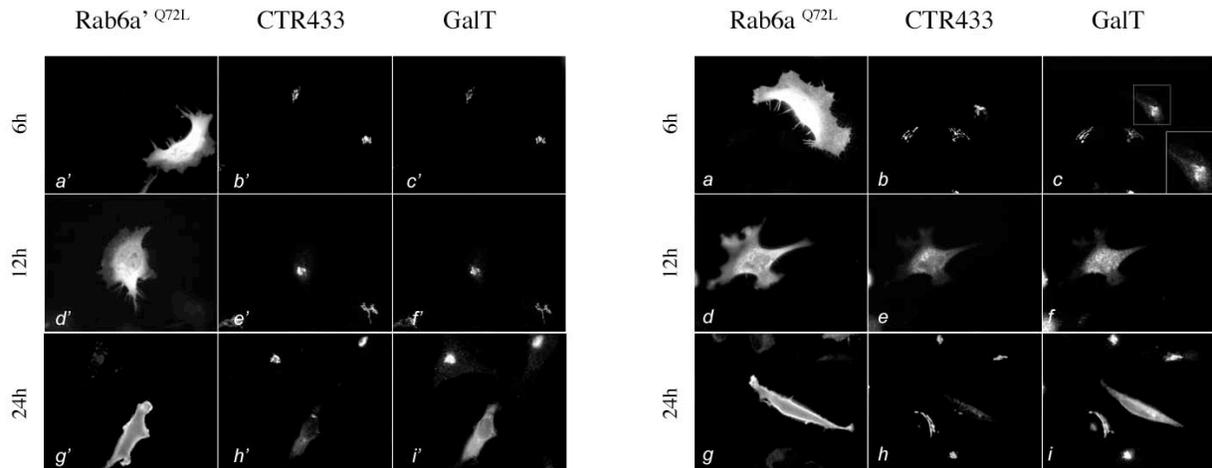


Figure 3. La surexpression des mutants bloqués sous la forme GTP de Rab6A et A' induit dans les deux cas la redistribution de marqueurs golgiens dans le RE, mais avec des cinétiques différentes. A droite, l'expression de Rab6AQ72L induit la relocalisation partielle de la Galactosyltransférase (GalT) en 6 heures, et la relocalisation complète de GalT et de la cible de l'anticorps CTR433 en 12 heures. A gauche, la relocalisation n'est visible qu'après 24 heures d'expression. Voir les études précédentes du laboratoire □ Martinez et al, JCB 1997, et Echard et al, Mol Biol Cell 2000.

Séquences choisies pour les oligonucléotides d'ARN spécifiques de A et A'

```

181
Rab6A : ACA GTA CGA TTG CAA TTA TGG GAC ACA GCA GGT CAA GAG CGG TTC AGG AGC
      ||| | | | || | ||| || | | ||| |||
Rab6A' : ACA ATC AGG CTT CAG CTG TGG GAT ACT GCG GGT CAG GAA CGT TTC CGT AGC

226
Rab6A : TTG ATT CCT AGC TAC ATT CGT GAC TCC ACT GTG GCA GTT GTT GTT TAT GAT
      | ||| || | ||| || | || | | ||| ||| ||| ||| |||
Rab6A' : CTC ATT CCC AGT TAC ATC CGT GAT TCT GCT GCA GCT GTA GTA GTT TAC GAT
  
```

Figure 4. Les outils dont nous disposons ne nous permettent pas de distinguer facilement les comportements de Rab6A et A', nous avons donc tenté de réduire spécifiquement le niveau d'expression de chacune de ces protéines par Interférence ARN. Puisque les séquences nucléotidiques des deux isoformes A et A' sont largement différentes au niveau de l'exon épissé, nous avons choisi des oligonucléotides d'ARN (siRNAs, séquences encadrées en couleur pour chaque isoforme) pour effectuer une déplétion spécifique de ces isoformes par Interférence ARN, et tenter d'étudier les différences fonctionnelles entre ces isoformes.

Déplétion spécifique des ARNm de Rab6A et Rab6A' par Interférence ARN

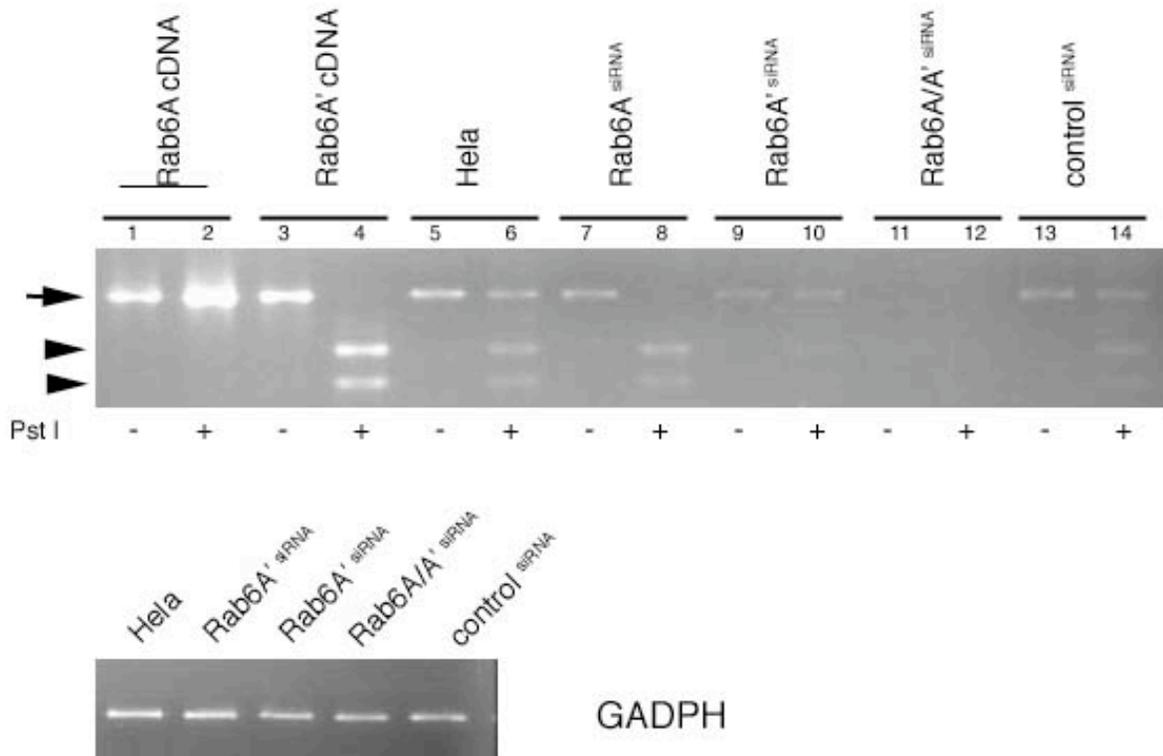


Figure 5. Nous avons utilisé la même astuce que lors d'une étude précédente (Echard et al, Mol Biol Cell 2000) pour différencier les ARNm de Rab6A et A'. Le messenger de Rab6A' contient un site de restriction pour l'enzyme Pst I (au niveau de l'exon épissé), pas celui de Rab6A.

Dans les pistes 1 à 4, nous observons que les ADNc de Rab6A et A' sont exactement de la même taille, mais que seul celui de Rab6A' est clivé en deux fragments lorsque les ADNc sont mis en présence de Pst I.

Dans les pistes suivantes, les ARNm de Rab6A et A' ont été amplifiés simultanément par PCR à l'aide d'un oligonucléotide dont la séquence est contenue dans la partie commune aux deux isoformes. Ainsi, chaque bande dont le poids correspond à celui indiqué par la flèche correspond à un mélange de A et A' en l'absence de Pst I. En revanche quand l'enzyme est ajoutée, la bande au niveau de la flèche correspond au messenger de Rab6A, et les deux bandes apparaissant au niveau des têtes de flèches correspondent aux fragments générés par clivage de l'ARNm de Rab6A'.

Dans les pistes 5-6 et 13-14, deux témoins, les messagers de Rab6A et A' sont présents en quantités similaires dans les cellules. Quand l'enzyme est présente, la bande supérieure (Rab6A) et les deux bandes inférieures (Rab6A') ont des intensités comparables.

Dans les pistes 7-8, la bande supérieure est présente en l'absence de Pst I, mais seules les bandes

inférieures sont visibles en présence de l'enzyme. Ceci signifie que la bande de l'ARNm Rab6 de la piste 7 est entièrement clivé en présence de PstI, c'est-à dire que les cellules traitées avec un siRNA spécifique de Rab6A ne contiennent plus que le messenger de Rab6A'.

Dans les pistes 9-10, la réciproque est observée. Cette fois, les cellules traitées avec le siRNA A' contiennent seulement le messenger de Rab6A, puisque les bandes inférieures ne sont plus visibles.

Ainsi, les siRNAs que nous avons choisi permettent de dépler spécifiquement les messagers de Rab6A et A' endogènes, et avec une grande efficacité puisque lorsque les deux isoformes sont déplétées l'ARN de Rab6 n'est plus détectable (pistes 11-12).

L'ARNm de la protéine contrôle GAPDH est présent en quantités similaires dans toutes les conditions.

Déplétion spécifique de Rab6A et A' par Interférence ARN

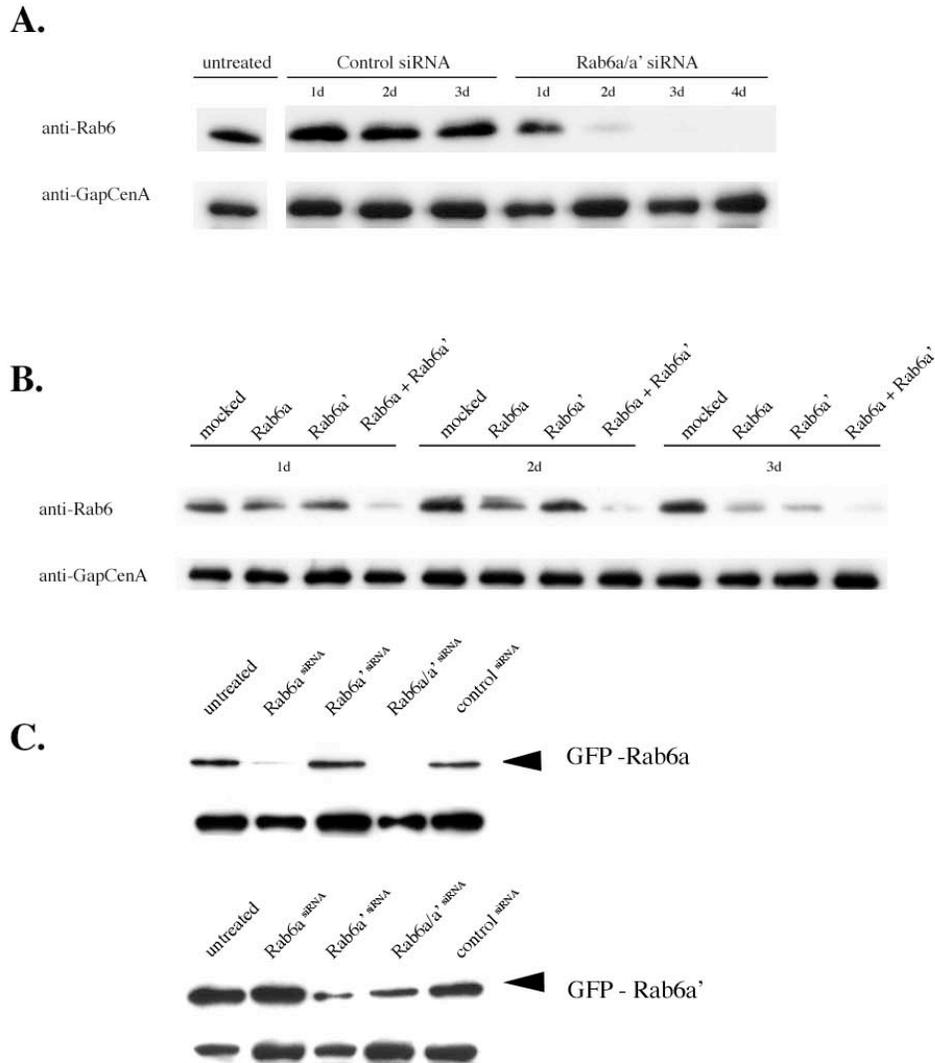


Figure 6.

A. L'anticorps anti-Rab6 dont nous disposons reconnaît les deux isoformes A et A'. Lorsque celles-ci sont déplétées simultanément, ces protéines ne sont plus détectables par Western Blot dans les cellules traitées après 72-96 heures. Une protéine contrôle (GAPCenA) est en revanche toujours exprimée au même niveau.

- B. De même lorsque les isoformes endogènes sont déplétées spécifiquement par les siRNAs correspondants □ la bande Rab6 disparaît (progressivement au cours du temps), partiellement après 72 heures quand l'un ou l'autre des isoformes est déplété, et totalement quand ils sont déplétés simultanément. La protéine GAPCenA (contrôle) voit son niveau d'expression inchangé dans toutes ces conditions.
- C. Une confirmation supplémentaire de la spécificité des siRNAs, cette fois-ci au niveau protéique. Nous ne pouvons pas détecter spécifiquement les deux protéines endogènes, mais si l'une des deux est exprimée (stablement) en fusion avec la GFP, le signal GFP (anticorps anti-GFP) disparaît uniquement quand le siRNA correspondant à l'isoforme étiquetée surexprimée (A en haut, A' en bas) est transfecté. Le signal disparaît aussi quand les deux isoformes sont déplétées simultanément. A nouveau une protéine contrôle (tubuline) voit son niveau d'expression pratiquement inchangé dans toutes ces conditions (bandes visibles en dessous des bandes détectées par l'anticorps anti-GFP).

Déplétion de Rab6A et A' et viabilité cellulaire

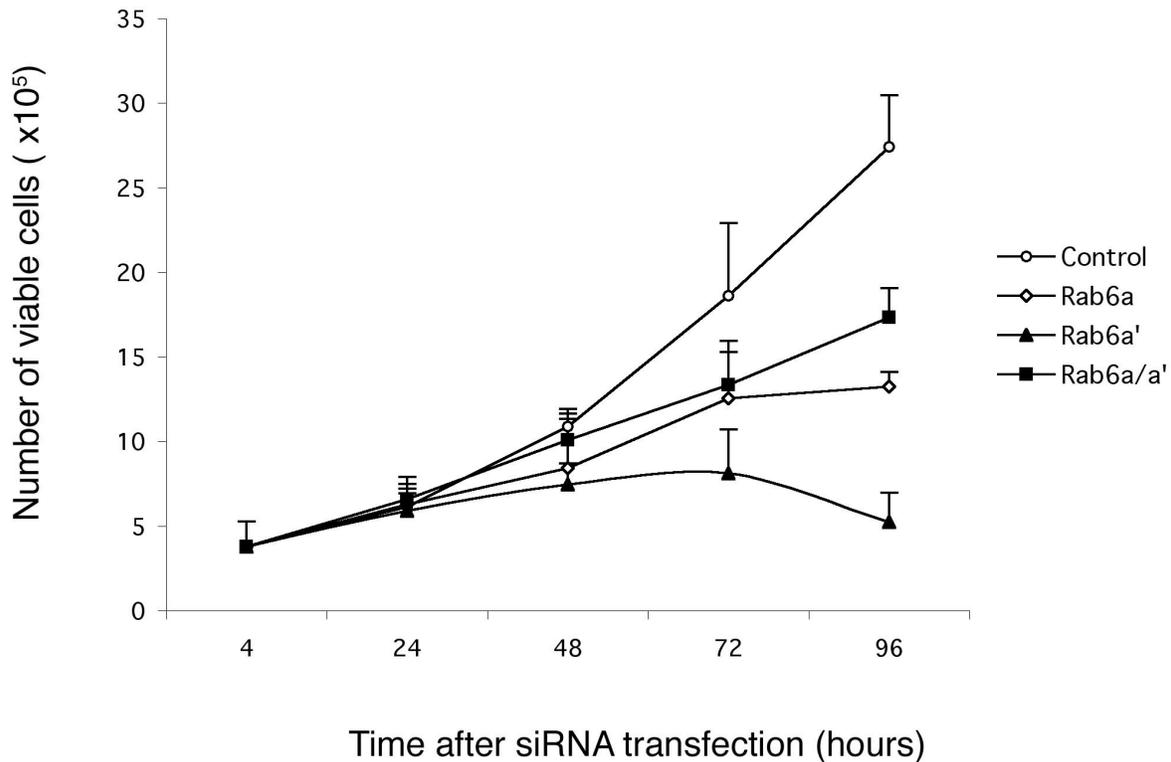


Figure 7. Nous avons évalué la croissance des cellules au cours du temps lors de la déplétion des isoformes Rab6A et A' (les cellules sont comptées au cours du temps). La courbe de croissance est exponentielle dans la situation contrôle. La croissance est moins rapide quand Rab6A est déplété. Les cellules meurent pratiquement totalement après 96 heures quand Rab6A' est déplété. Par vidéomicroscopie, nous avons observé que ces cellules meurent au cours de la mitose. De manière intéressante, les cellules sont capables de croître lorsque les deux isoformes sont déplétés, mais à une vitesse comparable à la situation «siRNA A», et donc plus lentement que dans la situation contrôle.

Altération de la structure de l'appareil de Golgi
visualisée par immunofluorescence
lors de la déplétion de Rab6A ou A'

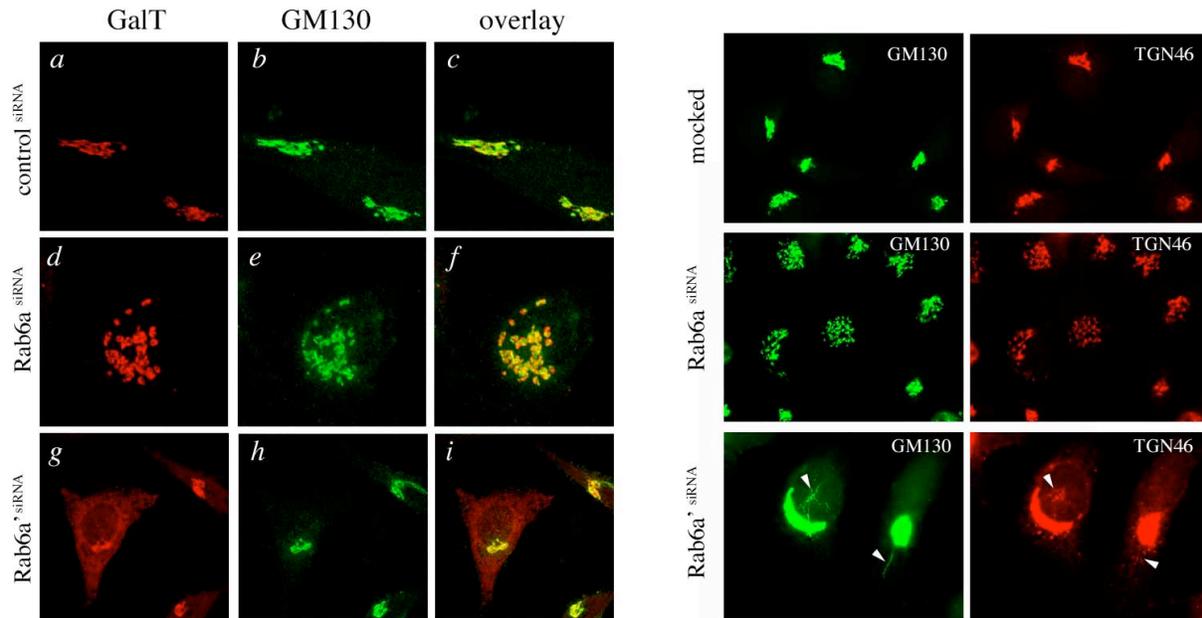


Figure 8.

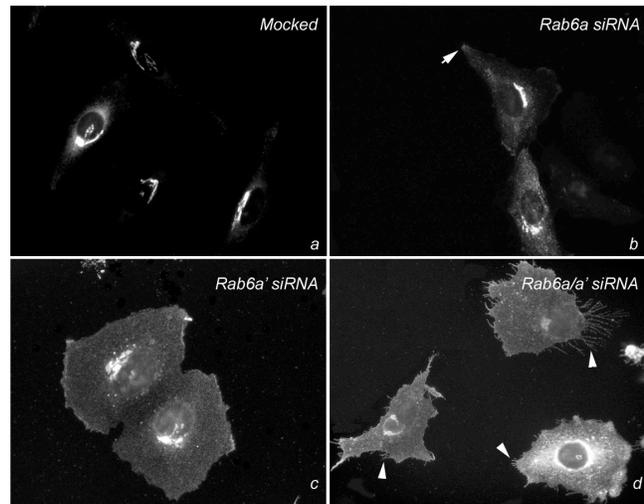
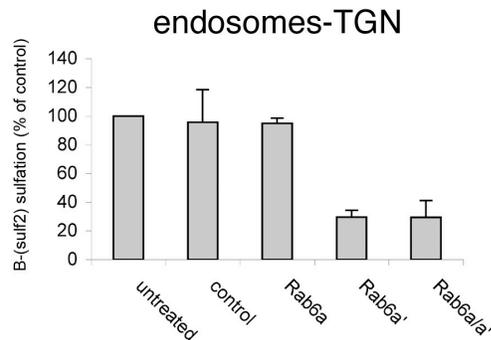
A gauche, nous observons l'effet de la déplétion de Rab6A ou A' sur la localisation par immunofluorescence de GalT et GM130, deux marqueurs golgiens. Lorsque Rab6A est déplété, l'appareil de Golgi ne semble plus être un organite « continu » comme dans les cellules-contrôles. Il semble fragmenté en de nombreuses structures (sur lesquelles les deux marqueurs sont présents) qui restent relativement concentrées dans une région périnucléaire. Lorsque Rab6A' est déplété, l'enzyme GalT est presque totalement redistribuée au RE, tandis que GM130 est toujours essentiellement localisé sur l'appareil de Golgi.

A droite, la même fragmentation de l'appareil de Golgi est visible dans les cellules déplétées de Rab6A (cette fois-ci les marqueurs sont GM130 et la protéine TGN46, présente à l'équilibre sur le TGN et cyclant par la membrane plasmique). Lorsque Rab6A' est déplété, nous observons (en exagérant le temps d'exposition lors de la prise de vue) que des tubules positifs pour GM130 (cis-Golgi) et TGN46 (TGN) émanent de l'appareil de Golgi apparemment quasi-intact par ailleurs.

Clairement, des observations par microscopie électronique sont nécessaires pour observer directement l'effet des déplétions de Rab6A et A' sur les membranes de l'appareil de Golgi, ces expériences sont en cours de réalisation.

Déplétion de Rab6A et A' et transport rétrograde de la sous-unité B de la toxine de Shiga

A.



B.

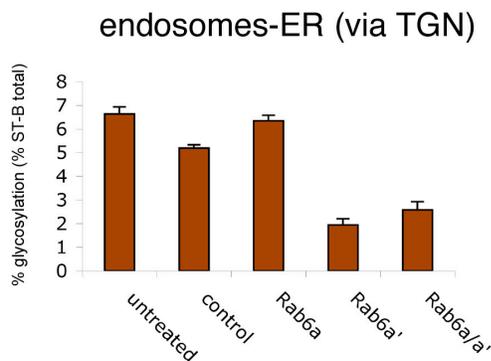


Figure 9. Rab6 a été décrit en tant que régulateur du transport rétrograde depuis les compartiments précoces de la voie d'endocytose (membrane plasmique et endosomes précoces) directement au TGN, puis au RE. Un cargo caractéristique de cette voie est la sous-unité B de la toxine de Shiga (Mallard et al, JCB 1998 et 2002).

Dans ces deux études précédentes, des formes sulfatable (A, B-Sulf) et glycosylable (B, B-Glyc) de ce cargo ont été créées pour détecter son arrivée respectivement dans le TGN (contenant une sulfotransférase) et le RE (contenant une enzyme de glycosylation).

- La déplétion de Rab6A' a un effet inhibiteur sur la sulfatation de B-Sulf, celle de Rab6A n'a pas d'effet, et la co-déplétion des deux isoformes provoque la même inhibition que celle de la co-déplétion de Rab6A' seul. Une interprétation possible est que Rab6A' intervient directement dans cette première étape endosomes-TGN du transport rétrograde.
- A nouveau, la déplétion de Rab6A' inhibe l'arrivée de B-Glyc au RE et donc sa glycosylation, mais probablement parce que B-Glyc n'a pas même accès au compartiment en amont de cette voie, le TGN (voir A). En revanche, la déplétion de Rab6A n'a pas d'effet sur la glycosylation, ce qui est surprenant puisque Rab6A semble réguler spécifiquement cette voie par ailleurs (Girod et al, Nat Cell Biol, 1999). La co-déplétion des deux isoformes a un effet inhibiteur sur le transport vers le RE.

Par microscopie de fluorescence, nous visualisons à droite l'internalisation du cargo, cette fois-ci fluorescent, depuis la membrane plasmique vers les compartiments internes. La déplétion de Rab6A n'inhibe pas l'accès du cargo à l'appareil de Golgi et au RE (comme dans la situation contrôle). La flèche indique que la sous-unité B de la toxine de Shiga reste cependant accumulée en partie dans des structures périphériques qui sont en réalité positives pour Rab11 et le récepteur à la transferrine (cargo de la voie endosomale de recyclage), ce qui témoigne d'une connexion entre ces voies de transport probablement par l'intermédiaire de Rab6 et Rab11 (qui partagent un effecteur au moins, Rab6IP1). La déplétion de Rab6A' ou la co-déplétion des deux isoformes inhibent l'internalisation de la sous-unité B de la toxine de Shiga, qui reste partiellement accumulée à la membrane plasmique (mais atteint tout de même le TGN, voir A), en particulier au niveau des filopodes désignés par des têtes de flèche.

Nous voyons donc que les expériences de déplétion des isoformes A et A' donnent des résultats apparemment en contradiction avec celles d'expression des mutants dominants négatifs bloqués sous la forme GDP T27N (Girod et al, Nat Cell Biol, 1999). En effet, ces dernières suggéraient un rôle direct de Rab6A dans la voie Golgi-RE (Rab6AT27N inhibe ce transport rétrograde), tandis que sa déplétion n'a pas d'effet sur ce transport.

II.A.2. *Discussion et Perspectives*

Il nous est en réalité impossible de donner un modèle global des fonctions des deux isoformes de Rab6, le partage des interacteurs (effecteurs et protéines régulatrices) complique considérablement l'analyse. Une conclusion certaine est que la déplétion spécifique de chacun de ces deux isoformes mène à des phénotypes distincts, et que l'existence d'interacteurs distincts (Rabkinésine6 pour A, un facteur d'échange hypothétique pour A' (Nizak et al. 2003)) fournit un début d'explication à ces résultats. Par conséquent, nous avons montré qu'il est possible de dépléter par siRNA spécifiquement des isoformes issus d'épissage alternatif, ceux de Rab6, et que ces isoformes, malgré leur très grande ressemblance, ont des fonctions non-redondantes. Cette étude a donc des implications quant aux mécanismes de l'effet des siRNA dans les cellules de mammifères, et semble exclure les mécanismes d'amplification proposés dans le cas de *C. elegans*. De plus, ces résultats dévoilent un niveau supplémentaire de la complexité de la régulation du transport intracellulaire par les Rabs, jusqu'ici négligé.

II.B. Anticorps recombinants contre des fractions sub-cellulaires

Article sous presse dans la revue Traffic □ Clément Nizak, Silvia Martin-Lluesma, Sandrine Moutel, Aurélien Roux, Thomas E. Kreis, Bruno Goud, Franck Perez, Recombinant antibodies against subcellular fractions used to track endogenous Golgi protein dynamics *in vivo*.

II.B.1. *Introduction*

La technique de production d'anticorps *in vitro* par *Antibody Phage Display* a été établie au début des années 1990, et nous avons vu qu'elle permet d'obtenir rapidement et à bas coût l'équivalent d'anticorps monoclonaux, en fait des clones de bactéries *E. Coli* produisant des fragments d'anticorps (scFv ou Fab), dirigés contre un antigène d'intérêt. De plus ces anticorps étant recombinants, on dispose de l'ADNc correspondant, ce qui permet de les étiqueter et aussi de les exprimer dans des cellules vivantes pour cibler l'antigène et bloquer sa fonction. Nous avons tenté d'appliquer cette technique dans le cadre du transport golgien, afin de disposer de nouveaux outils d'étude des protéines de la périphérie de l'appareil de Golgi.

Recombinant Antibodies Against Subcellular Fractions Used to Track Endogenous Golgi Protein Dynamics *in Vivo*

Clément Nizak¹, Silvia Martin-Lluesma²,
Sandrine Moutel³, Aurélien Roux¹, Thomas
E. Kreis², Bruno Goud¹ and Franck Perez^{1,*}

¹ CNRS UMR144 and

³ Translational Department, Institut Curie, 26 rue d'Ulm
75248 Paris cedex 05 France

² Cell Biology Department, University of Geneva, Quai
E. Ansermet, 1211 Geneva 4, Switzerland

* Corresponding author: Franck Perez,
franck.perez@curie.fr

Generation of specific antibodies against enriched subcellular fractions is a powerful strategy to identify and characterize cellular components. We show that recombinant antibodies can be selected *in vitro* by phage display against complex subcellular fractions, namely microtubule-binding proteins and Golgi stacks. This technique has allowed us to overcome many limitations of the classical animal-based approach and generate cell biology-compliant antibodies. In addition, we show that intracellular expression of GFP-tagged recombinant antibodies can reveal the dynamics of endogenous proteins *in vivo*. Endogenous Giantin is very static and outlines the Golgi in living cells. It accumulates neither onto Golgi-derived tubules upon Brefeldin A treatment before Golgi disappearance, nor onto *de novo* formed Golgi mini-stacks upon microtubule depolymerization, and remains instead on the 'old' pericentriolar Golgi. This suggests that, in contrast to other Golgi matrix proteins, endogenous Giantin is very stably associated to the Golgi and does not efficiently recycle to the ER. Altogether, we show that the antibody phage display technique represents an efficient alternative to rapidly generate versatile antibodies that represent new tools to study protein function.

Key words: GFP, Golgi apparatus, microtubules, phage display, scFv

Received 12 May 2003, revised and accepted for publication 5 August 2003

Antibodies are an essential tool in cell biology studies to identify and characterize proteins involved in diverse cellular processes (1–5). Classical production of antibodies has certain limitations that are inherent in the use of animal-based production systems. For example, humoral responses are difficult to elicit against antigens highly con-

served during evolution, a large amount of target antigen is needed, and many weeks are necessary to reach appropriate titer. Only monoclonal antibodies represent an endless source of constant quality antibodies, and their selection is based on costly and labor-intensive methods. In addition, control of the immune response is very limited in the animal, and antigens cannot be preserved in their native context (such as lipid membranes), or kept in their correct topology and native conformation.

As an alternative approach, antibody phage display systems have been developed in which a combinatorial library of antibody subdomains, like Fab or even single chain Fv (scFv), are presented at the surface of filamentous phages and screened *in vitro* (6–8). Only microgram amounts of purified proteins are necessary, or tens of micrograms of complex mixtures, and the evolutionary conservation of antigens is obviously not a limitation any more. Moreover, the antibodies can be obtained after 6 days of screening, using only basic molecular biology methods. They represent an endless source of antibodies produced in bacteria, and selected recombinant antibody cDNAs may be re-engineered, for example to be expressed in eukaryotic cells for functional studies (9,10). Initially, the relatively low diversity (10^7 different clones) of the first synthetic libraries precluded the selection of high-affinity antibodies (11). In order to increase the mean affinity and the probability to obtain specific antibodies against target antigens, more diverse libraries were constructed (12–14). One example is the Griffin.1 library from Greg Winter's laboratory (Cambridge, UK) obtained by random combination of human repertoires of heavy and light chains containing random CDR3 regions. With an estimated diversity of $1.2 \cdot 10^9$ scFvs clones, the library usually yields antibodies with high affinities (e.g. 15–18), in the nanomolar range.

This new generation of antibody phage display libraries represents an attractive alternative to classical animal-based approaches. We thus decided to apply the recombinant antibody phage display approach to the study of intracellular compartments, and explored the possibility of obtaining specific antibodies by screening the library against intact organelles or other complex mixtures of antigens. *In vitro* selections of antibodies were carried out using mixtures of microtubule-binding proteins or intact Golgi complex preparations as targets. The generation of specific antibodies was successful for every target that we studied.

1

2

We report here the following results: (i) high-diversity antibody phage display libraries make it possible to obtain antibodies that can be used efficiently in classical cell biology experiments; (ii) antibodies directed against proteins known to be poor immunogens in animals can easily be obtained *in vitro*, even when 'immunizing' with a complex mixture of proteins; (iii) the *in vitro* selection preserves the membrane-bound organelles in their correct topology and keeps the antigens in their native context throughout the selection, which may be particularly valuable in generating antibodies against transmembrane proteins; and (iv) additional applications of these immunological tools can be set up, and the technique opens up avenues in cell biology to explore the functions of endogenous proteins *in vivo*. For example, intracellular expression of a GFP-tagged scFv directed against the Golgi matrix protein Giantin allowed us to study the dynamics of the endogenous protein within living cells. In summary, we show that the antibody phage display strategy is an efficient way to revisit the classical antibody approach and will bring unique tools to address cell biology questions.

Results

Selection of anti-MBPs scFvs

To evaluate the possibility to obtain recombinant antibodies directed against a natural and complex mixture of proteins specific for a subcellular compartment, we first selected antibodies against Microtubule-Binding Proteins (MBPs) purified from HeLa cells. When the same protein fraction was injected in animals, the main targets of the polyclonal serum were identified as MAP-4, CLIP-170 and EMAP-115 (4). The Griffin.1 library, an M13-based library displaying single-chain Fv fragments (or scFvs) was screened against a HeLa MBP fraction coated on polystyrene tubes by three successive rounds of affinity selection and amplification (Figure 1A). We compared conditions of coating and observed that 10 µg of MBPs are sufficient to carry out each round of selection, and we obtained specific monoclonal antibodies within 1 week (see Materials and Methods). The phage recovery yield increased from round 1 to round 3 (Figure 1B), which is a good indication of an effective selection. We thus stopped the selection at round 3 and randomly chose 160 clones of *Escherichia coli* (each secreting one scFv). One-third of the scFvs detected MBPs by ELISA, Western blot and immunofluorescence. Other antibodies were only usable in one or two of these immunological methods. We systematically tested culture supernatants by Western blot and observed that about 25% of the antibodies were directed against proteins in the 50 kDa range. The other targets were in the range of 150–200 kDa; a Western blot using 60 different scFvs is shown in Figure 1(C).

None of the major proteins present in the MAP fraction (e.g. MAP-4, Kinesin, Dynein, EMAP-115) were the targets

of our antibodies, as suggested by the molecular weight of most of the targets and by specific ELISA experiments done using purified fragments of these proteins (data not shown). Rather, we showed that all the antibodies directed against the 50 kDa target proteins were anti-tubulin antibodies. All were specific for α -tubulin, as exemplified by the F2C clone (Figure 1D), except for S11B which recognizes β -tubulin (Figure 1D). It is worth noting that, although only a small fraction of the tubulin used to pellet MBPs was present in the MBPs fraction, it still represented about 10% of total MBP preparations (data not shown). Interestingly anti-tubulin antibodies are almost never obtained after injection of native tubulin in animals, probably because it is a well-conserved protein against which the immune system is tolerized. This is obviously not a concern with our *in vitro* approach, since anti-tubulin scFvs can be obtained efficiently. These anti-tubulin recombinant antibodies provided useful comparisons to their animal-generated antibody counterparts under standard Western blotting and immunofluorescence conditions (Figure 1D,E), demonstrating that *in vitro* selected scFvs have similar sensitivity and specificity as traditional antibodies.

To characterize the scFvs specific for high molecular weight proteins, the corresponding scFvs were mixed (Figure 2A, lane 1) and used to screen a HeLa cDNA expression library. A single clone was immunoreactive, and sequencing of the corresponding cDNA showed that it encodes part of the coiled-coil region of the microtubule-associated protein p150^{glued}, a component of the dynactin complex (19,20). The S11E scFv was found to be responsible for this recognition and, as expected, detects a 150-kDa protein on Western blot as well as a fainter ~130-kDa protein (Figure 2A, lane 2). In addition, S11E immunofluorescence staining (Figure 2B) completely overlaps with the one obtained with a polyclonal anti-p150^{glued} antibody and recapitulates dynactin localization at the centrosome, microtubule plus ends (Figure 2Ba,c) (21,22) and kinetochores (Figure 2Bb,d) (23). Transfection experiments also indicated that S11E efficiently recognizes overexpressed p150^{glued} on microtubule bundles (data not shown).

Altogether, this screen showed that *in vitro* selection of antibodies can be used to 'immunize' against complex mixtures of target proteins and the Griffin.1 library of recombinant scFvs is sufficiently diverse to yield specific antibodies that can be effectively used in classical cell biology techniques, as discussed below.

Golgi matrix screen: selecting antibodies against antigens in their native context

To characterize proteins localized in the Golgi periphery, and in particular those localized in the so-called Golgi matrix (3,24,25), the Griffin.1 library was screened against

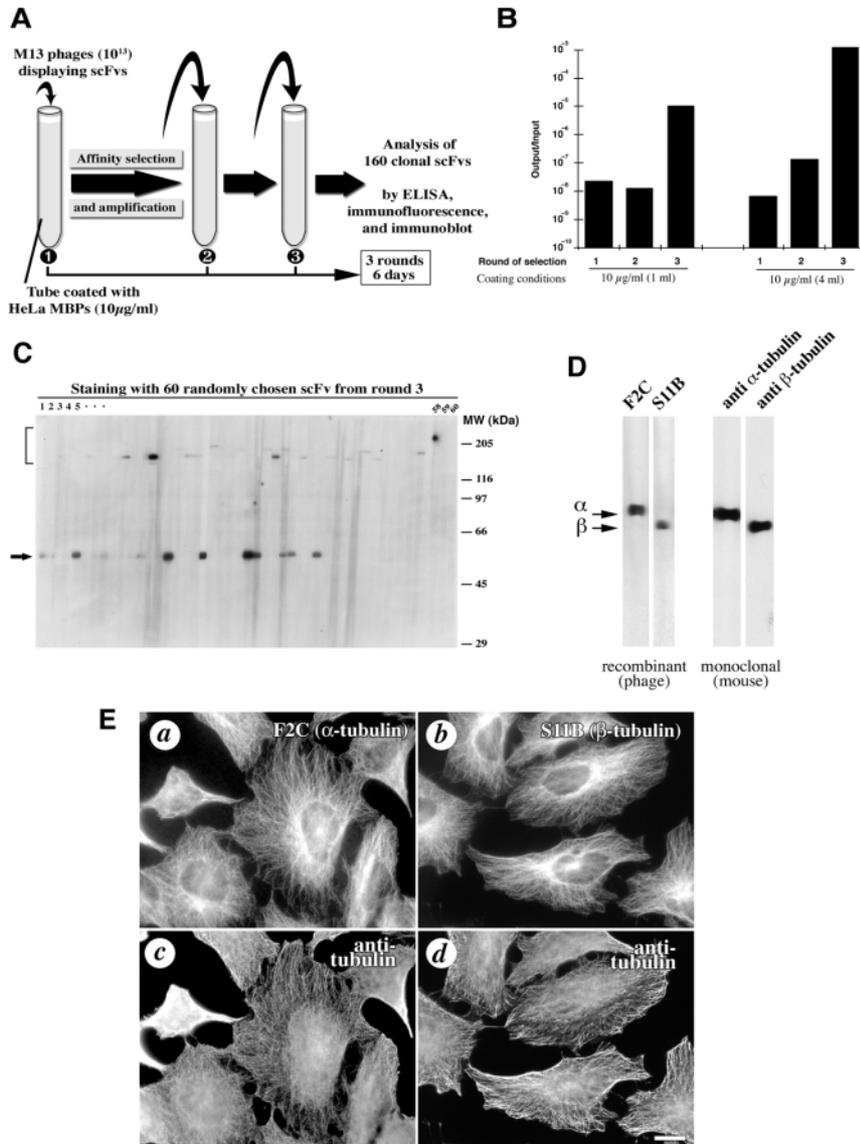


Figure 1: Antibody phage display screen against microtubule-binding proteins.

A. A combinatorial library of phage displayed-recombinant antibodies was screened *in vitro* against purified microtubule-binding proteins coated onto immunotubes. 10^{13} phages, each presenting one of the 10^9 scFvs from the Griffin.1 library, were selected by three successive rounds of affinity selection and amplification of the selected pool (rounds 1–3 indicated by black circled numbers). One hundred and sixty clones were then randomly chosen from the selected population and analyzed by ELISA, immunofluorescence and Western blotting. B. The phage recovery yield increased at least 10-fold for both independent screens at the third round, when specific clones become sufficiently enriched, suggesting that selection was achieved at the third round. C. HeLa MBPs were blotted on nitrocellulose filters after SDS-PAGE separation and the blot was cut into 1.5-cm stripes. Each stripe was incubated with antibody-displaying phages produced by randomly chosen clones from the third round. Positive clones detect 50 kDa (arrow) and 150–200 kDa proteins (bracket). D. Clones F2C and S11B detect α and β -tubulin, respectively, on Western blots (2 left lanes). Monoclonal antibodies (SIGMA) were used as a control to detect α and β tubulin (2 right lanes). E. F2C and S11B stain microtubules by immunofluorescence in HeLa cells. Cells were fixed in methanol at -20°C for 4 min and stained with anti-tubulin scFvs F2C and S11B (complexed with the polyclonal anti-myc 9E10) together with the polyclonal anti-tubulin T13. Bar = $10\mu\text{m}$.

purified intact Golgi complexes (Figure 3). As above, this type of preparation has been previously used to immunize rabbits (5), but the *in vitro* approach overcomes some of the limitations of animal immunization and gives the unique opportunity to preserve both the topology of membranes and the conformation of antigens.

Golgi complexes were purified from rat liver (26); this purification procedure provides a highly enriched organelle preparation that is well preserved both morphologically and functionally (27–29). To ensure short washing steps and a good preservation of membranes, rat liver Golgi (RLG) stacks were gently biotinylated and attached to streptavidin-coated magnetic beads to ensure nearly 100% recovery of Golgi (Figure 3). Only $10\mu\text{g}$ of RLG

were used for each cycle, and to avoid nonspecific adsorption, low concentrations of weak detergents (0.1% Tween20 or 0.05% saponin) were used, which did not significantly alter the RLG composition as assessed by Coomassie Blue pattern analysis. Two independent screens were done in parallel and after 3 selection rounds the phage recovery yield increased for both screens (Figure 3B). One hundred and sixty clones were randomly chosen after the third round and tested by Western blot against RLG and by immunofluorescence on HeLa cells. Identical antibody clones were obtained in the two screens.

Twenty-five per cent of the clones stained the Golgi by immunofluorescence (colocalized with the stably

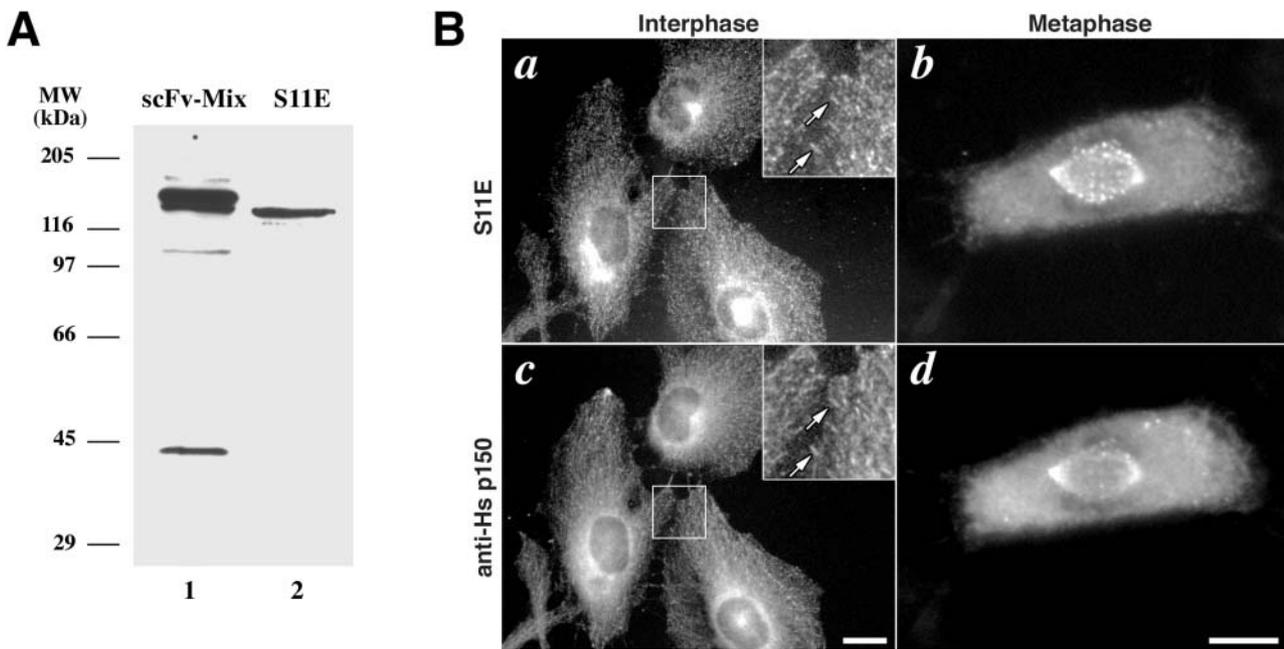


Figure 2: The scFv S11E is an anti-p150^{glued} antibody. A. A mixture of anti-MBPs scFvs detecting 150–200 kDa MBPs on Western blots (scFv-mix, left lane) was used to screen a HeLa cDNA expression library. Through this screen, p150^{glued} was found to be the target of S11E that indeed detects proteins at 150/130 kDa on Western blots (right lane). B. Immunofluorescence of HeLa cells shows that the staining of S11E (a,b) and that of a p150^{glued} polyclonal serum (c,d) colocalize at the centrosome and microtubule plus ends (arrows in the magnified region shown in the inset) in interphase (a,c) and at kinetochores in mitosis (b,d). Bar = 10 μ m.

expressed tagged Golgi reporter GalNacT2-GFP) (30). cDNAs encoding these positive scFvs were purified and sequenced, which enabled us to eliminate redundancies and classify clones into unique categories. This step actually constitutes a clear advantage over the traditional monoclonal approach in animals, since sequencing of the selected antibodies cDNA makes it possible to limit further studies to unique clones.

Only a minority of these anti-Golgi antibodies detected a protein on Western blots (Figure 3C). As exemplified by the TA10 category, the major group (80%) of antibodies detected a 350–400-kDa protein (Figure 3Ca, inset) with identical motility to the Golgi matrix protein Giantin (31) (as evidenced by Western blotting using a monoclonal antibody, data not shown). *In vitro* tryptic digestion and subsequent MALDI-TOF mass spectrometry confirmed the identity of the co-migrating protein. It is worth noting that, although Giantin seems to be the major target in our screens (3 distinct scFv clones, among which TA10 that was recovered 12 times out of 160 clones screened), it is not abundant in RLG. By immunofluorescence, the staining obtained with TA10 surrounds that of luminal markers like the Golgi enzyme GalactosylTransferase (GalT, Figure 3Ca,d). This characteristic outlining pattern is also observed with anti-Giantin antibodies.

Clone TE5 also stained the Golgi with a Golgi outlining pattern (Figure 3Cb,e), although less defined and noisier than that of TA10. By Western blot, TE5 detected an

~80 kDa protein (Figure 3Cb) which co-migrated with the Golgi matrix protein Golgin 84 (as identified by mass spectrometry). We also observed that the TE5 target is sensitive to 0.5% Triton X100 extraction in RLG, but not to carbonate (pH = 11) or salt extraction (1 M NaCl), a property that is shared by Golgin 84 (data not shown) (32). However, preliminary experiments using siRNA (siRNA0 (33), done as described in Diao et al. (34), indicate that TE5 does not detect Golgin 84 by immunofluorescence.

Finally, another class of recombinant antibodies (2 distinct clones), exemplified by the SF9 scFv (Figure 3Cc), detected a 200-kDa protein that was identified by mass spectrometry analysis and found to be nonmuscle Myosin IIA (nmMyoIIA), an abundant protein in RLG that has been involved in post-Golgi traffic (35,36). The corresponding immunofluorescence pattern showed an actin stress fiber-like staining, consistent with the identified target (35,36), but no clear Golgi staining could be observed. In contrast, by immunoelectron microscopy, SF9 stains fibrous structures associated with purified RLG (A.R., C.N., B.G., F.P. unpublished observation). It is thus not clear whether the 200-kDa nmMyoIIA was a contaminant in our RLG, whether nmMyoIIA has both a Golgi and a cytoplasmic localization in HeLa cells, or whether our scFvs cross-react with another myosin in the cytoplasm.

The majority of clones detecting the Golgi apparatus by immunofluorescence do not detect a protein on Western

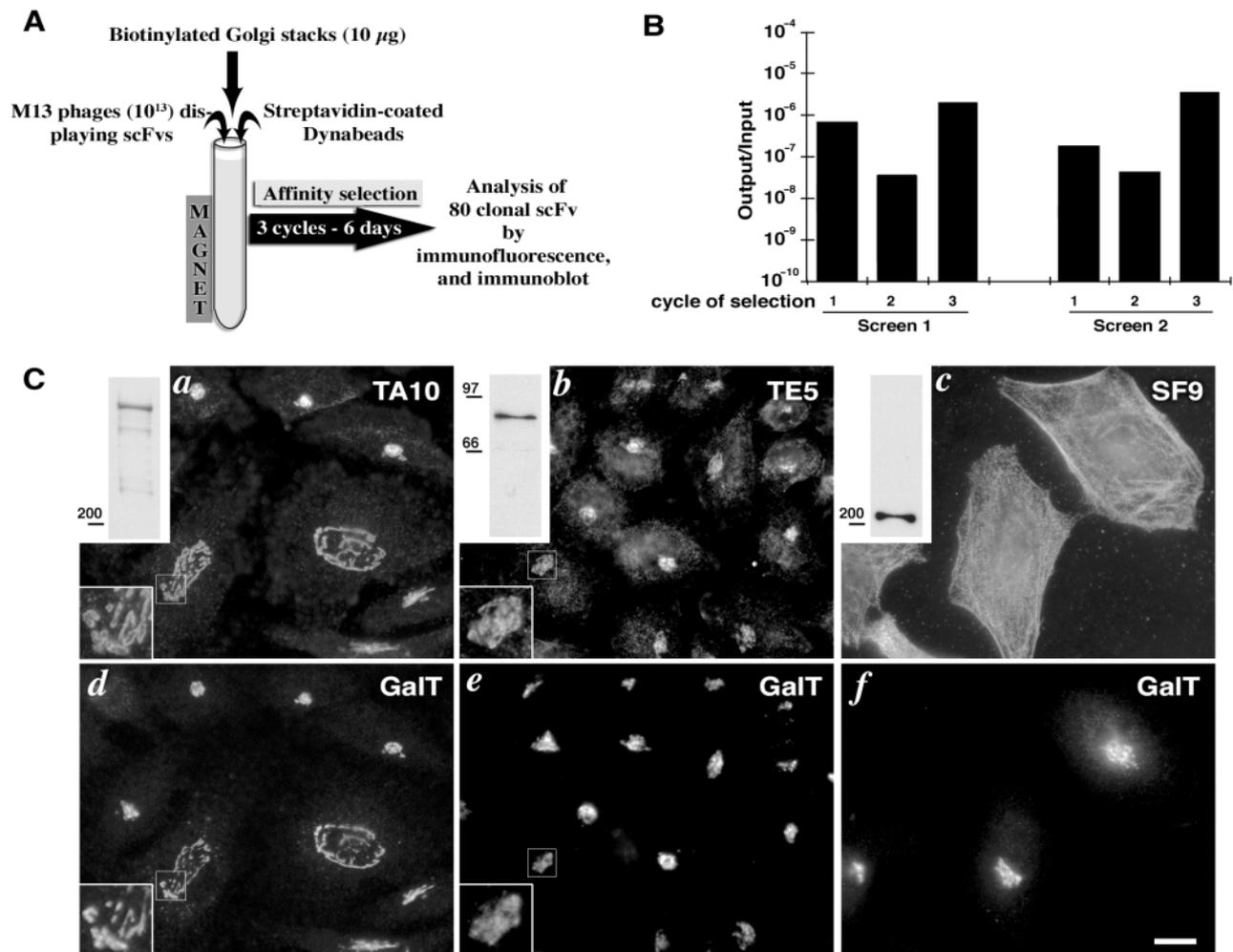


Figure 3: Antibody phage display screen against Golgi stacks. A. The Griffins.1 library was screened against intact Golgi stacks purified from rat liver, biotinylated and presented on streptavidin-coated magnetic beads in native conditions. B. The selection yield increased at the third round in two independent selections, indicating the enrichment in positive clones. C. Clones TA10, TE5 and SF9 detect, respectively, 400 kDa, 85 kDa and 200 kDa proteins by Western blotting of RLG (insets in the upper left of a–c). These proteins were found to be Giantin, Golgin 84 and non-muscular myosin IIA, respectively. Immunofluorescence of HeLa cells shows that TA10 staining outlines the Golgi labeled with an anti-GalT polyclonal serum (a,d), TE5 stains the Golgi with a similar outlining pattern (b,e) and SF9 stains actin stress fiber-like structures (c,f). Bar = 10 µm.

blots against RLG (9 distinct clones). Our selection conditions on Golgi stacks may thus favor the production of antibodies against native epitopes. Immunoprecipitation experiments are under way to determine the remaining targets, and this bias towards native epitopes has allowed us to use the selected scFVs as ‘intrabodies’ (see below).

scFvs detect Giantin at the Golgi outmost periphery

The immunofluorescence and Western blot analysis strongly suggested that the TA10 class was directed against Giantin. A clear colocalization between TA10 and anti-Giantin staining was observed by immunofluorescence (Figure 4a,b). As expected, TA10 staining of HeLa cells decreases by more than 90% in at least 99% of cells (Figure 4b,e, arrows) upon knocking down Giantin

expression using a specific siRNA. A similar decrease was observed using a monoclonal anti-Giantin antibody (Figure 4a,c, arrows). Under the same conditions, no decrease in staining of the control Golgi proteins, GalT and GM130, was observed (Figure 4d,f,h).

Giantin may form long rods (37,38) that protrude away from the Golgi apparatus and represent the most accessible molecule on the Golgi periphery, consistent with its function as a tethering factor (27,39,40). As we screened in native-like condition, it is likely that the antibodies displayed on phages during the selection had access to similar targets as proteins present on Golgi-targeted vesicles, and not to more abundant but less accessible antigens. This outer layer of the Golgi periphery, comprising

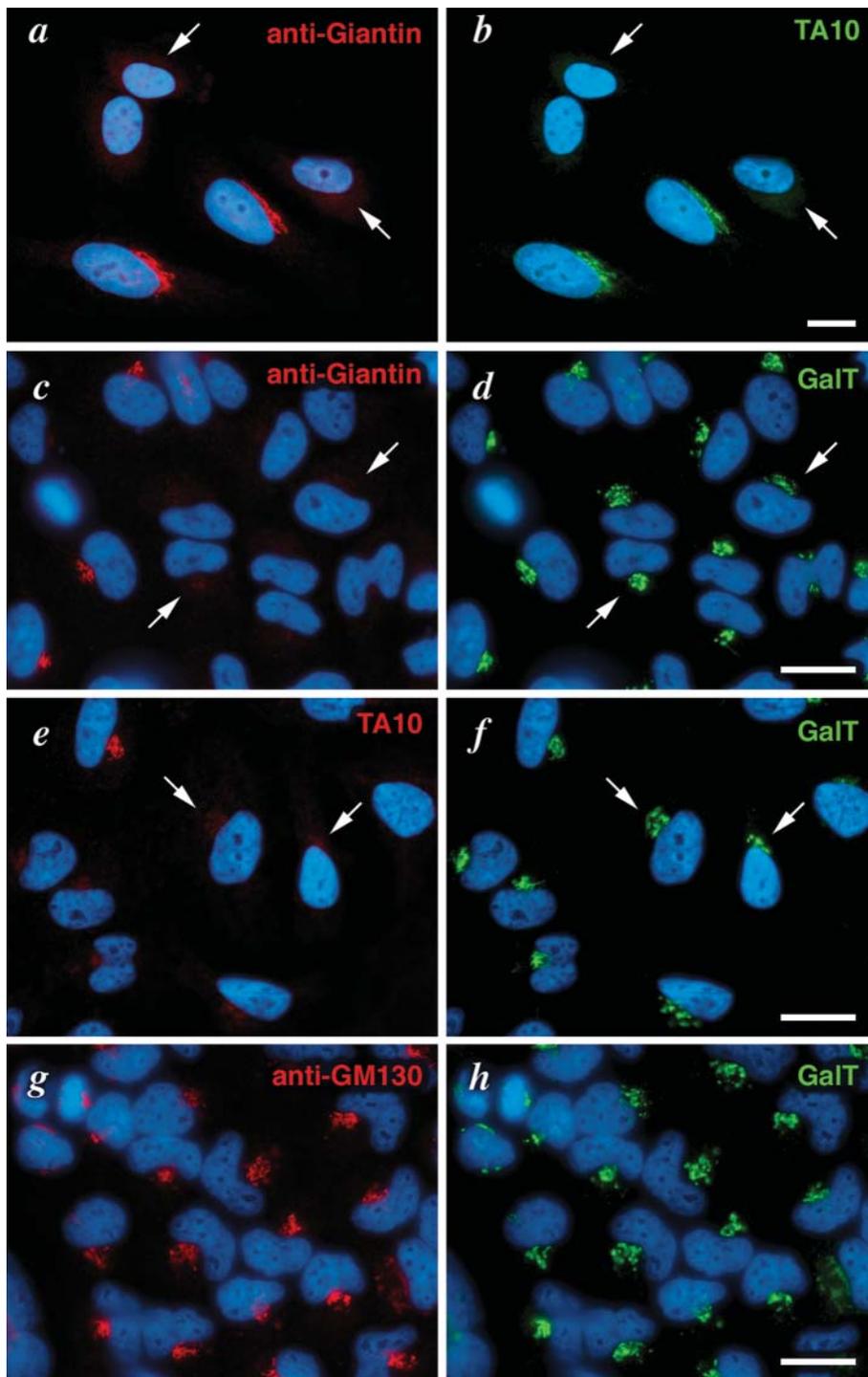


Figure 4: TA10 staining is sensitive to siRNA-based Giantin depletion. In HeLa cells depleted of Giantin by siRNA (arrows), the overlapping staining of TA10 and monoclonal anti-Giantin (a,b) decrease in comparison to control cells. This is not due to a general effect on the Golgi since the GalT staining is not affected by Giantin siRNA treatment in cells where a monoclonal anti-Giantin (c,d) and TA10 immunofluorescence signals (e, f) are strongly decreased. The staining of another Golgi matrix protein, GM130 (g,h), is not affected by Giantin siRNA treatment. Bar = 10 μ m.

Giantin, would represent the first set of proteins encountered by a vesicle or a molecule approaching the Golgi apparatus.

scFvs as tools to track endogenous proteins in living cells

A clear advantage of recombinant antibodies over classical antibodies lies in the ability to genetically engineer and

express them as 'intrabodies' within the cytoplasm of cultured cells, and thereby target the corresponding endogenous antigens. The intracellular expression of recombinant antibodies has been successfully applied in cultured cells (10,41–43) and developing organisms (44) essentially to block the endogenous target protein's function. This application is very often limited by the sensitivity of scFvs to the reducing environment of the cytosol, and specific

methods have been developed to overcome this limitation (45–47). Accordingly, the scFvs we have selected from the Griffin.1 library so far, and expressed intracellularly, do not inhibit their endogenous target function. We, however, observed that some of these scFvs can anyway be used to detect their endogenous target upon intracellular expression, and can in turn be used to track endogenous protein dynamics (see Discussion).

In particular, intracellular expression of myc-tagged anti-Giantin TA10 indicated that this antibody interacts with its target *in vivo* (data not shown). The dynamics of Giantin *in vivo* have not been documented before, possibly because the very big size of Giantin complicates its tagging, and TA10, after fusion to a fluorescent protein, may thus give the opportunity to follow Giantin in living cells. In addition, imaging using TA10 intracellular expression would give access to the behavior of endogenous Giantin and not of an overexpressed and tagged recombinant protein, and we have shown in a recent study that these methods can give significantly different results (48). The GFP-tagging of scFvs and subsequent production of scFv-GFP fusions in bacteria have already been described as a method to obtain directly fluorescent scFvs that retain the functionality of the original scFvs *in vitro* (49,50), and such scFv-GFP fusions have also been shown to function *in vivo* (51), although we were first to use them to follow endogenous protein dynamics in living cells (48). TA10 was thus subcloned in 'xFP' (CFP, GFP, YFP)-tagging vectors, and transfected in HeLa cells. TA10-xFP overexpression did not affect the localization of Giantin or the overall morphology of the Golgi complex, as assessed by immunofluorescence of various markers, and no perturbation of membrane traffic could be observed.

TA10-xFP expressed in cells stains the Golgi with the characteristic Golgi outlining pattern observed by classical immunodetection of Giantin (Figures 5,6 and 7). Real-time observation of TA10-xFP dynamics showed that Giantin staining in living cells is very static, with few non-Golgi structures labeled and extremely limited motility around the Golgi (Figure 5B and supplemental movie Fig5Bvideo1.mov).

We then characterized endogenous Giantin dynamics upon perturbation of ER/Golgi transport. GalNacT2-CFP (30) and TA10-YFP were coexpressed in HeLa cells and observed during Brefeldin A (BFA)-treatment (Figure 6). As described by Sciaky et al. (52), with a short incubation time BFA induces the formation of long tubules, positive for GalNacT2-CFP, that emanate from the Golgi. Strikingly, and in contrast to other Golgi matrix proteins (53), Giantin does not localize to these tubules. With longer incubation time (5–20 min) both juxtannuclear TA10-YFP and GalNacT2-CFP fluorescence signals decrease suddenly and simultaneously (Figure 6 and supplemental movie Fig6video2.mov). This already described BFA-induced blink-out effect, which is due to sudden diffusion of Golgi proteins

into the ER, can be observed in microtubule-deprived cells (52), and does not seem to depend on the formation of tubules. Thus, Giantin is a transmembrane Golgi matrix protein that 'blinks out' and redistributes to the ER upon BFA treatment, without localizing to microtubule-dependent tubules.

We also compared the behavior of endogenous Giantin and recombinant GalNacT2 in response to microtubule depolymerization (Figure 7). Upon Nocodazole addition, GalNacT2-CFP appears gradually in scattered Golgi mini-stacks after its recycling through the ER as documented before (30,54). In contrast, Giantin remains localized to the slowly fragmenting 'old Golgi' and is absent of scattered Nocodazole-induced mini-stacks (Figure 7A and supplemental movie Fig7video3.mov). We further confirmed this result by immunofluorescence of wild-type cells treated with Nocodazole. While the mini-stacks are positive for Golgi enzymes or GM130, for example, they are not stained by anti-Giantin antibodies (Figure 7B). This indicates that Giantin does not rapidly recycle through the ER, and may indeed define a more stable Golgi matrix. This also suggests that the layered structure of the Golgi mini-stacks and their function in anterograde (30,54) and retrograde (55) transport do not require the function of Giantin (39).

Discussion

An antibody-phage display approach for cell biology

Our study shows that the recombinant antibody approach can be efficiently applied to cell biology to generate antibodies *in vitro* against antigens purified from intracellular compartments (see Table 1). The *in vitro* technique required only a few micrograms of purified target antigen and involved standard molecular biology protocols, obviating the lengthy and costly methods associated with generation of monoclonal antibodies in animals. The quantity of antigen required for a complete screen is at least 10-fold lower than for injection in animals. In addition, bypassing the traditional animal approach has allowed us to overcome the low immunogenicity of certain well-conserved antigens such as tubulin. A major advantage of the *in vitro* selection process is the extensive control of the selection conditions, which, for example, allowed us to preserve the topology of Golgi membranes and target the exposed regions of proteins in their native conformation. All antibodies we have obtained are indeed directed against the periphery of purified Golgi stacks. However, the *in vitro* selection by phage display also has its own biases. It is clear from the MBP screen that certain proteins (e.g. MAP4, kinesin, dynein), abundant in the fraction, were not antigenic *in vitro*. In addition, we have noticed that scFvs detect the target antigen better in conditions that resemble those of the selection: if the antigen is coated onto immunotubes, and therefore likely denatured during

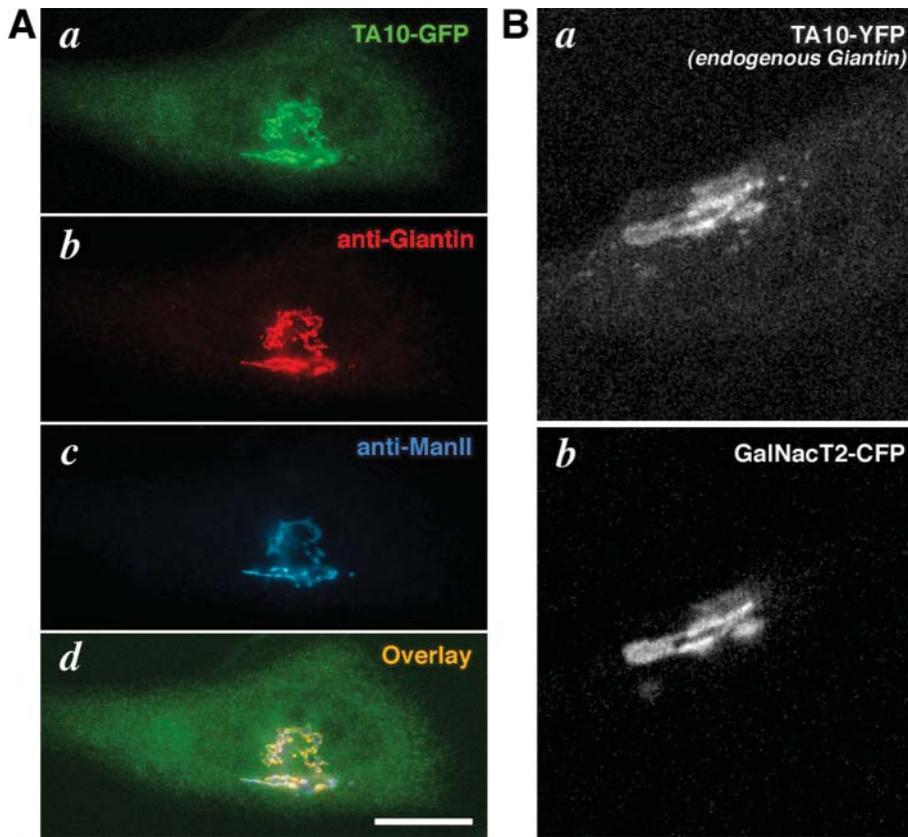


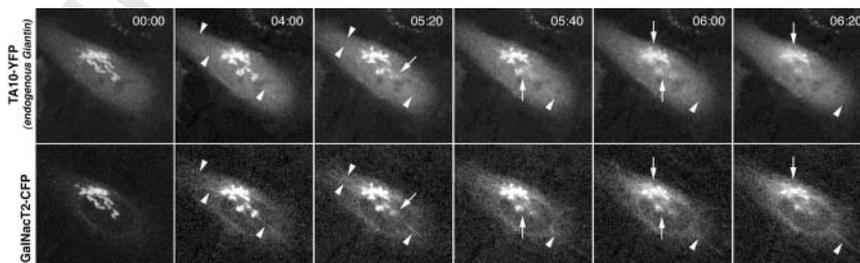
Figure 5: Monitoring endogenous Giantin dynamics *in vivo* by intracellular expression of the TA10-xFP intrabody. A. TA10-GFP was expressed in HeLa cells which were fixed with 3% paraformaldehyde 24 h later and processed for immunofluorescence using anti-Giantin and anti- α -Mannosidase II antibodies. TA10-GFP interacts with its target *in vivo* (a) and the GFP fluorescence colocalizes perfectly with the anti-Giantin staining (b) and outlines the α -Mannosidase II Golgi staining (c). The overlay of the three stainings is shown in (d). Bar = 10 μ m. B. Endogenous Giantin detected by TA10-YFP (a) outlines the Golgi stained with GalNacT2-CFP (b) in living HeLa cells. HeLa cells were cotransfected with TA10-YFP and GalNacT2-CFP and time-lapse-imaged on a confocal microscope (see Supplemental Movie Fig5video1.mov).

the selection, selected scFvs tend to work more often for Western blotting than for intracellular expression for instance (MBP screen), and the opposite holds when the antigen is preserved in native conditions and bound to magnetic beads during the selection (Golgi stacks screen).

Such an approach would probably not have been possible using the initially developed low-diversity (e.g. 10^7) libraries. The construction of several high-diversity (e.g. 10^9) libraries suggests that this approach may now provide unique tools that can be used in classical immunological

Figure 6: Behavior of endogenous Giantin *in vivo* upon BFA treatment.

HeLa cells coexpressing the Golgi localized marker GalNacT2-CFP together with TA10-YFP were treated with BFA and immediately followed by confocal time-lapse imaging every 20 s. The initial image (00:00), acquired at a lower scanning rate, and hence of better quality, shows that endogenous Giantin detected by TA10-YFP outlines the Golgi staining of GalNacT2-CFP. GalNacT2-CFP-positive tubes emanating from the Golgi at early time points (04:00) and moving towards the periphery are devoid of endogenous Giantin (arrowheads). With longer incubation (05:20 to 06:20): GalNacT2-CFP and endogenous Giantin simultaneously blink out (arrows) as Golgi membranes suddenly fuse with the ER (see Supplemental Movie Fig6 video2.mov). Time is indicated in MM:SS. Bar = 10 μ m.



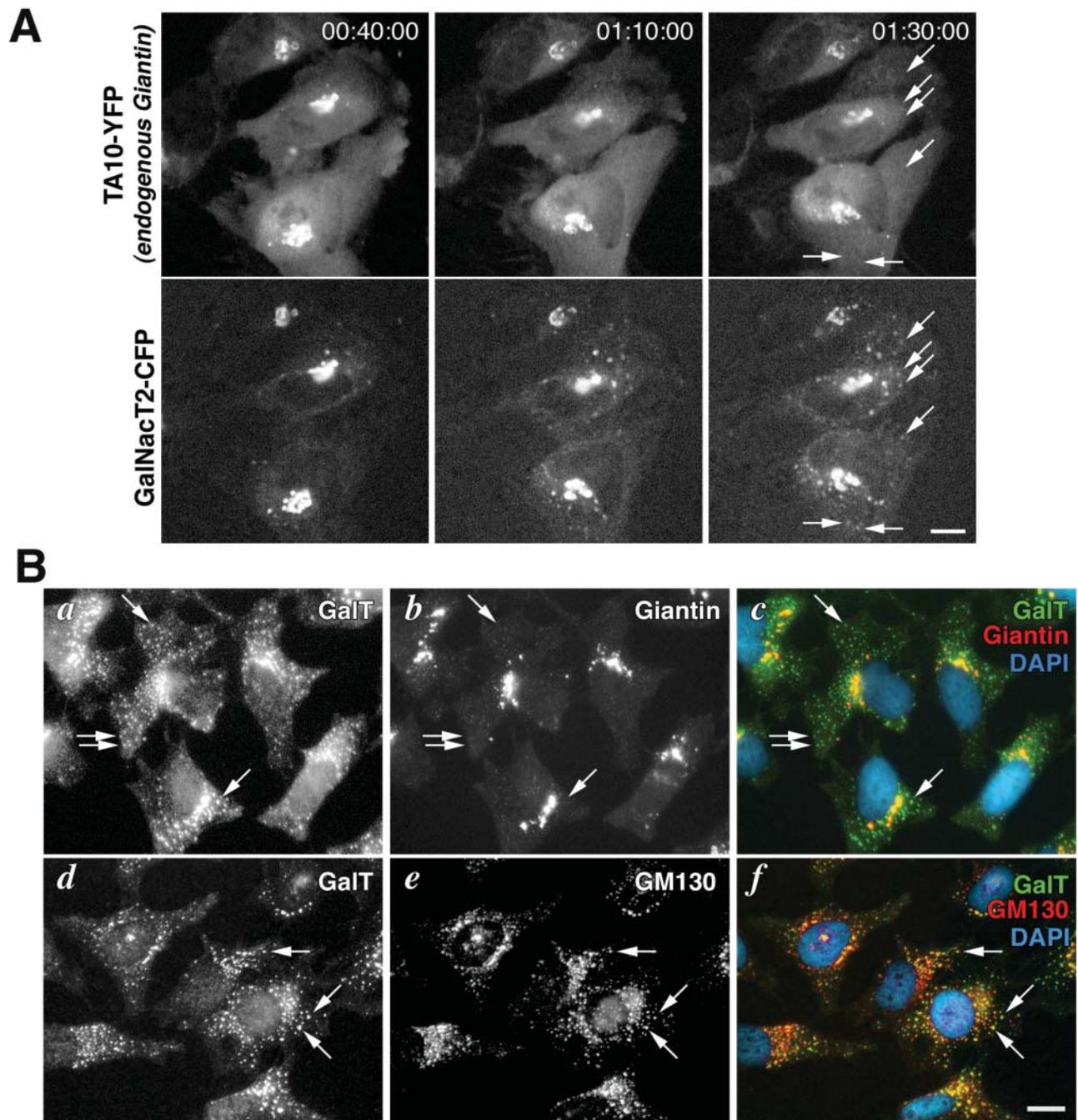


Figure 7: Behavior of endogenous Giantin *in vivo* upon microtubule depolymerization. A. HeLa cells coexpressing the Golgi marker GalNacT2-CFP and TA10-YFP were treated with Nocodazole and immediately confocal-imaged every 30 s for 90 min. Golgi mini-stacks which appear at the cell periphery are labeled with GalNacT2-CFP, likely because this marker recycles through the ER and accumulates on scattered, *de novo* formed, Golgi mini-stacks (arrows). In the same conditions, endogenous Giantin detected by TA10-YFP does not localize on these mini-stacks (arrows), but rather remains localized on the 'old Golgi' that slowly fragments upon Nocodazole addition (see Supplemental Movie Fig7video3.mov). Time is indicated in HH:MM:SS. B. Nocodazole treatment was repeated on wild-type HeLa cells and analyzed by immunofluorescence of endogenous proteins after fixation in Methanol. After 90 min of treatment, endogenous GalT (a, d) and GM130 (e) label scattered Golgi mini-stacks present in the cell periphery (arrows). In the same conditions, endogenous Giantin (b) is only detected on the 'old' Golgi that remained localized in a juxtannuclear region. Bars = 10 μ m.

methods, but also in more specific applications. Clearly, the quality of the antibody library constitutes a critical ingredient for this technique, and other high-diversity

libraries different from the Griffon.1 library should be carefully evaluated before use. Recombinant antibodies offer the advantages of large production at very low cost (see

Table 1: scFvs identified in this study

Name	Accession number	Target
F2C	AY348545	α -tubulin
S11B	AY348546	β -tubulin
S11E	AY348547	p150 ^{glued}
TA10	AY348549	Giantin
TE5	AY348550	? (Golgi matrix protein)
SF9	AY348548	Non muscle Myosin IIA

Material and Methods), and they can be genetically manipulated with ease. scFVs from the Griffin.1 library are of human origin but their detection is largely species-independent, depending only on the way the scFv tag is detected (see Figures 3 and 4). In addition, the detection tag can be changed, the scFvs can be multimerized, for example upon fusion to streptavidin (56), or they can be subcloned in eukaryotic expression vectors to be used as intrabodies (9,10). They can be easily detected, purified, and recovered during immuno-precipitation experiments using, for example, their His₆ affinity tag. Interestingly, we have observed on nonreducing SDS-PAGE Western blots of unboiled samples that the best antibodies identified by our procedure were able to spontaneously form 60-kDa dimers, which may increase their avidity (data not shown) (57).

In vivo study of endogenous proteins

The use of intrabodies has been described before and shown to be particularly valuable in the case of blocking – or perturbing – antibodies (9,10). Even non-blocking antibodies can be used to perturb their target's function by redirecting the antibody/target complex to irrelevant cellular compartments (58). This application is still limited by the frequent sensitivity of scFvs to the reducing environment of the cytosol, and a significant proportion of scFvs obtained from naive libraries may require further refinement to be used as functional intrabodies. However, we developed a new application of intrabodies to track intracellular protein dynamics. Setting up these experiments, we observed that the proportion of antibodies able to detect their target upon intracellular expression is far higher than the proportion of blocking antibodies, and indeed none of the scFv we selected so far show a strong [8] perturbing phenotype (data not shown) (48). Consequently, the success rate of intracellular expression of scFv may have been underestimated when 'target inactivation' was the reference. The increased proportion of intracellularly functional scFv may also be due to a bias towards reduction-resistant scaffolds in the Griffin.1 library, to our native-like *in vitro* selection conditions, to our intracellular expression conditions (e.g. the C-terminal tags of the scFv that were present in the phage display vector were retained in the expression vector, xFP may stabilize scFv), and to the fact that only moderate expression is sufficient to track endogenous protein dynamics compared to high expression levels required to block the target protein's function.

This allowed us to express xFP-tagged scFvs in live cells and follow the behavior of the endogenous target proteins. While GFP-tagged scFvs have been used before *in vitro* (49) and in transfected cells (51), nobody so far has followed xFP-tagged intrabodies dynamics in living cells to follow the dynamics of endogenous proteins. Using this method, we tracked the behavior of endogenous Giantin (see Figures 5, 6 and 7) and nmMyoIIA (with the SF9-xFP intrabody, data not shown). This technique may be particularly interesting when GFP-tagging of a recombinant protein cannot be used to track its *in vivo* dynamics, because, for example, it cannot be tagged without losing its function, or because its overexpression modifies its behavior, a possibility that has been considerably neglected since the advent of the GFP-based technology.

The use of xFP-tagged recombinant antibodies allowed us to describe for the first time the behavior of endogenous Giantin, which is a very large protein of 400 kDa that has never been expressed as a GFP-tagged molecule. Using xFP-tagged anti-Giantin TA10, we observed that Giantin is a very static Golgi protein at steady state. Although it is considered to belong to the Golgi matrix (25) and presumably because it is a transmembrane protein (59), it is transported back to the ER in the presence of BFA as the Golgi 'blinks out'. Another Golgi matrix protein, GRASP65, when expressed as a recombinant GFP-tagged chimera, was observed to behave differently (53): it was present on BFA-induced membrane tubules and accumulated at ER exit sites before Golgi blink-out. This difference in behavior may be due to the fact that GRASP65 is not a transmembrane protein and that GRASP65-GFP exchanges rapidly with the cytosol (53), which may accelerate its relocalization to peripheral structures before Golgi blink-out. These results correlate with the observation that, at steady-state, the Golgi matrix GM130 and GRASP65 are present on membrane tubules that cycle between the *cis*-Golgi and a 'late intermediate compartment' (60), whereas Giantin seems to remain statically localized at the Golgi (see Figure 5B and supplemental movie Fig5Bvideo1.mov). Importantly, it is also possible that the dynamics of overexpressed fluorescent chimeras of GM130 and GRASP65 do not behave as their endogenous counterparts and, in the case of Golgin84, it has been directly shown that expression of GFP-Golgin84 actually perturbs Golgi dynamics (61). Thus, an overexpressed GFP-tagged Giantin could behave similarly to other GFP-tagged Golgi matrix proteins, and, for example, localize to Golgi tubules. In contrast, our method faithfully describes the dynamics of the endogenous protein. In a separate study, we indeed report that endogenous proteins and even slightly overexpressed corresponding GFP-tagged reporters have clearly distinct dynamics *in vivo* (48).

Moreover, the behavior of Giantin differs from that of other Golgi matrix proteins in response to microtubule depolymerization. Very little or no Giantin recycling to the ER seems to occur at steady-state, since it does not accumu-

late at Golgi mini-stacks upon Nocodazole-induced microtubule depolymerization. In contrast to the Golgi matrix protein GM130 or the Golgi enzyme GalNacT2, Giantin remains localized on the 'old' fragmented Golgi. This result partially supports the conclusions of Sar1p^{dn}-induced ER exit block experiments (62), which indicated that Giantin recycles less than GalNacT2 but as much as GM130 from the Golgi to the ER. Interestingly, the Nocodazole experiments reported in Figure 7 suggest that the function of Giantin is not necessary for the assembly of the mini-stacks. Our siRNA knock-down experiments actually support the view that large amounts of Giantin are not necessary for normal Golgi localization and structure at the immunofluorescence level, and this was also suggested before using an antibody injection method (63).

The stable localization of Giantin on the outermost periphery of Golgi membranes may not only act as a tether for incoming vesicles (40,64) but also as a scaffold for other peripheral Golgi proteins. Interestingly, Giantin may have been the major target of the *in vitro* selections because it is the most accessible protein of the Golgi periphery, and, somehow, the antibodies displayed on phages behaved like Golgi-targeted vesicles and interacted essentially with Giantin on the Golgi surface. This suggests that the phage display approach may thus help to describe 'topologically' the surface of a membranous compartment.

In conclusion, we show here that the antibody phage display represents a powerful technique in the context of cell biology. This approach makes it possible to select rapidly for versatile antibodies that can be used not only in classical immunological methods, but also *in vivo* as fluorescent intrabodies to probe endogenous protein dynamics. Since the selection is done in test tubes, any protocol can be quickly tested to select for particular binding partners, and we show that purified subcellular compartments can be used as a target. In a separate study, we report that the antibody phage display approach can also be used to generate conformation-specific antibodies (48). Altogether, our study shows that the antibody phage display will renew the classical immunological approach and that its applications will provide cell biologists with new tools in probing *in vivo* functions of proteins.

Materials and Methods

MBP and Golgi membrane purification and biotinylation

Microtubule-binding proteins were purified from HeLa S3 cells as described (4) and the presence of expected MBPs in this preparation (EMAP115, CLIP-170, MAP4, Kinesin Heavy Chain I), as well as the absence of other proteins (Vimentin, β COP), was confirmed by Western blot. Tubulin and actin were found in this MBP preparation. MBPs were used at 10 μ g/ml without further modification for antibody phage display screening.

Rat liver Golgi (RLG) complexes were purified as described (26), snap frozen in liquid N₂, and kept at -80°C . RLG membranes were resuspended in PBS at 4°C and kept on ice during subsequent steps. They were then incubated at 1 μ g/ μ l in PBS containing 0.01 μ g/ μ l NHS-biotin (Pierce, Rockford, IL, USA), and the reaction was blocked after 10 min by adjusting to 15 mM glycine. RLG membranes were then washed three times in PBS by centrifugation at 22 000 *g* for 30 min on a sucrose cushion, resuspended in PBS at 1 μ g/ μ l, and snap frozen. Ten micrograms were used per selection round. We confirmed by comparing with the 10 μ g input SDS PAGE Coomassie pattern that biotinylated Golgi was 100% recovered on 50 μ l streptavidin M280 dynabeads (Dyna, Oslo, Norway) after 30 min incubation in PBSTM (PBS + 0.1% Tween20 + 2% fat free Marvel milk) and 10 washes in PBST (PBS + 0.1% Tween20).

Phage display

MBP preparations were coated at 10 μ g/ml on immunotubes (in 1 ml or 4 ml in 2 independent screens) for each of the 3 rounds of selection. The selection was essentially performed as described in the protocols accompanying the Griffin.1 library (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/winter-hp.php?menu=1808>). A pre-adsorption step was done for each round in a milk-saturated immunotube to remove nonspecific binders. Owing to the high diversity of the Griffin.1 library (1.2×10^9), the first rounds of selection were done with 10^{13} – 10^{14} input phages displaying recombinant scFvs.

Anti-Golgi selections were carried out on streptavidin-coated magnetic beads (Streptavidin-M280 Dynabeads; Dynal). Phages were first preadsorbed on 0.5 mg beads resuspended in 1 ml PBSTM for 90 min end-over-end and 30 min standing at room temperature. This step ensures that no anti-beads or anti-streptavidin antibodies will be selected. In parallel, 10 μ g biotinylated Golgi membranes were bound to 0.5 mg Streptavidin-M280 (30 min, room temperature) in 200 μ l PBSTM. Pre-adsorbed phages were then incubated for 90 min end-over-end and 30 min standing at room temperature with Golgi-loaded dynabeads. Beads were washed (using a magnet) 10 times in 8 ml for the first round and 20 times for subsequent rounds in PBST, changing tubes every 3 washes. Phages were eluted twice by incubating beads with tri-ethylamine (100 mM) for 10 min before neutralizing the supernatant with 1 M Tris pH = 7.4. The second phage elution fraction was pooled with the first one for neutralization, beads were neutralized separately and all these neutralized phage fractions were used to infect *E. coli* TG1 that were finally pooled.

At the end of the three rounds of selection, clones of *E. coli* (each expressing one selected scFv) were randomly picked and arrayed in 96 deep-well plates. scFvs were

then produced and tested by immunofluorescence and Western blotting (see below). The cDNA of positive scFvs were sequenced (ABI) and this was used to identify redundant clones. The cDNA sequences corresponding to the scFvs described in this study have been submitted to GenBank (see Table 1).

Screening of HeLa cDNA expression library

Screening of the pUEX-based expression library was done as described previously (4) with the following modifications. Instead of rabbit polyclonal antibodies, PEG-precipitated phages displaying selected antibodies were used at a final concentration of 10^{13} phage/l. Saturation of nitrocellulose filters was done in PBS + 0.1% Tween20 (PBST) containing 10% bacterial extract, 2% nonfat milk, 1 mM Benzamidine and 40 μ g/ml PMSF. Washes were done in PBST containing 2% fat-free milk and 1 mM Benzamidine. The secondary antibody used to detect phages was an anti-M13-HRP (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). Positive colonies were picked, diluted, and stained twice more. One positive clone was finally isolated and the corresponding cDNA sequenced. Database analysis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) indicated that the identified cDNA was *H. sapiens* p150^{glued} (emb/X98801) and corresponded to amino acid 236–859 (first coiled-coil region up to the end of the hinge). Further analysis showed that S11E was responsible for p150^{glued} recognition.

scFv production and purification

The Griffin.1 library was constructed by inserting the recombinant antibodies in the pHEN2 vector that allows the glucose-sensitive expression of myc and His₆-tagged scFvs. pHEN2 also allows the production of scFvs fused to the pIII phage protein in amber-suppressor *E. coli* strains (like TG1), whereas in non-suppressor strains (e.g. HB2151) only soluble scFvs are produced. We observed that scFvs are secreted efficiently by *E. coli* HB2151 in the culture medium. Clones were transferred from *E. coli* TG1 to *E. coli* HB2151 by producing phages from TG1, 'sterilizing' these phages (i.e. destroying TG1 bacteria contaminating the phages) by a 10-min tri-ethylamine treatment followed by neutralization in Tris 1 M pH = 7.4, and infecting HB2151 with these phages. Routinely, secreted scFvs present in the bacteria culture medium were used undiluted for immunofluorescence or Western blotting. For large-scale scFv production, bacteria were grown shaking at 37 °C to OD = 0.2 in 500 ml 2xTY medium supplemented with Ampicillin and 1% Glucose, centrifuged for 5 min at 5000 g, resuspended in 500 ml M9 minimum medium supplemented with Ampicillin, 1 mM IPTG, 0.5 p.p.m. thiamin, 0.1% casa-aminoacids, and 0.2% glycerol as carbon source, and incubated shaking at 30 °C for 16 h.

Bacteria were then centrifuged for 10 min at 10 000 g, the supernatant was 0.2 μ m-filtered and passed twice on a 2-ml 50% slurry Ni-NTA agarose (Qiagen, Valencia, CA, USA) column (pre-equilibrated in PBS) at 4 °C. The column was

then washed with 30 ml PBS, and eluted with 500 mM Imidazole in PBS. Two hundred and fifty-microliter fractions were collected and positive fractions pooled. On average, a 500-ml culture yielded 1 ml scFv at 1–5 mg/ml, that was then divided into two fractions, one kept at –20 °C in 50% glycerol and the other snap-frozen and kept at –80 °C.

Immunofluorescence, Western blot

For immunofluorescence, scFvs from 50% glycerol stocks were used at 1/100, mixed with anti-His₆ (monoclonal from SIGMA, St. Louis, MO, USA) and/or anti-myc (9E10 monoclonal or polyclonal from MBL, Watertown, MA, USA) antibodies and incubated for 1 h on cells. We observed that for weak scFvs, mixing anti-His₆ and anti-myc antibodies greatly enhances the detection sensitivity. Cells were then rinsed once and incubated with secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, USA, and Alexa from Molecular Probes (Eugene, OR, USA).

For Western blot, scFvs from 50% glycerol stocks were used at 1/200–1/400, mixed with either anti-His₆ or anti-myc antibodies and incubated on blots for 1 h. The blot was then incubated for another 30 min with the anti-tag alone, rinsed once and incubated with secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Westgrove, PA, USA). Anti-GalT and anti-p150^{glued} polyclonals were provided by E. Berger and T. Schroer, respectively. Anti-tubulin blots were done using classical SDS-PAGE buffers, except the separating gel buffer was at pH = 9.5 to maximize the separation of α - and β -tubulin as described (65).

siRNA treatment

Single-stranded RNA oligos were obtained from Dharmacon (Lafayette, CO, USA) and ProLigo (Boulder, CO, USA), with two deoxyribonucleic acids (TT) at the 3' extremity. The sequence selected used to knock out Giantin was ACU UCA UGC GAA GGC CAA A UU (+415 from start). Oligos were annealed as described by Elbashir et al. (33) and transfected with CaPO₄ (66) by simply adding double-stranded RNA (2.5 μ g per 100-mm diameter dish) instead of DNA in the CaPO₄ precipitate. Transfected cells were processed for immunofluorescence 72 h after transfection, a time at which >99% of cells were >90% depleted of Giantin as assessed by Giantin immunofluorescence signal quantification with a monoclonal antibody from Calbiochem (San Diego, CA, USA). We observed that Giantin level was back to normal in cells cultured for 7 days after transfection. Note that in the manuscript we selected fields where cells containing normal amount of Giantin were present as a control. It does not reflect the high frequency of Giantin knock-down.

scFvs-xFPs constructions

C-terminal xFP fusions of scFvs were generated by sub-cloning scFvs from the pHEN2 vector (Griffin.1 library) into

modified pEGFP-N3, pEYFP-N3 and pECFP-N3 expression vectors (Clontech, BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA). These vectors were modified to allow for the insertion of scFvs as a NcoI/NotI fragment upstream of linker containing a myc and a His tag identical to the one found in pHEN2. scFv-xFPs are thus in a very similar context as they were in pHEN2. This may explain why a large proportion of scFvs we have selected so far in our laboratory (including TA10 and SF9, Figures 5–7 and data not shown) from a naive library (Griffin.1) can be used as intrabodies, without any further modification in spite of the reducing environment of the cytosol to track endogenous protein dynamics.

Live cell imaging with fluorescent intrabodies

HeLa cells cultured on cover slips were transfected using CaPO₄ as described (66). After 16h, cover slips were mounted on an incubating chamber filled with culture medium (supplemented with 20 mM HEPES pH=7.2) at 37°C. Time-lapse images were acquired on a Leica (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) SP2 confocal microscope every 20s or 30s. Both channels were acquired simultaneously using the 457 nm and 514 nm laser wavelengths for CFP and YFP, respectively, and corresponding spectral detection windows were systematically adjusted so as to optimize signals and avoid cross-talk between channels.

Online supplemental material

Supplemental movies corresponding to Figures 5(B), 6 and 7(A) are available at <http://XXXX>. 12-bit images were processed into Quicktime movies or still image samples using NIH Image J available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/> and Adobe Image Ready (Adobe, San Jose, CA, USA). Fluorescence signals were median-filtered (radius=1 pixel) to increase signal-to-noise ratio.

Acknowledgments

This work was initiated in the laboratory of Thomas E. Kreis at the University of Geneva. His support toward this new approach in the field of cell biology and membrane traffic was essential, and the MBP screen was carried out in his laboratory. We are deeply indebted to him and we dedicate this article to his memory. We thank G. Winter for providing the Griffin.1 library and accompanying protocols, organizers of the 1996 'antibody phage display' EMBO course at SISSA (Trieste, Italy), E. del Nery for her help with siRNA experiments, W. Faigle for mass spectrometry analysis, J. White for the GalNacT2 cell line and VSV-G constructs, M. Lowe for the Golgin 84 siRNA and antibody, L. Johannes for purified Shiga toxin B subunit, A. Wells for advice and myosin samples, E. Berger and T. Schroer for antibodies, and P. Benaroch, A. Khan and M. Rojo for careful reading of the manuscript. This work was supported by the Institut Curie and the Centre National de la Recherche Scientifique and by the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC 5747 and 4th year PhD fellowship to C.N.). The laboratory of T. E. Kreis was supported by the Fond National Suisse.

References

- Perret E, Albert M, Bordes N, Bornens M, Soyer-Gobillard MO. Microtubular spindle and centrosome structures during the cell cycle in a dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii* B: an immunocytochemical study. *Biosystems* 1991;25:53–65.
- Bailly E, Bordes N, Bornens M, Klotz C. A high molecular weight centrosomal protein of mammalian cells is antigenically related to myosin II. *Cell Motil Cytoskeleton* 1992;23:122–132.
- Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol* 1995;131:1715–1726.
- Masson D, Kreis TE. Identification and molecular characterization of E-MAP-115, a novel microtubule-associated protein predominantly expressed in epithelial cells. *J Cell Biol* 1993;123:357–371.
- Louvard D, Reggio H, Warren G. Antibodies to the Golgi complex and the rough endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 1982;92:92–107.
- Hoogenboom HR. Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies. *Trends Biotechnol* 1997;15:62–70.
- Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenboom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 1994;12:433–455.
- Smothers JF, Henikoff S, Carter P. Phage display: affinity selection from biological libraries. *Science* 2002;298:621–622.
- Biocca S, Cattaneo A. Intracellular immunization: antibody targeting to subcellular compartments. *Trends Cell Biol* 1995;5:248–252.
- Cohen PA. Intrabodies. Targeting scFv expression to eukaryotic intracellular compartments. *Meth Mol Biol* 2002;178:367–378.
- Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnett TP, McCafferty J, Griffiths AD, Winter G. Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 1991;222:581–597.
- Griffiths AD, Duncan AR. Strategies for selection of antibodies by phage display. *Curr Opin Biotechnol* 1998;9:102–108.
- Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, Tomlinson IM, Waterhouse P, Crosby WL, Kontermann RE, Jones PT, Low NM, Allison TJ et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* 1994;13:3245–3260.
- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol* 1996;14:309–314.
- Mcelhiney J, Lawton LA, Porter AJ. Detection and quantification of microcystins (cyanobacterial hepatotoxins) with recombinant antibody fragments isolated from a naive human phage display library. *FEMS Microbiol Lett* 2000;193:83–88.
- Furuta M, Ito T, Eguchi C, Tanaka T, Wakabayashi-Takai E, Kaneko K. Two-dimensional electrophoresis/phage panning (2D-PP): a novel technology for direct antibody selection on 2-D blots. *J Biochem (Tokyo)* 2002;132:245–251.
- Mcelhiney J, Drever M, Lawton LA, Porter AJ. Rapid isolation of a single-chain antibody against the cyanobacterial toxin microcystin-LR by phage display and its use in the immunoaffinity concentration of microcystins from water. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:5288–5295.
- Strachan G, Mcelhiney J, Drever MR, McIntosh F, Lawton LA, Porter AJ. Rapid selection of anti-hapten antibodies isolated from synthetic and semi-synthetic antibody phage display libraries expressed in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 2002;210:257–261.
- Gill SR, Schroer TA, Szilak I, Steuer ER, Sheetz MP, Cleveland DW. Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* 1991;115:1639–1650.

20. Holzbaur ELF, Hammarback JA, Paschal BM, Kravit NG, Pfister KK, Vallee RB. Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the *Drosophila* gene *Glued*. *Nature* 1991;351:579–583.
21. Vaughan KT, Tynan SH, Faulkner NE, Echeverri CJ, Vallee RB. Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J Cell Sci* 1999;112:1437–1447.
22. Valetti C, Wetzel DM, Schrader M, Hasbani MJ, Gill SR, Kreis TE, Schroer TA. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol Biol Cell* 1999;10:4107–4120.
23. Karki S, Holzbaur EL. Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:45–53.
24. Slusarewicz P, Nilsson T, Hui N, Watson R, Warren G. Isolation of a matrix that binds medial Golgi enzymes. *J Cell Biol* 1994;124:405–413.
25. Seemann J, Jokitalo E, Pypaert M, Warren G. Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus. *Nature* 2000;407:1022–1026.
26. Slusarewicz P, Hui N, Warren G. Purification of rat liver Golgi stacks. In: XXXX CJ, ed. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. San Diego-CA: Academic Press; 1994: pp 509–516.
27. Shorter J, Beard MB, Seemann J, Dirac-Svejstrup AB, Warren G. Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. *J Cell Biol* 2002;157:45–62.
28. Rabouille C, Misteli T, Watson R, Warren G. Reassembly of Golgi stacks from mitotic Golgi fragments in a cell-free system. *J Cell Biol* 1995;129:605–618.
29. Misteli T, Warren G. COP-coated vesicles are involved in the mitotic fragmentation of Golgi stacks in a cell-free system. *J Cell Biol* 1994;125:269–282.
30. Storrie B, White J, Rottger S, Stelzer EH, Suganuma T, Nilsson T. Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *J Cell Biol* 1998;143:1505–1521.
31. Linstedt AD, Hauri HP. Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa. *Mol Biol Cell* 1993;4:679–693.
32. Bascom RA, Srinivasan S, Nussbaum RL. Identification and characterization of Golgin-84, a novel Golgi integral membrane protein with a cytoplasmic coiled-coil domain. *J Biol Chem* 1999;274:2953–2962.
33. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494–498.
34. Diao A, Rahman D, Pappin DJC, Lucocq J, Lowe M. The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation. *J Cell Biol* 2003;160:201–212.
35. Musch A, Cohen D, Rodriguez-Boulant E. Myosin II is involved in the production of constitutive transport vesicles from the TGN. *J Cell Biol* 1997;138:291–306.
36. Ikonen E, de Almeida JB, Fath KR, Burgess DR, Ashman K, Simons K, Stow JL. Myosin II is associated with Golgi membranes: identification of p200 as nonmuscle myosin II on Golgi-derived vesicles. *J Cell Sci* 1997;110:2155–2164.
37. Linstedt AD, Foguet M, Renz M, Seelig HP, Glick BS, Hauri HP. A C-terminally-anchored Golgi protein is inserted into the endoplasmic reticulum and then transported to the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5102–5105.
38. Orci L, Perrelet A, Rothman JE. Vesicles on strings: morphological evidence for processive transport within the Golgi stack. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:2279–2283.
39. Alvarez C, Garcia-Mata R, Hauri HP, Sztul E. The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic. *J Biol Chem* 2001;276:2693–2700.
40. Sonnichsen B, Lowe M, Levine T, Jamsa E, Dirac-Svejstrup B, Warren G. A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes. *J Cell Biol* 1998;140:1013–1021.
41. Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A. Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of xenopus oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:422–427.
42. Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Campioni N, Cattaneo A. Intracellular immunization with cytosolic recombinant antibodies. *Biotechnology (NY)* 1994;12:396–399.
43. Bradbury A, Velappan N, Verzillo V, Ovecka M, Chasteen L, Sblattero D, Marzari R, Lou J, Siegel R, Pavlik P. Antibodies in proteomics II: screening, high-throughput characterization and downstream applications. *Trends Biotechnol* 2003;21:312–317.
44. Hassanzadeh G, Devoogdt N, Ghysen A, De Baetselier P, Muyltermans S, Dambly-Chaudiere C. The regulated expression of an intrabody produces a mutant phenotype in *Drosophila*. *FEBS Lett* 1998;437:81–86.
45. Visintin M, Tse E, Axelson H, Rabbitts TH, Cattaneo A. Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid *in vivo* system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11723–11728.
46. der Maur AA, Zahnd C, Fischer F, Spinelli S, Honegger A, Cambillau C, Escher D, Pluckthun A, Barberis A. Direct *in vivo* screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem* 2002;277:45075–45085.
47. Worn A, Pluckthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 2001;305:989–1010.
48. Nizak C, Monier S, Del Nery E, Moutel S, Goud B, Perez F. Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors. *Science* 2003;300:984–987.
49. Casey JL, Coley AM, Tilley LM, Foley M. Green fluorescent antibodies: novel *in vitro* tools. *Protein Eng* 2000;13:445–452.
50. Hink MA, Griep RA, Borst JW, van Hoek A, Eppink MHM, Schots A, Visser AJWG. Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. *J Biol Chem* 2000;275:17556–17560.
51. Cardinale A, Filesi I, Biocca S. Aggresome formation by anti-Ras intracellular scFv fragments: the fate of the antigen-antibody complex. *Eur J Biochem* 2001;268:268–277.
52. Sciaky N, Presley J, Smith C, Zaal KJ, Cole N, Moreira JE, Terasaki M, Siggia E, Lippincott-Schwartz J. Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* 1997;139:1137–1155.
53. Ward TH, Polishchuk RS, Caplan S, Hirschberg K, Lippincott-Schwartz J. Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J Cell Biol* 2001;155:557–570.
54. Cole NB, Sciaky N, Marotta A, Song J, Lippincott-Schwartz J. Golgi dispersal during microtubule disruption. regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* 1996;7:631–650.
55. Mallard F, Antony C, Tenza D, Salamero J, Goud B, Johannes L. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi Apparatus revealed through the study of Shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* 1998;143:973–990.
56. Dubel S, Breitling F, Kontermann R, Schmidt T, Skerra A, Little M. Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv). *J Immunol Meth* 1995;178:201–209.
57. Griffiths AD, Malmqvist M, Marks JD, Bye JM, Embleton MJ, McCafferty J, Baier M, Holliger KP, Gorick BD, Hughes-Jones NC et al. Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J* 1993;12:725–734.
58. Tewari D, Goldstein SL, Notkins AL, Zhou P. cDNA encoding a single-chain antibody to HIV p17 with cytoplasmic or nuclear retention signals inhibits HIV-1 replication. *J Immunol* 1998;161:2642–2647.
59. Misumi Y, Sohda M, Tashiro A, Sato H, Ikehara Y. An essential cytoplasmic domain for the Golgi localization of coiled-coil proteins

- with a COOH-terminal membrane anchor. *J Biol Chem* 2001;276: 6867–6873.
60. Marra P, Maffucci T, Daniele T, Tullio GD, Ikehara Y, Chan EK, Luini A, Beznoussenko G, Mironov A, De Matteis MA. The GM130 and GRASP65 Golgi proteins cycle through and define a subdomain of the intermediate compartment. *Nat Cell Biol* 2001;3:1101–1113.
 61. Satoh A, Wang Y, Malsam J, Beard MB, Warren G. Golgin-84 is a rab1 binding partner involved in Golgi structure. *Traffic* 2003;4:153–161.
 62. Miles S, Mcmanus H, Forsten KE, Storrie B. Evidence that the entire Golgi apparatus cycles in interphase HeLa cells: sensitivity of Golgi matrix proteins to an ER exit block. *J Cell Biol* 2001;155: 543–556.
 63. Puthenveedu MA, Linstedt AD. Evidence that Golgi structure depends on a p115 activity that is independent of the vesicle tether components giantin and GM130. *J Cell Biol* 2001;155: 227–238.
 64. Lesa GM, Seemann J, Shorter J, Vandekerckhove J, Warren G. The amino-terminal domain of the Golgi protein giantin interacts directly with the vesicle-tethering protein p115. *J Biol Chem* 2000;275: 2831–2836.
 65. Melki R, Kerjan P, Waller J-P, Carlier M-F, Pantaloni D. Interaction of microtubule-associated proteins with microtubules: yeast lysyl- and valyl-tRNA synthetases and t 218–235 synthetic peptide as model systems. *Biochemistry* 1991;30:11536–11545.
 66. Jordan M, Schallhorn A, Wurm FM. Transfecting mammalian cells. optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucl Acids Res* 1996;24:596–601.

II.B.2. *Résultats, Discussion et Perspectives*

Les avantages techniques et pratiques des anticorps recombinants sur les anticorps obtenus classiquement par immunisation d'animaux ont été démontrés par plusieurs groupes indépendamment et de manière convaincante, mais pourtant les applications de cette technologie en biologie cellulaire sont rares. Il est clair que les premières banques naïves d'anticorps recombinants, qui permettent d'obtenir des anticorps contre n'importe quel antigène d'intérêt a priori, étaient de diversité trop faible pour obtenir des anticorps d'affinité et de spécificité satisfaisantes pour les techniques de biologie classique.

Dans cette première étude, nous avons montré que les banques du type de celle que nous avons utilisée (Griffin.1, provenant du laboratoire de G. Winter, Cambridge, UK), sont de diversité suffisante ($>10^9$ clones) pour obtenir des anticorps contre différents antigènes, et qui sont compatibles avec les techniques de biologie cellulaire traditionnelles.

De plus, cette étude développe deux aspects de cette technique, en tirant parti d'une part de la sélection *in vitro* et d'autre part du caractère recombinant de ces anticorps. Nous avons montré que le fait de sélectionner des anticorps *in vitro* au lieu d'immuniser des animaux permet d'obtenir des anticorps qu'il serait très difficile d'obtenir dans des animaux. Nous avons en effet produit des anticorps dirigés contre un mélange de protéines associées aux microtubules préparées à partir de cellules HeLa. Nous avons ainsi obtenu entre autres des anticorps contre la tubuline (α ou β), dont la conservation entre espèces est trop grande pour déclencher une réponse immunitaire importante chez les animaux. Cette méthode permet donc d'obtenir des anticorps contre des protéines très conservées, et en général contre des antigènes peu immunogéniques. Ce crible nous a aussi permis d'obtenir des anticorps dirigés contre des protéines moins abondantes de la fraction de protéines associées aux microtubules, comme la protéine dynactine p150^{Glued}.

Dans une seconde étude, nous avons voulu tester si le fait de sélectionner des anticorps *in vitro* permettrait de restreindre l'ensemble des antigènes-cibles à ceux accessibles à la périphérie d'un organite intact purifié, les empilements golgiens purifiés à partir de foie de rat. Evidemment l'immunisation d'animaux avec ces mêmes préparations ne permet pas de conserver les antigènes d'intérêt dans ce contexte natif, ils sont rapidement dénaturés et protéolysés, et l'antigène majeur dans ce cas est l'enzyme golgienne α MannosidaseII (Burke

et al. 1982; Louvard et al. 1982) et non pas un antigène de la périphérie golgienne⁸³. Nous avons donc sélectionné des anticorps contre des empilements golgiens intacts purifiés, et ainsi obtenu des anticorps dirigés contre les antigènes naturellement présentés à la surface de cet organite dans leur contexte et leur topologie natifs) la Giantine, une protéine possiblement apparentée à la Golgine84, et la myosine IIA non-musculaire.

L'ensemble de ces résultats montrent que les méthodes de sélection *in vitro* sont puissantes et bien adaptées à la biologie cellulaire.

Nous avons ensuite cherché à développer plus avant l'utilisation de ces anticorps recombinants pour l'étude des protéines-cibles. Nous avons étiqueté les anticorps obtenus avec la GFP et exprimé ces anticorps fluorescents dans des cellules en culture, ce qui nous a permis de suivre la dynamique des protéines-cibles endogènes *in vivo* (en plus de la Giantine, mentionnée ci-dessous, nous avons pu ainsi suivre le comportement endogène de la myosine IIA non-musculaire). Cette nouvelle utilisation des anticorps recombinants *in vivo* s'ajoute à la possibilité déjà décrite de les utiliser en tant qu'anticorps bloquants. L'utilisation des anticorps recombinants en tant que traceurs de protéines endogènes pourrait se révéler plus facile à mettre en oeuvre et générale que la stratégie de blocage de fonction, cette dernière nécessitant une stabilité des anticorps dans des conditions de surexpression dans le cytosol qui est un milieu chimique réducteur.

II.B.2.a. Autres organites

Cette première étude ouvre la voie à la caractérisation de la périphérie d'autres organites intacts. En quelques jours, il est possible d'obtenir des anticorps monoclonaux recombinants dirigés contre des antigènes présentés à la surface de l'organite d'intérêt, ceux qui sont accessibles aux molécules du cytosol et aux membranes qui approchent l'organite au sein de la cellule. Dans le cas de l'appareil de Golgi, il serait intéressant de caractériser cette périphérie dans d'autres conditions, par exemple après désassemblage mitotique, incubation avec cytosol et BFA, etc ... Même dans le cas d'organites déjà caractérisés par d'autres méthodes, comme dans le cas de l'appareil de Golgi, par l'analyse protéomique systématique ou la production d'anticorps chez les animaux, cette méthode offre une nouvelle description, plus topologique, et en tout cas produit des outils versatiles aux potentialités nouvelles.

⁸³ Un autre antigène-cible dans le cadre d'une immunisation animale avec des subfractions enrichies en appareil de Golgi de nature différente est la lectine du compartiment

II.B.2.b. Matrice golgienne

La majorité des anticorps obtenus dans le crible anti-Golgi dont nous avons identifié la cible (nous avons identifié la cible de 8 des 17 anticorps différents détectant l'appareil de Golgi par immunofluorescence) sont dirigés contre la Giantine. Cette protéine n'est pas très abondante dans les préparations d'appareil de Golgi purifié, la bande correspondante sur le patron de bleu de Coomassie est beaucoup moins intense que plusieurs dizaines d'autres. En revanche sa grande taille (375 kDa), et surtout sa structure proposée en bâtonnet semi-flexible de 200 nm de long (de l'ordre de la taille des empilements golgiens) en font une cible privilégiée dans ce crible contre la périphérie golgienne. L'identité de la cible de ces anticorps obtenue par analyse par spectrométrie de masse des protéines co-migrants avec celle détectée par western blot a été confirmée par déplétion de la Giantine de cellules par siRNA suivie d'une immunofluorescence. Au passage, nous n'avons pas observé d'effet de cette déplétion de Giantine sur la structure de l'appareil de Golgi par immunofluorescence, ni sur la localisation d'autres marqueurs golgiens (y compris GM130 et p115, partenaires supposés de la Giantine). Un effet inhibiteur sur la sécrétion de VSV-G a cependant été détecté, mais qualitativement le transport golgien, antérograde ou rétrograde, n'est pas grandement affecté. La reformation de l'appareil de Golgi post-métaphasique n'est pas non plus inhibée, donc la fonction de la Giantine décrite dans le système *in vitro* semble être dispensable. Ces résultats sont globalement en accord avec ceux obtenus par une autre méthode de déplétion de la Giantine basée sur la micro-injection d'anticorps et la dégradation par le protéasome.

L'expression intracellulaire d'un anticorps recombinant obtenu pendant ce crible, TA10, étiqueté avec la GFP (ou ses variants YFP, CFP) permet de suivre la Giantine endogène *in vivo*. Aucun blocage de fonction n'a été observé (tests qualitatifs de sécrétion, reformation de l'appareil de Golgi post-métaphasique, deux fonctions inhibées par des anti-Giantine dans des systèmes *in vitro* ou semi-*in vitro*) dans ces conditions, et le marquage typique de la Giantine entourant celui des enzymes comme la GalT, est observé *in vivo*. La Giantine endogène n'est pas visible sur les tubules (positifs pour GalNacT2) émanant de l'appareil de Golgi lors d'un traitement avec la BFA, et disparaît au moment où l'appareil de Golgi fusionne en masse soudainement avec le RE, probablement parce que la Giantine est transmembranaire et donc

intermédiaire p58 (orthologue de rat de ERGIC53), qui n'est pas non plus périphérique (Saraste et al. 1987).

«suit» les membranes. Ceci suggère que la Giantine est très stablement localisée à l'appareil de Golgi, et ne semble recycler que très peu vers le RE.

Ce comportement a été aussi observé lorsque les microtubules sont dépolymérisés par traitement avec le Nocodazole. La Giantine n'est pas non plus détectée sur les mini-empilements golgiens (GalNacT2-positifs) générés par la dépolymérisation des microtubules, et reste accumulée au «lieux» Golgi près du centrosome. Cette protéine est donc très stablement ancrée à l'appareil de Golgi (elle ne semble pas non plus présente sur des vésicules ou tubules péri-golgiens en l'absence de perturbation, contrairement à des chimères fluorescentes de GM130 et GRASP65), sans pour autant être absolument nécessaire à sa fonction et sa structure en empilement. Les mini-empilements dépourvus de Giantine fonctionnent normalement dans les voies de transport antérograde et rétrograde.

II.C. Anticorps recombinants conformationnels

Clément Nizak, Solange Monier, Elaine del Nery, Sandrine Moutel, Bruno Goud & Franck Perez, Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as in vitro and in vivo conformation sensors, Science 2003 May 9;300(5621):984-7.

II.C.1. *Introduction*

Cette seconde étude basée sur la production d'anticorps in vitro par *Phage Display* illustre à nouveau d'une part les nouvelles possibilités offertes par la sélection in vitro et d'autre part la même application d'expression intracellulaire pour suivre les protéines endogènes in vivo. Cette fois-ci, le but que nous nous étions fixé est de sélectionner in vitro des anticorps recombinants spécifiques pour la confirmation d'une protéine donnée, en l'occurrence la GTPase Rab6, à nouveau une application beaucoup plus difficile à envisager chez l'animal.

16. J. Marcotrigiano *et al.*, *Mol. Cell* **7**, 193 (2001).
17. P. Champion-Arnaud, R. Reed, *Genes Dev.* **8**, 1974 (1994).
18. K. Nagai, C. Oubridge, T. H. Jessen, J. Li, P. R. Evans, *Nature* **348**, 515 (1990).
19. R. C. Valentine, B. M. Shapiro, E. R. Stadtman, *Biochemistry* **7**, 2143 (1968).
20. G. W. Tischendorf, H. Zeichhardt, G. Stoffler, *Mol. Gen. Genet.* **134**, 187 (1974).
21. J. Dubochet *et al.*, *Q. Rev. Biophys.* **21**, 129 (1988).
22. C. Bottcher, K. Ludwig, A. Herrmann, M. van Heel, H. Stark, *FEBS Lett.* **463**, 255 (1999).
23. E. V. Orlova *et al.*, *J. Mol. Biol.* **271**, 417 (1997).
24. S. De Carlo, C. El-Bez, C. Alvarez-Rua, J. Borge, J. Dubochet, *J. Struct. Biol.* **138**, 216 (2002).
25. I. R. Vetter, A. Arndt, U. Kutay, D. Gorlich, A. Wittinghofer, *Cell* **97**, 635 (1999).
26. M. C. Peitsch, *Biotechnology* **13**, 658 (1995).
27. M. C. Peitsch, *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 274 (1996).
28. P. Chacon, W. Wriggers, *J. Mol. Biol.* **317**, 375 (2002).
29. Y. Shamoo, U. Krueger, L. M. Rice, K. R. Williams, T. A. Steitz, *Nature Struct. Biol.* **4**, 215 (1997).
30. R. M. Xu, L. Jokhan, X. Cheng, A. Mayeda, A. R. Krainer, *Structure* **5**, 559 (1997).
31. Materials and methods are available as supporting material on Science Online.

32. We thank G. Heyne for expert technical assistance. Supported by grants from the Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung, und Technologie to R.L. and H.S. and the Deutsche Forschungsgemeinschaft to R.L.

Supporting Online Material
www.sciencemag.org/cgi/content/full/300/5621/980/DC1
 Materials and Methods
 Figs. S1 to S4
 Tables S1 and S2
 Movie S1

5 March 2003; accepted 10 April 2003

Recombinant Antibodies to the Small GTPase Rab6 as Conformation Sensors

Clément Nizak,¹ Solange Monier,¹ Elaine del Nery,¹
 Sandrine Moutel,² Bruno Goud,¹ Franck Perez^{1*}

Here we report an approach, based on antibody phage display, to generate molecular conformation sensors. Recombinant antibodies specific to the guanosine triphosphate (GTP)-bound conformation of the small guanosine triphosphatase (GTPase) Rab6, a regulator of membrane traffic, were generated and used to locate Rab6-GTP in fixed cells, and, after green fluorescent protein (GFP) tagging and intracellular expression, to follow Rab6-GTP *in vivo*. Rab6 was in its GTP-bound conformation on the Golgi apparatus and transport intermediates, and the geometry of transport intermediates was modulated by Rab6 activity. More generally, the same approach could be applied to other molecules that can be locked in a particular conformation *in vitro*.

Activation of small GTPases, from their guanosine diphosphate (GDP)-bound to their GTP-bound state, is accompanied by a conformational change that triggers the function of downstream effectors (1). To analyze the spatiotemporal activation of GTPases, binding domains of effector proteins have been used as conformation sensors with the limitation that these effector-based conformation sensors necessarily compete with endogenous effectors for GTPase binding and, in turn, affect the GTPase function itself (2). This approach was shown to be very powerful to study the activation of small GTPases [e.g., (2–6)] but has been limited to the Ran and Rho/Rac/Cdc42 families.

We decided to develop a method to design GTPase conformation sensors that would not require prior knowledge of an existing effector and that would not necessarily lead to inhibition of effector binding to the activated GTPase. The selection, from combinatorial libraries, of recombinant antibodies (single-chain fragment V, scFv) presented at the surface of phages (7, 8) allows the extensive control of *in vitro* selection conditions. This

has the major advantage, in comparison with classical, animal-based approaches, of preserving the native conformation of target antigens. In addition, scFvs have been used widely as intrabodies to target intracellular proteins (9, 10), even though scFvs are often inactive *in vivo* because of misfolding induced by the reducing environment of the cytosol (11).

We chose to generate conformation-specific antibodies against the Golgi-localized small GTPase Rab6A, which regulates the traffic between the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum (ER) (12). Rab6AQ72L is a GTP-locked mutant of Rab6A in which Gln⁷² is replaced by Leu. It was used as a target antigen to select for recombinant antibodies (Fig. 1A), and two independent screens both led to the identification of the AA2 scFv (13). By immunofluorescence, AA2 stains the Golgi complex positive for the galactosyl transferase (GalT, Fig. 1B, a to c). Extensive colocalization was observed when costaining with AA2 and a Rab6-specific polyclonal antibody (Fig. 1B, d to f), including colocalization at peripheral sites, likely to be ER entry points (Fig. 1B, d to f, arrows).

Two spliced variants of Rab6 are expressed in cells: Rab6A and Rab6A' (14). AA2 detected both transfected Rab6A and A' (Fig. 1C, on the Golgi but not the ER) but not other overex-

pressed Rabs (fig. S1). AA2 Golgi staining was completely abolished when Rab6A and 6A were depleted simultaneously by using small interfering RNAs (siRNAs) (Fig. 1D, a and b, arrows), whereas staining of GalT was not (Fig. 1D, c and d). Thus, AA2 was directed against Rab6A and Rab6A'.

We then tested whether AA2 specifically detected Rab6 in its GTP-bound conformation (Fig. 2). Glutathione *S*-transferase (GST)-Rab6A bound to glutathione-Sepharose was loaded with GDP or with the slowly hydrolyzable analog of GTP, guanosine 5'-*O*-(3'-thiotriphosphate) (GTP- γ -S), incubated with AA2, and recovered by pull-down assay. The protein β GDI [GDP dissociation inhibitor β (15)], present in the postnuclear supernatant (PNS) that was used as a control, bound more strongly to the GDP-bound form of Rab6A (16). In contrast, AA2 interacted preferentially with the activated GTP- γ -S-bound form of Rab6 (Fig. 2A). GTP- γ -S-loaded Rab11 did not bind to AA2, although Rab6-interacting protein-1 (Rab6IP1), which is an effector of both Rab6 and Rab11 (Fig. 2B) (17), bound to both Rab6A and Rab11 under these conditions (Fig. 2B). Thus, AA2 is a Rab6-specific antibody directed against the GTP-bound conformation.

AA2 binding to Rab6-GTP was also observed in immunoprecipitation experiments with transfected HeLa cell extracts (Fig. 2C). Green fluorescent protein (GFP)-tagged Rab6AQ72L was specifically immunoprecipitated but not GFP-Rab6AT27N (a GDP-locked mutant in which Thr²⁷ is replaced by Asp). GFP-Rab6Awt (wild type) was only poorly recovered, which suggests either that the steady-state proportion of Rab6-GTP is indeed low in cells [as observed for Rab5, see (18)] or that the GTP conformation was not properly retained after cell lysis. In either case, this may explain why no Rab6 effector has been efficiently coimmunoprecipitated with endogenous Rab6 under these conditions.

We next tested whether AA2 specifically detected Rab6-GTP by immunofluorescence. HeLa cells expressing GFP-Rab6Q72L or GFP-Rab6T27N were costained with AA2 and a Rab6-specific polyclonal antibody. In GFP-Rab6Q72L-expressing cells (Fig. 3, A and B, outlined cells), both AA2 and the Rab6-specific polyclonal antibody showed an

¹CNRS UMR144 and ²Translational Department, Institut Curie, 26 rue d'Ulm, F75248 Paris Cedex 05, France.

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: Franck.Perez@curie.fr

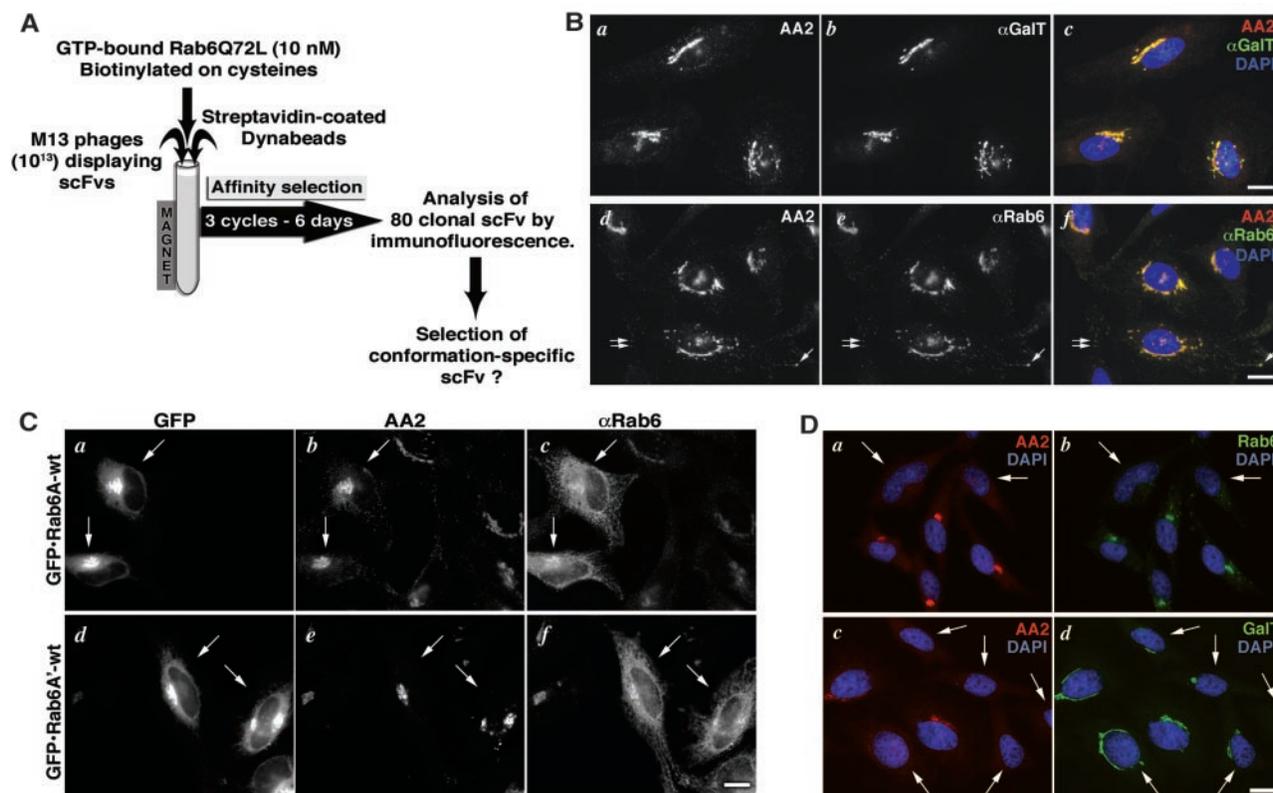


Fig. 1. In vitro selection of Rab6-GTP recombinant antibodies by phage display. **(A)** A combinatorial recombinant antibody library was screened against Rab6AQ72L (GTP-bound). **(B)** AA2 staining colocalizes with Rab6 on the Golgi. HeLa cells were stained with the recombinant antibody AA2, polyclonal antibodies against GalT (a to c) or Rab6 (d to f), and DAPI [nuclei staining, blue in the overlay (c and f)]. Arrows indicate peripheral structures positive for both AA2 and the Rab6 antibody. **(C)**

AA2 detects Rab6A and A'. HeLa cells were transfected with GFP-Rab6A (a to c) or GFP-Rab6A' (d to f) and costained with AA2 and a Rab6-specific polyclonal antibody. Transfected cells are shown by arrows. **(D)** AA2 staining is sensitive to Rab6A and A' knock-down. HeLa cells were or were not treated with siRNA for 72 hours (arrows) to deplete both Rab6 isoforms and stained with AA2 (a and c) together with antibodies against Rab6 (b) or GalT (d) antibody. Scale bars, 10 μ m.

increased staining of the Golgi and of tubular and punctuate cytoplasmic structures. In cells expressing GFP-Rab6AT27N (Fig. 3, C to F, outlined cells), although the polyclonal antibody detected the overexpressed GDP-locked Rab6 mutant in the cytosol, AA2 did not. In these cells, AA2 still detected endogenous Rab6 that remained localized at the Golgi. Thus, AA2 detected Rab6-GTP but not Rab6-GDP by immunofluorescence. This allowed the observation of the behavior of endogenous Rab6 when the GDP-locked mutant was overexpressed.

Endogenous Rab6-GTP localized to Golgi membranes was not efficiently displaced when Rab6AT27N was overexpressed (Fig. 3, E and F). In contrast, a total displacement of endogenous Rab6 was often observed when Rab6A'T27N was overexpressed (Fig. 3, G and H). The use of our conformation-specific antibody thus allowed us to draw two conclusions: first, because Rab6A'T27N perturbed both Rab6A and Rab6A', displacing them from the Golgi, it should not be used to determine the specific function of Rab6A' [see (19)]. Second, because Rab6AT27N seemed less efficient in displacing Rab6 from Golgi membranes than Rab6A'T27N, specif-

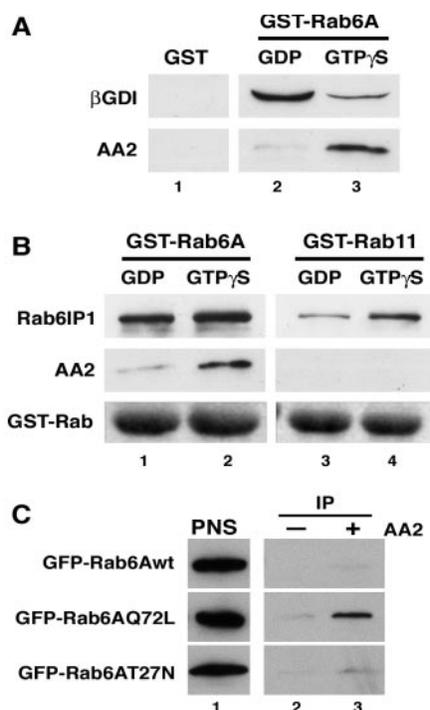


Fig. 2. AA2 specifically interacts with Rab6-GTP in vitro. **(A)** Recombinant Rab6A-GST coupled to glutathione-Sepharose was loaded with GDP (lane 2) or GTP- γ -S (lane 3), then incubated with AA2 in the presence of trace amounts of mouse brain PNS. As a control, GST alone was incubated with AA2 (lane 1). Protein complexes were recovered by centrifugation and analyzed by Western blotting. β GDI, present in the mouse brain PNS, binds preferentially to Rab6A-GDP, whereas AA2 (detected with the 9E10 anti-Myc tag antibody) binds preferentially to Rab6A-GTP- γ -S. **(B)** The same pull-down experiment was done by using GST-Rab6A (lanes 1 and 2) or GST-Rab11 (lanes 3 and 4) in the absence of PNS, but using Rab6IP1 as a control effector protein. Although Rab6IP1 binds to both Rab6A and Rab11, AA2 only binds to Rab6A-GTP- γ -S. **(C)** Immunoprecipitation experiments were carried out without (lane 2) or with AA2 (lane 3) from detergent-extracted PNS (lane 1) of HeLa cells transiently expressing GFP-Rab6AwT, GFP-Rab6AT27N, or GFP-Rab6AQ72L. AA2 specifically precipitates GFP-Rab6AQ72L and only traces of GFP-Rab6AwT or GFP-Rab6AT27N.

REPORTS

ic partners of Rab6A'GDP may exist (such as a specific exchange factor) that could not be titrated by overexpressed Rab6AT27N.

AA2 was next used as a fluorescent intrabody to investigate Rab6•GTP dynamics in vivo. We have recently shown that recombinant antibodies that are GFP-tagged and expressed in the cytoplasm of cultured cells can be used to follow the behavior of endogenous proteins in living cells, without tagging and overexpressing the target protein (11, 20). AA2 was fused to enhanced yellow fluorescent protein (EYFP) and expressed in HeLa cells. AA2-YFP colocalizes with Golgi markers in fixed cells (fig. S2) and living cells (Fig. 4B), which allowed us to follow endogenous Rab6•GTP in vivo. No effect on Rab6 function in intracellular traffic was observed when AA2-YFP was overexpressed (fig. S2). Consistent with this, AA2 coprecipitated Rab6 and some of its effectors [Rab6IP2, the dynein-dynactin-binding protein Bicaudal-D1 (BICD1), and the p150^{Glued} subunit of dynactin (16, 21, 22)] in HeLa cell detergent extracts (fig. S2), which suggested that AA2 binding to Rab6•GTP did not nec-

essarily inhibit the recruitment of its effectors.

We used AA2-YFP to monitor the dynamics of Rab6•GTP in live HeLa cells (Fig. 4A, Movie S1). AA2-YFP stained the Golgi complex and short tubulovesicular structures emanating from the Golgi and moving toward the cell periphery and sometimes back to the Golgi (Fig. 4A, arrows and arrowhead, respectively). The tubulovesicular structures converge into regions (Fig. 4A, brackets) that likely represent ER entry sites [described in (23)]. Thus, activated Rab6 was present on the Golgi and on transport intermediates as well. The lifetime of Rab6•GTP molecules on Golgi and transported membranes, limited by GTP hydrolysis, was thus long enough to allow recruitment of AA2-YFP (and likely intracellular Rab6 effectors) onto these membranes.

The size and shape of structures stained by AA2-YFP were in perfect accordance with those observed after localization of endogenous Rab6 by immunofluorescence (see Fig. 1B, d to f). However, they were relatively small compared to the 5- to 20- μ m-long tubular transport intermediates observed in cells expressing GFP-Rab6 (23). Three reasons may explain such a difference: (i) AA2 may perturb the formation of tubules. (ii) Rab6 may be concen-

trated in a GTP-bound conformation at the tip of tubules. (iii) These relatively small structures represent endogenous transport intermediates, and overexpression, even slight, of Rab6 may cause an extension and stabilization of tubular structures.

We monitored the behavior of CFP-Rab6 when coexpressed with AA2-YFP (Fig. 4B, Movie S2). A complete colocalization of the two fluorescent signals was observed (Movie S2). It is noteworthy that the dynamics of AA2-YFP in these coexpression conditions matched those already reported for GFP-Rab6A alone (23). Thus AA2 was not inhibiting the formation of long tubules, and Rab6 was present in its GTP-bound form all along their length, and even slight overexpression of Rab6 was enough to increase their length and stabilize them. Thus the geometry of transport intermediates may be modulated by Rab6 activity, and up-regulation of Rab6 may stabilize membrane tubules. This is in agreement with models suggesting that tubulation of membrane is related to the traffic rate.

In conclusion, we show here that the recombinant antibody approach allows for the rapid selection of scFvs that can be used as sensors of a specific conformation of a molecule. The Rab6•GTP-specific recombinant antibody AA2 has allowed us to analyze the effects of dominant-negative mutants on the

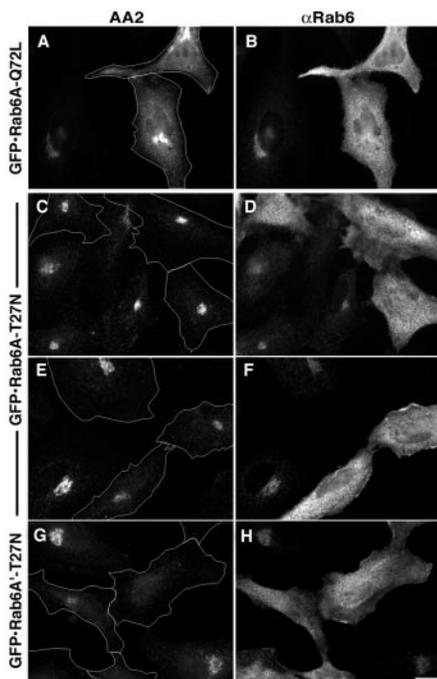
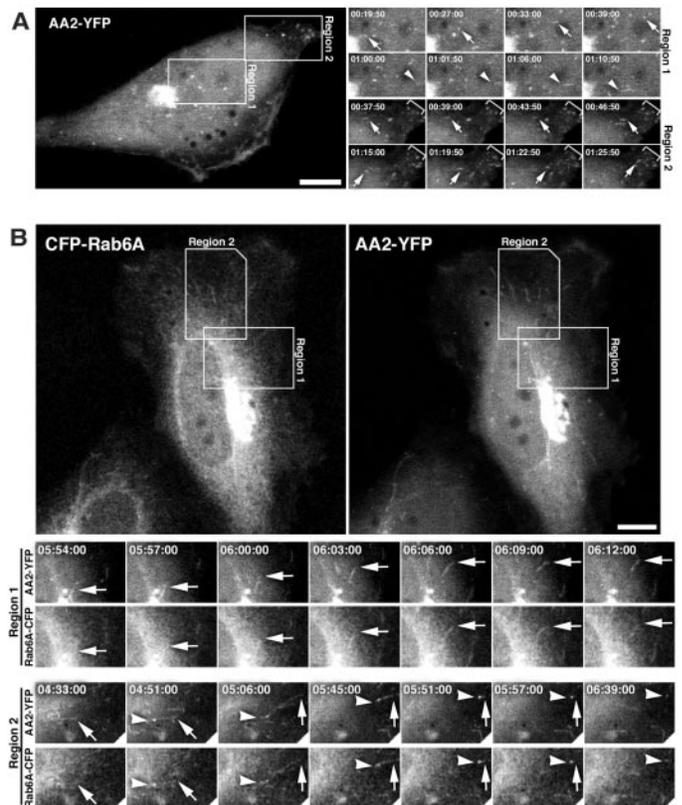


Fig. 3. AA2 specifically detects Rab6•GTP by immunofluorescence. HeLa cells expressing GFP-tagged Rab6AQ72L (A and B) or Rab6A/A' T27N (C to H) were costained with AA2 and a Rab6-specific polyclonal antibody. Transfected cells, identified using the GFP staining, are outlined (A, C, E, and G). Although the Rab6-specific polyclonal antibody detects all forms of Rab6 expressed, AA2 detects GFP-Rab6AQ72L (A and B) on the Golgi only and not GFP-Rab6A/A' T27N (C to H). Endogenous Rab6 staining of the Golgi is only partially displaced upon Rab6AT27N overexpression (E and F). In contrast, total displacement was observed in certain cells expressing Rab6A' T27N (G). Scale bar, 10 μ m.

Fig. 4. Endogenous and overexpressed Rab6•GTP dynamics in vivo. HeLa cells expressing either AA2-YFP alone (A) or AA2-YFP and CFP-Rab6 (B) were imaged on a confocal microscope. The boxed regions in (A) and (B) are shown in a time-lapse series underneath. Region 2 in (B) was rotated by 90° clockwise. (A) AA2-YFP detects endogenous Rab6•GTP in living cells on the Golgi and 1- to 2- μ m-long tubulovesicular structures moving rapidly in the cytoplasm. In region 1, structures emerge from the Golgi and move toward either the cell periphery (arrow) or the cell center (arrowhead). Region 2 shows dynamics in a peripheral region likely to be an ER entry site, containing rather immobile structures (bracket) and toward which many structures converge (arrows). (B) CFP-Rab6 is present on the Golgi and the ER, and on 5- to 20- μ m-long membrane tubules (arrows) moving from the Golgi toward the periphery, with some returning. AA2-YFP staining shows that Rab6 is present in its GTP-bound form on the Golgi and all motile structures. Time is indicated in minutes. Scale bar, 10 μ m.



localization of endogenous Rab6 and to describe the dynamics of Rab6•GTP-positive transport intermediates in wild-type cells and cells overexpressing Rab6. Rab6•GTP is present on the Golgi and tubulovesicular transport intermediates all along their length, and their geometry is modulated by the level of Rab6 expression. The *in vitro* antibody selection technique can be easily extended systematically to other GTPases, in particular to other Rabs, but not exclusively to them, to analyze the subcellular localization and dynamics of the endogenous activated form. In addition to its applications in cell biology, this technique will be particularly well suited to design tools to identify the presence of proteins in pathological conformations, and, in general, to detect, track, and separate conformers.

References and Notes

1. Y. Takai, T. Sasaki, T. Matozaki, *Physiol. Rev.* **81**, 153 (2001).
2. V. S. Kraynov *et al.*, *Science* **290**, 333 (2000).
3. Z. Li, C. D. Aizenman, H. T. Cline, *Neuron* **33**, 741 (2002).
4. S. H. Kim, Z. Li, D. B. Sacks, *J. Biol. Chem.* **275**, 36999 (2000).
5. P. Kalab, K. Weis, R. Heald, *Science* **295**, 2452 (2002).
6. K. Plafker, I. G. Macara, *J. Biol. Chem.* **277**, 30121 (2002).
7. G. Winter, A. D. Griffiths, R. E. Hawkins, H. R. Hoogenboom, *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 433 (1994).
8. J. F. Smothers, S. Henikoff, P. Carter, *Science* **298**, 621 (2002).
9. S. Biocca, A. Cattaneo, *Trends Cell Biol.* **5**, 59 (1995).
10. P. A. Cohen, *Methods Mol. Biol.* **178**, 367 (2002).
11. The use of scFvs as intrabodies to block their target's function is often limited by the sensitivity of scFvs to the reducing environment of the cytosol, and specific methods have been developed to overcome this limitation (24–26). Accordingly, the scFvs we have selected from the Griffin.1 library so far, and have expressed intracellularly, did not inhibit their target function. However, a large proportion of these scFvs efficiently detects their endogenous target upon moderate expression and can in turn be used to track endogenous protein dynamics. Whether this unexpected high frequency of *in vivo* active scFvs is due to our expression conditions, or to the presence of many reduction-resistant scaffolds in the Griffin.1 library, is at the moment unknown.
12. F. Darchen, B. Goud, *Biochimie* **82**, 375 (2000).
13. Information on materials and methods is available on Science Online.
14. A. Echard *et al.*, *Mol. Biol. Cell* **11**, 3819 (2000).
15. N. Nishimura, H. Nakamura, Y. Takai, K. Sano, *J. Biol. Chem.* **269**, 14191 (1994).
16. S. Monier, F. Jollivet, I. Janoueix-Lerosey, L. Johannes, B. Goud, *Traffic* **3**, 289 (2002).
17. S. Monier *et al.*, unpublished observations.
18. B. Stahl, G. Fischer von Mollard, C. Walch-Solimena, R. Jahn, *J. Biol. Chem.* **269**, 24770 (1994).
19. F. Mallard *et al.*, *J. Cell Biol.* **156**, 653 (2002).
20. C. Nizak *et al.*, in preparation.
21. T. Matanis *et al.*, *Nature Cell Biol.* **4**, 986 (2002).
22. B. Short, C. Preisinger, J. Schaletzky, R. Kopajtich, F. A. Barr, *Curr. Biol.* **12**, 1792 (2002).
23. J. White *et al.*, *J. Cell Biol.* **147**, 743 (1999).
24. A. A. der Maur *et al.*, *J. Biol. Chem.* **277**, 45075 (2002).
25. M. Visintin, E. Tse, H. Axelson, T. H. Rabbitts, A. Cattaneo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11723 (1999).
26. A. Worn, A. Pluckthun, *J. Mol. Biol.* **305**, 989 (2001).
27. We thank G. Winter at the UK Medical Research Council for providing the Griffin.1 library; A. Lecrux, A.-F. Ruaud, and S. Morton for their help with some of the experiments; our colleagues (see material and methods) for the gift of materials; and V. Lallemand for helpful advice. We also acknowledge A. Echard for stimulating discussions, P. Chavrier, L. Johannes, and M. van Overbeek for careful reading of the manuscript; and A. Franklin and M. Gaye for their constant assistance. This work was supported by the CNRS, the Curie Institute (PIC immunotherapy), and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC5747 and ARC5881).

ing discussions, P. Chavrier, L. Johannes, and M. van Overbeek for careful reading of the manuscript; and A. Franklin and M. Gaye for their constant assistance. This work was supported by the CNRS, the Curie Institute (PIC immunotherapy), and the Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC5747 and ARC5881).

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/300/5621/984/DC1
Materials and Methods
Figs. S1 and S2
Movies S1 and S2

26 February 2003; accepted 3 April 2003

Unmasking the S-Phase–Promoting Potential of Cyclin B1

Jonathan D. Moore,* Jane A. Kirk, Tim Hunt†

In higher eukaryotes, the S phase and M phase of the cell cycle are triggered by different cyclin-dependent kinases (CDKs). For example, in frog egg extracts, Cdk1–cyclin B catalyzes entry into mitosis but cannot trigger DNA replication. Two hypotheses can explain this observation: Either Cdk1–cyclin B fails to recognize the key substrates of its S-phase–promoting counterparts, or its activity is somehow regulated to prevent it from activating DNA synthesis. Here, we show that Cdk1–cyclin B1 has cryptic S-phase–promoting abilities that can be unmasked by relocating it from the cytoplasm to the nucleus and moderately stimulating its activity. Subcellular localization of vertebrate CDKs and the control of their activity are thus critical factors for determining their specificity.

DNA replication and entry into mitosis are triggered by different cyclin-dependent kinase (CDK)–cyclin complexes in vertebrate cells. Thus, in *Xenopus* egg extracts, Cdk2–cyclin E or Cdk1–cyclin A can promote entry into S phase, whereas Cdk1–cyclin B does not (1, 2). Conversely, Cdk1–cyclin B promotes entry into mitosis (2), but Cdk2–cyclin E does not. The origins of this specificity are unclear, especially considering that a single B-type cyclin can promote both S phase and mitosis in fission and budding yeast (3–5), and the addition of cyclin A to *Xenopus* egg extracts can trigger either DNA replication or mitosis, depending on the amount added (2, 6). An important difference between vertebrate and yeast mitosis is that mitosis in yeast takes place largely within the nucleus.

The inability of Cdk1–cyclin B to support replication might stem from its failure to recognize the targets of S-phase–promoting CDK–cyclin complexes as substrates (7). Alternatively, Cdk1–cyclin B may have an innate potential to promote replication that is masked by mechanisms that regulate its protein kinase activity in time and subcellular space. Two potentially relevant restraints are the switchlike response of Cdk1–cyclin B activity to increases in cyclin B concentration

(8–10) and the predominantly cytoplasmic localization of the vertebrate B-type cyclins (11–14). We found that overcoming these two restraints by redirecting Cdk1–cyclin B1 to the nucleus, and adding Cdc25 phosphatase to allow its stable activation at intermediate levels, is sufficient to enable this form of Cdk1 to support DNA replication.

Egg extracts contain sufficient Cdk2–cyclin E to support replication of added chromatin without further additions. We removed (15) more than 90% of endogenous cyclin E and associated Cdk2 with Sepharose beads that were covalently coupled to GST-p21N [a fusion protein comprising glutathione S-transferase (GST) linked to the N-terminal Cdk inhibitor portion of p21] (Fig. 1A). This reduced the replication to 10 to 15% of that observed in control extracts (Fig. 1B). This depletion protocol did not substantially affect the concentration of Cdk1, and the replication could be fully restored by the addition of recombinant GST–cyclin A1 (16), whereas addition of GST–cyclin B1 caused the extracts to enter mitosis.

Cyclin B1 is normally kept in the cytoplasm by a nuclear export signal (NES) that is located between residues 108 and 117 (13, 17–19). Because cyclin E can only support replication as a nuclear protein (14), the inability of cyclin B1 to support DNA replication might be explained by its failure to dwell in the nucleus. A GST–cyclin B1ΔN120 fusion protein retains the essential Cdk-activating portions of cyclin B1, but lacks its NES and accumulates in nuclei, albeit slowly (19) (Fig. 1E). To accelerate nuclear import, we introduced the nuclear localization sequence

Cancer Research UK London Research Institute, Clare Hall Laboratories, Blanche Lane, South Mimms, Herts EN6 3LD, UK.

*Present address: RiboTargets, Granta Park, Abington, Cambs CB1 6GB, UK.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: tim.hunt@cancer.org.uk

Nizak et al. 10.1126/science.1083911

"Recombinant Antibodies to the Small GTPase Rab6 as Conformation Sensors"

SUPPORTING ONLINE MATERIAL

MATERIALS AND METHODS.

Antibodies, Vectors and Library. Anti- β GDI (*SI*), anti-Rab6IP1 and anti-Rab6 were raised in rabbits. Anti-GalT was kindly provided by E.G. Berger (University of Zürich, Zürich, CH) and anti-BICD1 by C. Hoogenraad (Erasmus University, Rotterdam, NL). The anti-GFP antibody was from ROCHE, the anti- β tubulin from SIGMA, the anti-p150^{glued} from BD-Transduction Laboratories. Fluorescent secondary antibodies were from Jackson (Cy3 and Cy5-labelled) and Molecular Probes (Alexa488). HRP-coupled secondary antibodies were from Jackson. Purified Shiga toxin was obtained from L. Johannes (Institut Curie, Paris, F). Vectors used to express fluorescent Rab6A and A' wt and mutant proteins were obtained from J. White (EMBL, Heidelberg, D), A. Couedel-Courteille, A. Echard and F. Jollivet (Institut Curie, Paris, F). Vectors used to express fluorescent Rab1, Rab8, Rab11, Rab24, and Rab33b were respectively obtained from R. Sannerud & J.Saraste (University of Bergen, Norway), J. White (EMBL, Heidelberg, D), F. Senic-Matuglia & J. Salamero (Institut Curie, Paris, F), D. Munafo & M. Colombo (Universidad Nacional de Cuyo, CONICET, Mendoza, Argentina) and J. Young & T. Nilsson (EMBL, Heidelberg, D). G. Winter at the MRC (Cambridge, UK) provided us with the Griffin.1 library as well as with TG1 and HB2151 *E. coli* strains.

Rab6Q72L purification and biotinylation. Rab6AQ72L cloned in pET15b vector was expressed and purified by Ni-NTA (Qiagen) affinity chromatography essentially as described for

Sar1 and Rab1 (S2, 3). Micro-injection of purified Rab6AQ72L in HeLa cells led to a similar phenotype as the one described by Martinez et al (S4) upon Rab6AQ72L overexpression, thus confirming the conformational state of the purified protein. Only poor biotinylation was obtained when using NHS-Biotin (Pierce), and we thus chose to biotinylate Rab6 using the cysteine-specific coupling agent PEO-Maleimide activated biotin (PEO-biotin, Pierce). Bacterially expressed Rab6AQ72L was modified in PBS supplemented with 0.5 % Tween20 in the presence of a 50x molar excess of PEO-biotin overnight at 4°C. Even in these conditions only 50% of the proteins were modified as estimated by recovery on streptavidin-coated beads and western blot analysis of bound and unbound fractions. Finally, biotinylated Rab6AQ72L was separated from free biotin using a Sephadex G25 column.

Antibody Phage display screen. We essentially followed the protocols provided with the Griffin.1 library and available on G. Winter's laboratory web page at <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/winter-hp.php?menu=1808>. The screen consisted of three rounds of selection, each of which took 2 days and used 250 ng biotinylated Rab6 (hence 10 nM of biotinylated Rab6 during the selection). We modified the selection process as follows. Phages (10^{14}) were first incubated for 90 min with 50 μ L washed streptavidin M280 dynabeads (DYNAL), beads were separated on a magnet and the non-pre-adsorbed phages were recovered. They were then slowly agitated for 30 min in the presence of 10 nM biotinylated Rab6AQ72L (in 1 mL PBS, 0.1% Tween20, 2% Marvel fat free milk), and the interaction was then left standing for 90 min. 50 μ L washed streptavidin-coated dynabeads were then added, tubes were slowly agitated for 30 min and incubation was continued for 30 min standing. Beads were recovered and washed with PBS+Tween 10 times on a magnet. Phages were eluted with 100 mM Tri-ethylamine at pH=11 (twice with 500 μ l for 10 min) and neutralized in 500 μ l 1 M Tris pH=7.4. After the third round

of selection, when the selection yield increase indicated positive selection, 80 clones were randomly picked from *E. coli* populations infected by the selected phages. These clones were analyzed by immunofluorescence for Golgi staining, and 37 clones were positive, labeling the perinuclear region of cells. DNA sequencing of the 19 clones giving the strongest Golgi staining demonstrated that they were either one of two antibodies, AA2 or AH12. Similar results were obtained for AA2 and AH12, and only results concerning AA2 are shown here. The same antibodies were actually obtained when using 50 nM of target proteins instead of 10 nM in another independent screen. Accession number for AA2 in Genbank is AY265355.

scFv production and immunofluorescence. scFvs from the Griffin.1 library are cloned in pHEN2 which allows the production of scFv-M13 pIII fusion proteins in amber suppressor *E. coli* strains (e.g. SupE) and the production of soluble scFvs in non-suppressor strains. Selected plasmids were thus introduced in the non-suppressor HB2151 strain before production. For the immunofluorescence screen, scFvs secreted in 1 mL 2xTY culture (produced in 96-deep well plates), after overnight induction with 1 mM IPTG at 30°C, were used undiluted without purification. For large scale production, clones were grown at 37°C in 500 mL 2xTY medium supplemented with Ampicillin and 1% Glucose, spun at OD=0.2, resuspended in minimal M9 medium supplemented with Ampicillin, 1 mM IPTG, 0.5 ppm thiamin, 0.1% casa-aminoacids, and 0.2% glycerol as carbon source, and incubated for 16 hr at 30°C. Bacteria were pelleted and the supernatant filtered (Millipore 0.2 μ m). scFvs secreted in the culture medium were concentrated on 2 mL 50% slurry Ni-NTA agarose columns (Qiagen). For immunofluorescence of paraformaldehyde-fixed cells permeabilized with saponin (0.05%), purified scFvs were used at 10 μ g/mL (or undiluted when culture medium was directly used) co-incubated with 9E10 anti-

myc and/or anti-His₆ (SIGMA) monoclonals in the presence of 0.2% BSA, followed by anti-mouse fluorescent secondary antibodies.

Cells were imaged on a Leica DMRA microscope equipped with fluorescence filters (Chroma, Leica) and a CCD camera (MicroMax, Princeton). Images were acquired using Metamorph (Universal Imaging) and figures were assembled using Photoshop 7.0 (Adobe) on a G4 Macintosh (Apple).

***In vitro* binding.** Rab6-GST pull-down experiments were carried out as described (S1). Briefly, Rab6-GST purified from *E. coli* was coupled to Gluthation-sepharose beads (12.5 μ g per condition), loaded with GDP or GTP γ S in 10 mM EDTA buffer for 1hr at 37°C and then incubated with 0.2 μ g AA2 and either 10 μ g mouse post nuclear supernatant (PNS), 1.5 μ L cytosol of Rab6IP1-expressing SF9 insect cells, 0.1% casein, 1% BSA or no blocking agent for 90 min at room temperature in the presence of 10 mM MgCl₂. Beads were washed 5 times and processed for SDS-PAGE. Bound and unbound fractions were analyzed by western blotting. The AA2-Rab6•GTP γ S interaction was identical in all 5 conditions tested. β GDI, Rab6IP1 and AA2 were detected with an anti-GDI antibody (S1), an anti-Rab6IP1 antibody and the 9E10 monoclonal anti-myc-tag antibody respectively, followed by HRP-labelled secondary antibodies and chemiluminescence staining (Pierce).

Cell culture and Immunoprecipitation. HeLa cells were cultured as described in Mallard et al. (S5) and transfected using CaPO₄ (S6). For immunoprecipitation experiments, 15.10⁶ HeLa cells were transfected, and after 16 hr, were detached from culture flasks in PBS-EDTA, pelleted and resuspended in 3 mM imidazol pH=7.2, 30 mM MgCl₂ and proteases inhibitors. Cells were lysed with a ball-bearing cell cracker on ice, adjusted to 150 mM NaCl, 20 mM Imidazol and 0.5% Triton X100, centrifuged at 1000 g for 5 min and the resultant PNS was incubated with or

without 50 μ g AA2 at 4°C for 4 hr. 150 μ L of washed Ni-NTA magnetic beads (Qiagen) were then added to reactions for 1 hr at 4°C, washed 5 times in PBS, 20 mM Imidazol, 30 mM MgCl₂, 0.5% Triton X100, and bound and unbound fractions were processed for SDS-PAGE using anti-BICD1 #2296, anti-GFP, anti- β tubulin and anti-p150^{glued}.

siRNA . Rab6 knock down experiments were performed in HeLa cells essentially as described by Elbashir et al. (57) using double stranded RNA oligos (Dharmacon) and will be described elsewhere. Rab6 was depleted in nearly 100% of cells incubated with the siRNA duplex for three days. siRNA-treated and wt, non-treated , HeLa cells were thus mixed on the same cover slips 24 hr after the siRNA transfection,. This ensured that control, non-Rab6-depleted cells, would be visualized simultaneously as Rab6-depleted cells (as shown in Figure 1D). Cells were fixed with 3% paraformaldehyde 48 hr later (i.e. 72 hr siRNA-depletion) and processed for immunofluorescence. siRNA depletion of Rab6A/A' abolished AA2 Golgi labeling while specific siRNA-depletion of either Rab6 A or A' only reduced, but did not abolish, AA2 staining.

Intracellular expression of AA2. The NotI site downstream of the fluorescent protein cDNA in pECFP-N3, pEGFP-N3, pEYFP-N3 (BD-Clontech) were mutated by filling-in. The mutated vectors were then modified by inserting a synthetic adaptor containing a His₆-tag and a myc-tag, downstream of a NotI site, identical to the tags found in pHEN2. To allow for insertion of the scFv extracted from pHEN2 by NcoI/NotI, the synthetic adaptor also inserted an upstream BbsI/NcoI site so that cutting the modified vector with BbsI opens the vector inside the NcoI site exactly as if using NcoI itself. The fact that we conserved the myc- and His₆-tags and in general the entire context of AA2 as it was in the original pHEN2 vector (Griffin.1 library) may explain why AA2 (and other scFvs selected in our laboratory) works as an intrabody without any further modification in spite of the reducing chemical environment of the cytosol. It is however worth

mentioning, while many of our scFvs detect their target proteins *in vivo*, none of them so far interferes with the function of endogenous proteins.

Live cell imaging. HeLa cells cultured on cover slips were transfected using CaPO_4 . After 16 hr, cover slips were mounted on an incubating chamber filled with culture medium supplemented with 20 mM HEPES pH=7.2 at 37°C. Time-lapse images were acquired on a Leica SP2 confocal microscope every 1.5 s or 3 s for 1 or 2 channel-recordings respectively. Both channels were acquired simultaneously using the 457 nm and 514 nm laser wavelengths for CFP and YFP respectively. Excitation intensities and spectral detection windows were systematically independently adjusted (using the AOTF and the spectral set-up respectively) so as to optimize signals and avoid crosstalk between channels. The absence of crosstalk was confirmed by imaging cells expressing either CFP-Rab6 or AA2-YFP only. 12-bit images were processed into Quicktime movies or still image samples using NIH Image J available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/> and Adobe Image Ready. CFP-Rab6 fluorescence signals were median-filtered (radius=1 pixel) to increase signal to noise ratio.

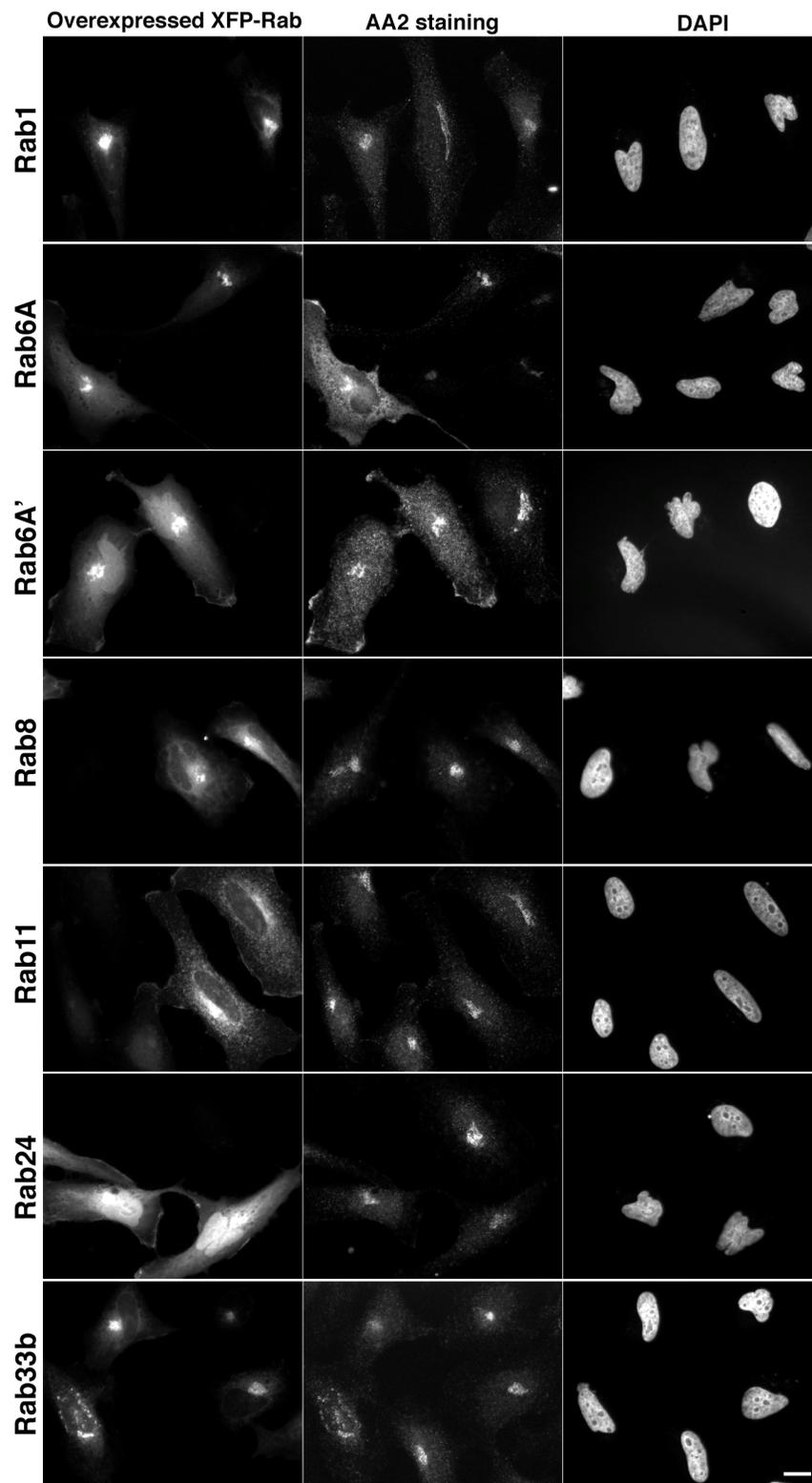
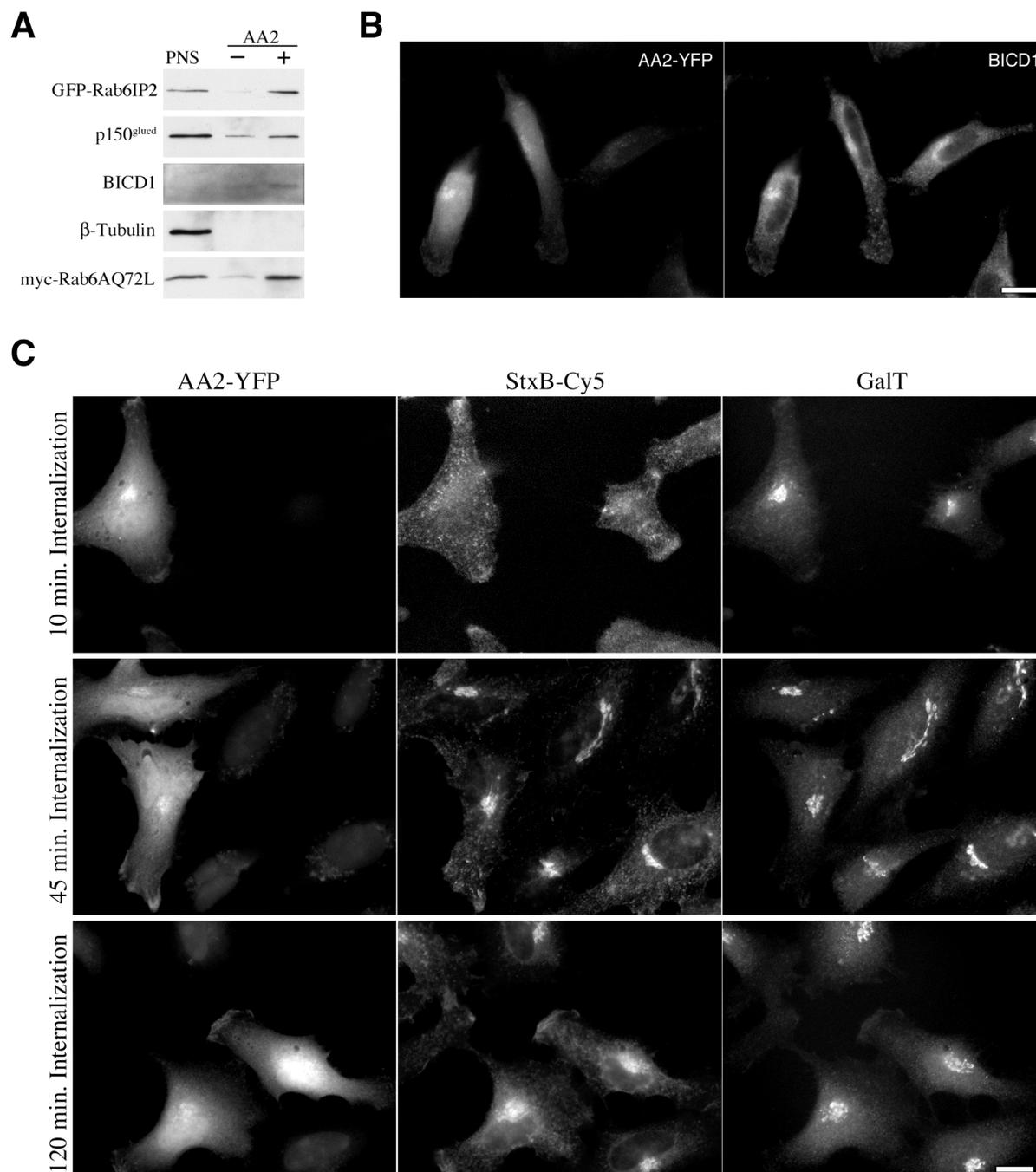


Figure S1 (Nizak et al.)



SUPPLEMENTAL FIGURES LEGENDS

Figure S1

AA2 only detects overexpressed Rab6A and A' and not various other Rabs. HeLa cells were transfected with expression plasmids encoding GFP or YFP-fusions of various Rabs (left column, the transfected Rab is indicated on the left), fixed with 3% paraformaldehyde and stained with AA2 (middle column) and DAPI to stain nuclei (right column). AA2 detects overexpressed Rab6A and Rab6A', but not the other Rabs tested, including those that are at least partially localized to the Golgi.

N.B.: Consistent with its conformational specificity, AA2 does not detect purified denatured Rab6 by western blotting (data not shown).

Figure S2

AA2 does not interfere with Rab6 function in intracellular traffic. **A.** AA2 co-precipitates Rab6•GTP and at least three of its effectors. Rab6•GTP was immunoprecipitated with AA2 from detergent extracts of HeLa cells expressing myc-tagged Rab6AQ72L (and Rab6IP2-GFP). Bound and unbound fractions were analyzed by western blotting (as well as an aliquot of the PNS as positive control). Rab6, Rab6IP2-GFP, endogenous p150^{glued} and endogenous BICD1 (but not endogenous β tubulin, negative control) are co-precipitated. Note that BICD1 is even strongly enriched (not detected in the PNS aliquot) upon Rab6•GTP precipitation. Altogether, this suggests that AA2 binding to Rab6•GTP does not compete with that of Rab6 effectors. **B.** The Golgi localization of BICD1, an effector of Rab6, is not affected by AA2-YFP expression. HeLa cells expressing AA2-YFP were fixed with 3% paraformaldehyde in PBS and stained for BICD1.

In contrast, a dominant negative mutant of Rab6, Rab6AT27N, was shown to affect Rab6 function and displace its effector BICD1 from the Golgi (S8). **C.** The retrograde transport of Shiga toxin B subunit (SStxB, 9) from the plasma membrane to the ER via the Golgi is not affected by AA2-YFP expression. It has been shown that Rab6A and A' are involved in the retrograde transport of the StxB from the plasma membrane to the Golgi and the ER: Rab6AT27N and Rab6A'T27N dominant negative mutants affect Rab6 function and prevent the transport of StxB from the Golgi to the ER and from the endosomes to the Golgi respectively (S9, 10). We used this assay to follow Rab6 activity in AA2-YFP-expressing cells. HeLa cells expressing AA2-YFP were continuously incubated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Cy5-coupled Shiga toxin B subunit, fixed with 3% paraformaldehyde in PBS after 10 min, 45 min or 120 min and stained for GalT. StxB is normally transported from the plasma membrane to endosomes (10 min), the Golgi (reached at 30-45 min, and continuously refilled from the surface thereafter) and then the ER (barely visible at 45 min, clearly visible at 120 min at the nuclear envelope) in all cells, regardless of AA2-YFP expression. Results in **B** and **C** indicate that AA2-YFP expression does not interfere with Rab6 A and A' functions in intracellular transport.

SUPPLEMENTAL MOVIES LEGEND

Movie S1

Corresponding to Figure 4A

Confocal imaging of a live HeLa cell expressing AA2-YFP (1 frame every 1.5 s, movie played twice).

AA2-YFP labels Rab6•GTP on the Golgi, as well as vesicles and short 1-2 μm -long tubules (arrows) moving towards the periphery at putative ER entry points (brackets) containing rather immobile Rab6•GTP-positive structures. Some tubulo-vesicular structures move back towards the Golgi (arrows).

Movie S2

Corresponding to Figure 4B

Confocal imaging of live HeLa cells expressing CFP-Rab6A and AA2-YFP (1 frame every 3 s, movie played twice).

CFP-Rab6A labels the Golgi and the endoplasmic reticulum (nuclear envelope), and 5-20 μm -long tubules (arrows) moving towards the periphery at putative ER entry points, and sometimes back to the Golgi. CFP-Rab6A dynamics match those already reported for GFP-Rab6A (*S11*). AA2-YFP labels Rab6 in its GTP-bound form on the Golgi and also on all tubules all along their length. Note however that no signal is detected on the ER.

REFERENCES

- S1. S. Monier, F. Jollivet, I. Janoueix-Lerosey, L. Johannes, B. Goud, *Traffic* 3, 289 (2002).
- S2. T. Rowe, W. E. Balch, *Methods Enzymol* 257, 49 (1995).
- S3. C. Nuoffer, F. Peter, W. E. Balch, *Methods Enzymol* 257, 3 (1995).
- S4. O. Martinez *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1828 (1997).
- S5. F. Mallard *et al.*, *J. Cell Biol.* 143, 973 (1998).
- S6. M. Jordan, A. Schallhorn, F. M. Wurm, *Nucleic Acids Res* 24, 596 (1996).
- S7. S. M. Elbashir *et al.*, *Nature* 411, 494 (2001).
- S8. T. Matanis *et al.*, *Nat Cell Biol* 4, 986 (2002).
- S9. F. Mallard *et al.*, *J Cell Biol* 156, 653 (2002).
- S10. A. Girod *et al.*, *Nat Cell Biol* 1, 423 (1999).
- S11. J. White *et al.*, *J Cell Biol* 147, 743 (1999).

II.C.2. *Résultats, Discussion, Perspectives*

II.C.2.a. Détection conformationnelle des GTPases

Les GTPases oscillent entre un état inactif lié au GDP et un état actif lié au GTP, auxquels correspondent deux conformations distinctes. Un des défis dans le cadre de l'étude des GTPases est de détecter leur conformation au sein des cellules, éventuellement vivantes, ou bien dans des extraits cellulaires. Le but est d'une part de localiser spécifiquement la forme active ou inactive d'une GTPase (par microscopie électronique ou de fluorescence, éventuellement *in vivo*), et d'autre part de quantifier le rapport entre ces deux formes dans différentes conditions par des méthodes biochimiques. Dans le contexte du transport intracellulaire, la détection conformationnelle des Rabs, Arfs et de Sar1 permettrait de tester certains concepts fondamentaux issus d'études essentiellement biochimiques. Par exemple, le rôle dominant négatif des mutants bloqués dans l'état GDP par saturation du facteur d'échange⁸⁴, le couplage entre le cycle d'association aux membranes et le cycle GDP-GTP⁸⁵, leur état d'activation aux différents stades d'un événement de transport⁸⁶. Récemment une méthode élégante a été développée qui permet la détection de conformation active pour les familles Rac/Cdc42/Rho/Ran. Elle repose sur l'utilisation des domaines de liaison aux GTPases des effecteurs et des GAPs en tant que détecteurs de la conformation GTP⁸⁷ (Kraynov et al. 2000□ Kalab et al. 2002; Li et al. 2002□). Ces détecteurs de conformation basés sur les effecteurs sont désormais utilisés en routine pour localiser la forme active des GTPases par «Immunofluorescence□ ou quantifier dans un extrait cellulaire l'activité des GTPases par «Immunoprécipitation□ en utilisant le fragment d'effecteur comme anticorps. Ces fragments d'effecteurs peuvent même être couplés à un fluorophore et introduits dans des cellules vivantes pour localiser la forme active des GTPases *in vivo*. Cependant, le fragment d'effecteur utilisé comme sonde ne peut reconnaître la GTPase sous forme active que si son domaine d'interaction sur la GTPase est libre. Ainsi le fragment d'effecteur ne permet pas de

⁸⁴ qui en principe bloque le cycle nucléotidique des GTPases dans l'état GDP et déplète la forme endogène liée au GTP, ce qui est très rarement vérifié en pratique

⁸⁵ Ces GTPases sont supposées être cytosoliques dans l'état GDP et membranaires dans l'état GTP.

⁸⁶ Les Arfs et Sar 1 sont-elles actives pendant la phase de tri seulement ou jusqu'à la fin du bourgeonnement, les Rabs sont elles actives sur les vésicules ou pendant la fusion□

⁸⁷ Dans le cas de Ran, le changement de conformation de la relativement longue queue C-terminale est suffisamment spectaculaire pour que des anticorps générés dans des animaux puissent distinguer les deux états (Richards et al. 1995□ Hieda et al. 1999□ Nilsson et al. 2002).

détecter une GTPase liée à ses effecteurs, à moins que ce fragment déplace les effecteurs liés. Dans le cas de l'utilisation des fragments d'effecteurs *in vivo*, ceci signifie que les GTPases suivies *in vivo* sont certes sous forme active mais dépourvues d'effecteurs, et que leur fonction est donc perturbée puisque la sonde se comporte comme un inhibiteur compétitif de l'effecteur endogène. Nous avons donc étudié une nouvelle méthode rapide, et peu coûteuse, pour obtenir des anticorps recombinants conformationnels (qui pourrait en fait être appliquée à n'importe quelle molécule qui peut être bloquée dans une conformation donnée), ne nécessitant pas la connaissance préalable de partenaire spécifique de l'état conformationnel d'intérêt.

II.C.2.b. AA2, scFv anti-Rab6•GTP

Nous avons montré la faisabilité d'une telle approche en sélectionnant des anticorps recombinants dirigés contre le mutant de Rab6 bloqué sous la forme liée au GTP (Rab6Q72L). L'affinité des anticorps obtenus est contrôlée en utilisant des concentrations de Rab6•GTP de l'ordre de 10 nM pendant la sélection, dans le but d'exclure les anticorps peu affins. Nous avons donc testé la possibilité de sélectionner en une semaine des anticorps spécifiques de la conformation d'une molécule.

Les anticorps obtenus (2 clones différents) ont d'abord été testés pour leur spécificité pour la protéine Rab6, ce qui était compliqué car ils ne détectent pas de protéine par western blot. En revanche ils détectent l'appareil de Golgi par immunofluorescence de cellules HeLa sauvages, et le marquage augmente seulement dans des cellules surexprimant les isoformes de Rab6 et pas quand d'autres Rabs sont surexprimées. De plus ce marquage disparaît complètement lorsque l'appareil de Golgi est déplété de Rab6 par siRNA, ce qui confirme la spécificité des anticorps pour Rab6.

Un des deux anticorps a été étudié plus en détail, AA2⁸⁸. Il détecte Rab6 spécifiquement dans sa conformation liée au GTP il se lie spécifiquement à Rab6 sauvage chargé en GTP, détecte la surexpression du mutant GTP (Q72L) mais pas du mutant GDP (T27N) par immunofluorescence, et précipite le mutant GTP mais pas le mutant GDP dans des extraits totaux de cellules surexprimant ces mutants⁸⁹. La possibilité de détecter spécifiquement

⁸⁸ Le second anticorps partage en fait la même spécificité conformationnelle, mais ne semble pas utilisable *in vivo*.

⁸⁹ De plus, la forme sauvage de Rab6 surexprimée n'est pas non plus précipitée il est possible que Rab6 surexprimé soit essentiellement sous forme GDP, ou bien que les

Rab6•GTP endogène sur l'appareil de Golgi nous a permis de tester l'effet des mutants GDP Rab6AT27N et Rab6A'T27N, et de confirmer leur rôle postulé (mais démontré pour aucune GTPase du trafic jusqu'alors) dans le déplacement de l'équilibre de Rab6 entre les deux formes. Les modèles en vigueur supposent que ces mutants GDP surexprimés se comportent en dominants inhibiteurs en titrant le facteur d'échange et en retour diminuant la proportion de Rab6•GTP dans les cellules au profit de Rab6•GDP. Nous avons observé que Rab6•GTP endogène est effectivement déplacé de l'appareil de Golgi par expression des mutants GDP, mais seulement de façon incomplète avec Rab6AT27N alors que cet effet est beaucoup plus prononcé dans le cas de Rab6A'T27N, ce qui suggère l'existence d'un facteur d'échange spécifique de Rab6A' (non-titrable par Rab6AT27N).

II.C.2.c. Utilisation de AA2 pour suivre Rab6•GTP in vivo

L'utilisation de AA2 comme intra-anticorps pour suivre la dynamique de Rab6•GTP in vivo a ensuite été testée. Tout d'abord aucun effet de l'expression AA2 sur le trafic dépendant de Rab6 n'a été observé, alors que l'expression de Rab6A'T27N bloque clairement le transport de la sous-unité B de la toxine de Shiga vers le TGN. De plus une analyse par western blot des protéines co-précipitées avec Rab6•GTP par AA2 montre que trois effecteurs connus de Rab6 en interphase sont liés à Rab6•GTP simultanément à AA2. AA2 ne semble pas bloquer la fonction de Rab6 dans le trafic en interphase en particulier parce que la liaison de AA2 sur Rab6•GTP n'entre pas en compétition avec celle d'au moins une partie des effecteurs de Rab6. Rappelons au passage que cette propriété est clairement un avantage majeur en comparaison avec les détecteurs de conformation de GTPases basées sur les fragments d'effecteurs (domaines de liaison aux GTPases). Cette propriété est aussi surprenante, nous avons en quelque sorte prévu qu'un anticorps spécifique pour l'état GTP se lierait de façon identique aux effecteurs, eux-même agissant naturellement comme des détecteurs de conformation GTP. Nos résultats suggèrent donc qu'une GTPase sous forme liée au GTP peut être détectée par plusieurs protéines simultanément, éventuellement plusieurs effecteurs mais aussi des effecteurs et une GAP par exemple. Cette dernière possibilité a été proposée dans une étude structurale de Arf1 (avec son effecteur COPI et sa GAP ArfGAP1) (Goldberg 1999) et des études biochimiques récentes de Arf1 (Lanoix et al. 2001 □ Yang et al. 2002 □ Weiss et Nilsson 2003), et permettrait de façon finalement logique

conditions de lyse cellulaire et de précipitation que nous employons ne permettent pas de conserver l'état nucléotidique de Rab6 sauvage.

qu'une GAP puisse lier sa GTPase et déclencher l'hydrolyse du GTP sans avoir à entrer en compétition avec les effecteurs. En fait il semble que AA2 se lie à Rab6 comme sa GAP GAPCenA, ce qui confirmerait cette possibilité.

AA2-GFP ne bloque pas la fonction de Rab6 dans le transport mais permet en revanche de suivre Rab6•GTP dans des cellules vivantes. A nouveau une relativement grande proportion des anticorps que nous avons obtenus au cours des différents cribles permet de suivre la protéine-cible *in vivo* par microscopie de fluorescence, mais apparemment pas de bloquer sa fonction. Ces expériences d'expression intracellulaire de AA2 nous ont permis de révéler plusieurs aspects. Rab6 endogène est présent dans sa conformation liée au GTP sur l'appareil de Golgi et les vésicules qui partent de l'appareil de Golgi vers la périphérie (et parfois bougent en sens inverse). Ces vésicules Rab6•GTP-positives s'accumulent dans des sites en périphérie dans lesquels elles deviennent immobiles et semblent disparaître soudainement après quelques dizaines de secondes. La géométrie de ces vésicules, sphériques (1 μm de rayon apparent) et légèrement allongées en tubules de 1-2 μm de long quand elles se déplacent vite, correspond à celle des structures présentes dans le cytoplasme et détectées par AA2 ou un anticorps polyclonal anti-Rab6 par immunofluorescence de cellules fixées. En revanche, les tubes de 5-20 μm de long observés dans des cellules exprimant GFP-Rab6 ne sont pas observés dans ces cellules exprimant AA2-YFP, et pourtant la dynamique de ces longs tubes positifs pour GFP-Rab6 est identique à celle de ces vésicules positives pour AA2-YFP. Nous avons donc co-exprimé AA2-YFP et CFP-Rab6 pour tester si AA2 empêche la formation des tubes, ou bien ne marquerait que leur extrémité (où Rab6•GTP serait enrichi). Cette expérience montre que les tubules CFP-Rab6 se forment quel que soit le niveau d'expression de AA2, et que AA2 marque ces tubules sur toute leur longueur. AA2 ne bloque pas la formation des tubes, et Rab6 est présent sous forme liée au GTP sur toute leur longueur. Ceci signifie que la surexpression de Rab6, même modérée, entraîne à elle seule l'augmentation de la taille des vésicules et les transforme en longs tubules déplacés le long des microtubules. Nous discuterons dans la partie Discussion et aussi l'article sur les isoformes A et A' le lien entre la fonction des Rabs et la modulation de la géométrie des intermédiaires de transport.

Une autre observation intéressante est que AA2 marque l'appareil de Golgi et les tubes, mais pas le RE qui est pourtant aussi marqué par CFP-Rab6. Une interprétation intéressante est que Rab6 est présent sous sa forme liée au GTP sur le compartiment donneur (l'appareil de Golgi), les intermédiaires de transport, et que l'hydrolyse du GTP est couplée à leur fusion avec le compartiment accepteur (le RE). Il s'agirait aussi de la première preuve directe *in vivo* du couplage fusion membranaire/hydrolyse du GTP par une Rab. Cependant il nous faudrait

d'abord disposer d'un autre anticorps recombinant dirigé contre Rab6•GDP pour affirmer que Rab6 est sous forme GDP sur le RE, il est aussi possible que l'épitope de AA2 soit masqué ou que Rab6 surexprimé soit mal replié et «colle» par défaut au RE (membrane la plus abondante dans la cellule). En réalité nous avons des indices que AA2 partage le même site de liaison à Rab6 que GAPCenA, une GAP de Rab6 de fonction peut-être essentiellement mitotique, et donc il est possible que Rab6 sur le RE est lié à sa GAP (ce qui confirmerait le couplage fusion/hydrolyse mais de façon plus indirecte, par masquage de l'épitope).

II.D. Appareil de Golgi et mitose

Manuscrit soumis pour publication (en révision à Molecular Biology of the Cell) □ Clément Nizak, Alain Rambourg, Florence Jollivet, Bruno Goud, Franck Perez, Golgi inheritance in the absence of anterograde and retrograde transport.

II.D.1. *Introduction*

Comme nous l'avons vu dans la partie Introduction, la stratégie d'héritage de l'appareil de Golgi en mitose dans les cellules de mammifères fait l'objet d'une controverse □ selon deux modèles concurrents, l'appareil de Golgi est soit transporté de manière rétrograde et fusionné avec le RE en prophase pour ré-émerger en télophase avant d'être ré-assemblé □ ou bien simplement fragmenté en prophase, ces fragments persistant dans le cytoplasme indépendamment du RE, interagissant éventuellement avec les micotubules, et fusionnant ensemble en télophase pour reformer l'appareil de Golgi.

La présente étude repose sur des observations effectuées par microscopie de fluorescence *in vivo* qui révèlent un aspect surprenant de la dynamique des membranes golgiennes en mitose.

Golgi inheritance in the absence of anterograde and retrograde traffic

Clément Nizak¹, Alain Rambourg², Florence Jollivet¹, Bruno Goud¹ and Franck Perez¹

1 Institut Curie, UMR144 CNRS, 26 rue d'Ulm 75248 Paris cedex 05 France

2 Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CEA/Saclay, F-91191 Gif-sur-Yvette, France.

Correspondence should be addressed to F.P.:

Institut Curie, UMR144 CNRS, 26 rue d'Ulm 75248 Paris cedex 05 France

Phone (33) 1 42 34

Fax (33) 1 42 34 63 82

franck.perez@curie.fr

Running Title: Mitotic Golgi dynamics under a BFA-transport block.

Keywords: Organelles, Golgi apparatus, Mitosis, Brefeldin A, Intracellular membranes

Supplemental Movies will be available at:

<http://perso.curie.fr/Franck.Perez/MitoticGolgi/>

during the review process.

Abstract

At mitosis the Golgi complex is inherited after its dispersion, equal partitioning, and reformation in each daughter cell. The state of Golgi membranes during the ongoing of mitosis is controversial, and the role of Golgi-intersecting traffic in Golgi inheritance is not clear.

Using Brefledin A (BFA) to perturb Golgi-intersecting membrane traffic at different stages of the cell cycle, we have observed by live cell imaging that addition of the drug on cells in prometaphase prevents mitotic Golgi dispersion. Under continuous treatment, Golgi fragments persist throughout mitosis and accumulate in a Golgi-like structure upon mitosis exit. This structure localizes at microtubule minus ends, contains all classes of Golgi markers, is not accessible to cargo from the ER or the plasma membrane because of the continuous BFA traffic block, but contains pre-accumulated cargo, and constitutes the site of Golgi reassembly upon BFA washout. Because this structure forms also when BFA is added when the Golgi is the most dispersed, in metaphase, this suggests that Golgi inheritance does not require necessarily *de novo* biogenesis from another membrane pool and relies also on independent Golgi fragments persisting throughout mitosis, containing all classes of Golgi markers, and that can be isolated from other organelles by blocking anterograde and retrograde Golgi-intersecting traffic.

Introduction

The identity of the Golgi apparatus as an independent organelle or as an extension of the ER along the secretory pathway has been a debated issue (Klumperman, 2000; Pelletier et al., 2000). The Golgi is in dynamic equilibrium with the ER, and microtubule disruption, for example, highlights the continuous cycling of Golgi resident enzymes through the ER (Storrie et al., 1998). Other studies showed that Sar1 mutants blocking ER export induce the accumulation of all Golgi markers in the ER (Miles et al., 2001; Ward et al., 2001), outlining once again this recycling pathway. The correlation between spatial distributions of the Golgi and transitional ER in two yeast species (Rossanese et al., 1999) and mammalian cells (Hammond and Glick, 2000) was proposed to result from the mutual feedback between ER export sites and Golgi membranes. Altogether, these arguments strongly suggest that Golgi components continuously cycle through the ER. However, cytoplasts devoid of Golgi complex but still containing an ER network do not form a Golgi *de novo*, and secretion in these cytoplasts is blocked at the level of ER export sites (Pelletier et al., 2000; Shorter and Warren, 2002).

Studies of Golgi inheritance in mitosis reflect this controversy (Lowe, 2002; Roth, 1999; Shorter and Warren, 2002), arguing either in favor of retrograde transport and fusion of this organelle with the ER in prophase and subsequent reemergence in telophase (Zaal et al., 1999) or its fragmentation into ER-independent partitioning units and subsequent reassembly from these units (Jesch et al., 2001; Jokitalo et al., 2001; Prescott et al., 2001; Seemann et al., 2002; Shorter and Warren, 2002). Clearly, the elucidation of how the Golgi apparatus disassembles and subsequently reassembles during mitosis would allow a deeper understanding of its function and organization (Rothman and Warren, 1994; Shorter and Warren, 2002). In vitro systems have been developed (Acharya et al., 1995; Acharya et al., 1998; Misteli and Warren, 1994; Rabouille et al., 1995) and this strategy has indeed been successful in identifying factors that contribute to Golgi structure and function, and the

alteration of which during mitosis causes the Golgi complex to break down (Barr et al., 1997; Colanzi et al., 2000; Jesch et al., 2001; Kano et al., 2000; Lowe et al., 2000; Nelson, 2000; Shorter et al., 1999; Sutterlin et al., 2001; Warren and Malhotra, 1998).

These studies and many others support the general idea that Golgi inheritance relies on the modulation of ER-Golgi bidirectional transport dynamics during mitosis. Brefeldin A has been a powerful and widely used tool to study and perturb the ER/Golgi interface because it induces a complete block of Golgi-intersecting transport pathways, Golgi disappearance, and redistribution of Golgi resident enzymes to the ER in interphase cells. In the presence of this drug, Golgi matrix markers are redistributed to dispersed punctuate structures which coincide with ER export sites in live cells expressing fluorescent COPII chimeras (Ward et al., 2001). It has recently been shown that these dispersed structures, containing Golgi matrix markers but devoid of Golgi resident enzymes (the latter being relocated to the ER), persist throughout mitosis when BFA is added on cells before they start dividing. In contrast, this study provides biochemical evidence that these structures are distinct from ER export sites (Seemann et al., 2002), and may therefore represent ER-independent Golgi partitioning units.

One essential difference between the two models for Golgi inheritance is the role played by membrane traffic between the Golgi and the ER. The ER-based inheritance model relies on transport from the Golgi to the ER during entry into mitosis and on transport from the ER towards the reforming Golgi during mitosis exit. The fragmentation model, on the other hand, does not require any transport between the Golgi and another compartment throughout mitosis for the Golgi to be inherited.

To address this issue, we have analyzed the sensitivity of the Golgi complex to a BFA-induced transport block at different stages of the cell cycle, during the dispersion and the reformation of the Golgi apparatus in mitosis.

Materials and Methods

Cell culture and mitotic shake-off. Wild-type or stably expressing GalNacT2-GFP HeLa cells (Storrie et al., 1998) were cultured as described (Mallard et al., 1998). Mitotic cells were obtained by shake-off in the absence of any synchronization protocol and plated on coverslips. Cells were then either fixed in MeOH (-20°C, 4 minutes) or 3% Paraformaldehyde in PBS at different time-points after shake-off or directly observed by conventional video microscopy or using a Leica SP2 confocal system. This method yielded 85±5% prometaphase/metaphase cells and 15±5% anaphase/telophase cells immediately after the shake-off.

^{ts045}VSVG-GFP transport. HeLa cells were transfected with ^{ts045}VSVG-GFP plasmid, incubated at 39.5°C for 10 hours, and then shifted to 37°C in the presence or absence of BFA. The usual shift to 32°C could not be used because mitosis completion was impaired at this low temperature, and we observed that ^{ts045}VSVG-GFP transport occurred normally at 37°C in the absence of BFA.

Antibodies and reagents. Monoclonal Antibodies were from G. Warren (p115), H.-P. Hauri (ERGIC53), Transduction laboratories (GM130), Calbiochem (Giantin), Sigma (□COP). Polyclonals were from E.G. Berger (GalT), B.L. Tang (Sec31), H.-P. Hauri (KDELr), M. Rojo (p23), K. Moremen (ManII). Secondary antibodies were from Molecular probes (Alexa 488) and Jackson (Cy3). DAPI was from SIGMA, BFA (used at 5□g/ml for treatment) was from EPICENTRE. Purified STxB was obtained from L. Johannes, labeled with Cy5 (Amersham) and used at 5□g/ml.

Imaging of fixed and live cells. Time-lapse and immunofluorescence data were acquired on a Leica DMRA microscope using Princeton Charge-Coupled Device cameras. For time-lapse data, 6 optical sections were acquired every 10 minutes through fluorescent FITC filter and Phase contrast set-ups with a 63X objective. For immunofluorescence data, a 100X objective was used instead. Photobleaching analysis was performed on a Leica SP2 confocal microscope with a 40X objective (the field depth of which is much larger than the

cell thickness) and a 488 nm laser. For FLIP experiments, stacks of 4 optical sections were acquired every 1 minute at low laser intensity, and 8 high intensity scans restricted to the outlined regions were performed between these acquisitions. For FRAP experiments, stacks of 4 optical sections were acquired every 1 minute (prebleach=2 stacks, postbleach=30 stacks), before and after a 6 high intensity scan photobleaching restricted to the outlined regions (with 20s between scans, to allow for relaxation due to lateral diffusion within membranes). In all types of live cell experiments, cells that were observed progressed through mitosis normally, during the observation itself even in the case of FRAP and FLIP (see supplemental movies). Images were processed with Metamorph (Universal Imaging) and Adobe Photoshop.

Online Supplemental Movies. TIFF image stacks of time-lapse acquisitions were assembled into Quicktime movies for online publication with Adobe Image Ready. The movies correspond to Fig. 1, Fig. 4B, Fig. 5B and 2 supplemental *in vivo* experiments.

Results

Mitotic Golgi dispersion is blocked by BFA and mitosis entry confers BFA-resistance to Golgi membranes

While Brefeldin A treatment of mitotic cells has already been used to address the problem of Golgi inheritance, these earlier studies did not ask whether BFA modifies the behavior of the Golgi in mitosis and above all did not observe if BFA effects depend on the stage of mitosis it is added. We first monitored the dynamics of the stably expressed Golgi enzyme-based fluorescent reporter GalNacT2-GFP (Storrie et al., 1998) in unsynchronized HeLa cells treated with BFA at various stages of the cell cycle (Fig. 1). This transmembrane reporter was chosen for its medial Golgi localization and its permanent association to membranes, since TGN markers such as sialyltransferase, cis-Golgi markers such as NAGTI or cytosolic proteins such as GM130 might not represent faithfully the inheritance of Golgi stacks. As detailed below, our *in vivo* observations contrast with immunofluorescence and biochemical results reported by others (Jesch and Linstedt, 1998; Seemann et al., 2002) and our time course analysis reveals new surprising aspects of mitotic Golgi dynamics.

As expected, upon BFA addition, redistribution of GalNacT2-GFP to the ER in interphase cells was complete within 5 to 30 minutes. When these cells subsequently entered mitosis in the continuous presence of the drug, GalNacT2-GFP remained localized in the ER throughout mitosis, as already described for the endogenous Golgi enzyme α -Mannosidase II (Seemann et al., 2002) (Fig. 1A).

If cells were treated with BFA during late anaphase, telophase or cytokinesis, stages at which the Golgi had already started or finished to reform, GalNacT2-GFP was similarly transported back to the ER (Fig. 1A).

In contrast, we observed that, in cells treated in prometaphase, BFA had the exact opposite effect: not only prometaphase Golgi fragments were not redistributed to the ER,

but also BFA addition stopped the process of progressive dispersion of the Golgi observed in metaphase in control cells (when Golgi markers, including GalNacT2-GFP, give a homogenous immunofluorescence staining throughout the cytoplasm, [Fig.1A top](#)). Under continuous BFA treatment, GalNacT2-GFP-positive fragments persisted in metaphase, anaphase, and accumulated in telophase into a Golgi-like structure that persisted after cytokinesis for several hours ([Fig. 1A](#)).

If cells were treated with BFA at metaphase, when the Golgi was the most dispersed (but some fragments are still often visible), we observed that a Golgi-like structure reformed during the following anaphase/telophase stages ([Fig. 1A](#)), with an additional ER GalNacT2-GFP staining.

Washout of the drug allowed for Golgi reformation in all cells ([Fig. 1B and Supplemental Movie 1](#)), regardless of the presence (lower cell) or not (upper cell) of a BFA-resistant Golgi-like structure before washout. When present, the BFA-resistant Golgi-like structure constituted the site of Golgi reassembly upon BFA washout ([Fig. 1B, lower cell, arrows](#)).

BFA-resistant membranes in telophase/cytokinesis cells often aligned along microtubules, dynamically accumulated near the centrosomes and extremities of the midbody and exchanged continuously between these two microtubule minus-end associated membrane pools in each daughter cell ([see Supplemental Movie 4](#)). This dynamic association with microtubule minus ends is similar to the behavior of the Golgi apparatus in control, non-treated telophase cells (data not shown).

In separate experiments, we confirmed and quantified this BFA-resistance of prometaphase-metaphase Golgi by immunofluorescence of endogenous proteins in wild-type HeLa cells. To avoid any secondary effect due to cell synchronization, we treated HeLa cells with BFA and followed the fate of the Golgi apparatus in mitotic cells obtained by the shake-off method on unsynchronized cell populations ([Fig. 2](#)). When cells were

incubated with BFA in interphase (3 hours before shake-off), mitosis proceeded normally and Golgi enzymes were still found in the ER in telophase/cytokinesis (Fig. 2, c). However, in 85%±5% of cells treated with BFA immediately after the shake-off, and thus for most of them in prometaphase/metaphase, we observed that a BFA-resistant Golgi-like structure that contains Golgi enzymes reformed upon mitosis exit. This Golgi-like structure was more compact and discontinuous than the Golgi apparatus in control, non-treated telophase cells (Fig 2, a), and persisted during the late stages of mitosis (Fig 2, b) in the continuous presence of BFA.

In contrast with the Golgi matrix structures proposed to serve as partitioning units (Seemann et al., 2002), the BFA-resistant structure we observe is positive for Golgi enzymes. We characterized further its composition by staining for other classes of endogenous Golgi-associated proteins, and all the ones tested are present on the Golgi-like structure (Fig. 3, Sup.Fig. 1, and data not shown): Golgi enzymes (GalNacT2-GFP, endogenous GalT and α -MannosidaseII), Golgi matrix proteins (GM130, Giantin, p115), Rabs (Rab1, Rab6), ER/Golgi cycling proteins (KDELr, ERGIC53). ERGIC53 is less enriched than Giantin in the BFA-resistant structure, as it is in the Golgi of control, non-treated telophase cells (Fig. 3 and Sup. Fig. 1). BFA-resistance is not due to a general resistance to BFA of mitotic cells since COPI, primary target of the drug as an effector of Arf1, was fully released in the cytosol and absent from Golgi-like membranes, even though it is normally Golgi-associated in untreated cells at the same stage of the cell cycle (Fig. 3 and Sup. Fig. 1). Moreover, endosomes are known to become tubular in the presence of BFA, and this tubulation process was observed in cells containing BFA-resistant Golgi-like structures (Fig. 6).

The BFA-resistant Golgi-like structure is not connected with the ER and distinct from ER exit sites

In interphase cells treated with BFA, the Golgi matrix markers GM130, GRASP65-GFP and the recycling protein p58-GFP (rat ERGIC 53 ortholog fused to GFP) colocalize with fluorescent COPII chimeras at ER exit sites while Golgi enzymes are completely redistributed in the ER (Ward et al., 2001). Therefore, the observed resistant Golgi-like structures could represent fragments of the ER or ER exit sites. We therefore stained for Sec31, a component of the COPII coat, which revealed that these structures are clearly distinct from ER export sites (Fig. 4 A). This result is consistent with the partial localization of ERGIC53 to the BFA-resistant Golgi-like structure: the abundance of a given marker in the Golgi-like structure correlates with its abundance in the Golgi of control, non-treated cells.

We next tested by Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP) whether the BFA-resistant Golgi-like structures that form in anaphase/telophase were directly connected to the underlying ER (Fig.4 B and Supplemental Movie 2). In telophase cells treated or not with BFA, a portion of the ER of one of the daughter cells was repetitively photobleached for 15 minutes and the decrease of fluorescence was quantified. In BFA-treated cells that did not show any resistant Golgi-like structure, because they had already reached telophase when the treatment started (Fig. 4 B, upper cell in lower panel), an 80% decrease in total GFP fluorescence was observed. This experiment shows that when the GalNacT2-GFP pool is entirely in the ER because of BFA, it is highly sensitive to FLIP. Note that in the second daughter cell, no photobleaching was observed, presumably because the ER/Golgi systems of the two daughter cells are independent at this late mitosis stage, which provided us an internal control for photobleaching. The same FLIP experiment was carried out in cells containing a BFA-resistant Golgi-like structure and in control, non-treated cells (Fig. 4 B, lower cell in lower panel, and upper panel). No noticeable intensity change in the Golgi-like or control Golgi pattern was observed while the ER fluorescence decreased by 90% (Fig. 4

B, [post-bleach](#)). Therefore, the BFA-resistant Golgi-like structures that reform upon mitosis exit are independent from the ER, at least on a time-scale of 15 minutes, and consequently not directly connected to it, like Golgi membranes in control, non-treated cells.

The BFA-resistant Golgi-like structure is built from pre-existing Golgi remnants

We then questioned the origin of these BFA-resistant membranes and to this issue we tested whether these Golgi-like structures are accessible to cargo transported from the ER or from the plasma membrane. BFA blocks Golgi-intersecting membrane transport pathways in interphase cells, and we confirmed that it still does even when the BFA-resistant Golgi-like structure forms from mitotic Golgi fragments.

Secretion is known to resume at telophase (Souter et al., 1993), and we observed that ^{ts045}VSVG was normally secreted at the end of mitosis in control cells ([Fig.5, a-c](#)). When BFA was added in prometaphase/metaphase, ^{ts045}VSVG was not present in the Golgi-like structure but remained in the ER, indicating that its transport from the ER to the BFA-resistant Golgi-like structure and the plasma membrane was blocked ([Fig. 5, d-f](#)).

We also confirmed by Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) experiments that, although GalNacT2-GFP is efficiently transported from the ER to the Golgi in telophase/cytokinesis in control cells, it is no longer transported from the ER to the Golgi-like structure in the presence of BFA. The Golgi area in control cells or the Golgi-like structure in BFA-treated cells was slowly photobleached for 2 minutes, to ensure that GalNacT2-GFP fluorescence recovery would not be dominated by lateral diffusion in Golgi or Golgi-like membranes. Fluorescence recovery typical of ER-Golgi transport (method originally described in Zaal et al, 1999) was observed only in control cells, and thus GalNacT2-GFP did not accumulate to the Golgi-like structure from an ER pool in BFA-treated cells, confirming that anterograde transport was blocked ([Fig. 5B and Supplemental Movie 3](#)).

In parallel, we checked whether this BFA-resistant structure could arise from downstream compartments by retrograde transport. We observed that Shiga toxin B subunit (STxB) retrograde transport (Mallard et al., 1998; Nichols et al., 2001) from the plasma membrane to the reforming Golgi and the ER functions in telophase/cytokinesis cells (Fig. 6, a-c). We used this marker to test whether BFA-resistant Golgi-like membranes are accessible to retrograde cargo. In the presence of BFA, STxB accumulated in endosomes (tubularized due to the presence of the drug) and reached neither the Golgi-like structure nor the ER (Fig. 6, d-f).

This shows that Golgi-intersecting pathways are blocked by BFA in these cells as it is the case in interphase cells (Mallard et al., 1998), and that BFA is fully active on these pathways even if added in prometaphase/metaphase. Altogether, our data indicate that the BFA-resistant Golgi-like structure is isolated both from the ER and the plasma membrane/endosomes system, and that the BFA-resistant Golgi-like structure forms and persists independently from these compartments.

This reinforced our hypothesis that these Golgi fragments were already present in prometaphase/metaphase, in a BFA-resistant state, and that addition of BFA allowed for their accumulation at microtubule minus ends. This would imply that all the Golgi markers present in the Golgi-like structure in the presence of BFA were not transported from the another compartment but rather pre-existed in prometaphase/metaphase Golgi fragments, as suggested by the FRAP experiment (Fig. 5B). In this case, if cargo were accumulated in the Golgi before mitosis, they should still be present in the BFA-resistant Golgi-like structure. Cells were thus allowed to accumulate STxB into the Golgi before mitosis, and then treated with BFA in prometaphase/metaphase. In these conditions, STxB was this time efficiently accumulated in the resistant Golgi-like structure (Fig. 7). This indicates that pre-accumulated cargo are still present in the BFA-resistant Golgi-like structure while new cargo cannot access this structure. Therefore, it is likely that all the markers that are present within the Golgi apparatus before mitosis are also present in prometaphase and metaphase

in pre-existing Golgi fragments. Upon BFA treatment, these fragments become isolated from other compartments and accumulate in telophase into a BFA-resistant Golgi-like structure in the absence of anterograde or retrograde transport towards this structure.

Discussion

BFA effect on mitotic Golgi: short time window at prometaphase/metaphase and memory effect

Previous studies have reported a role for COPI-dependent and independent pathways in mitotic Golgi breakdown (Lowe et al., 1998; Misteli and Warren, 1994; Misteli and Warren, 1995; Shorter and Warren, 2002). More generally the role of membrane traffic (Shorter and Warren, 2002), its arrest and subsequent resumption (Farmaki et al., 1999; Prescott et al., 2001), and the tuning of the anterograde/retrograde balance (Roth, 1999), have been proposed to account for mitotic Golgi disassembly and subsequent reassembly. Using BFA as a tool to block Golgi-intersecting transport pathways, we have observed that BFA addition prevents the fragmented prometaphase Golgi from dispersing, that these fragments subsequently persist throughout mitosis in the continuous presence of BFA, are inherited by daughter cells, and accumulate into a Golgi-like structure that constitutes the site of Golgi reassembly upon BFA washout. This BFA-resistant Golgi-like structure, positive for Golgi enzymes (which, in interphase, relocate to the ER within minutes of BFA treatment) and many other Golgi markers, forms upon mitosis exit also when BFA is added in metaphase, when the state of the Golgi and its relation to the ER is the most controversial.

Our findings are reminiscent of the effect of compounds affecting the activity of G proteins, namely GTP γ S and AlF₄, in a mitotic Golgi disassembly/reassembly *in vitro* system (Rabouille et al., 1995). The latter inhibit Golgi reassembly if already present during disassembly but not if present during reassembly only. In other words, Golgi membranes “remember” at which point the treatment starts. This “memory effect” implies that mitosis modifies Golgi membranes and drives them into a unique state that renders them insensitive to subsequent treatment with these GTPase-perturbing compounds.

Previous studies based on BFA treatment of mitotic cells, because they were not based on *in vivo* observation of the Golgi in single cells, overlooked this phenomenon. A study

outlined the differential behavior of Golgi matrix and Golgi resident enzymes. In interphase BFA-treated cells, Golgi enzymes relocate to the ER and Golgi matrix markers (such as the cytosolic protein GM130) to dispersed punctuate structures. When cells subsequently divide, Golgi enzymes remain in the ER and GM130 in these dispersed punctuate structures, throughout mitosis (Seemann et al., 2002), which corresponds to our observations in the case of cells treated before they enter mitosis (Fig. 2C). These dispersed structures may correspond in fact to ER exit sites (Ward et al., 2001), or, as proposed by Seemann et al, to ER-independent partitioning units, the composition of which would however require further characterization (only GM130 has been localized to these structures).

It is worth noting that the duration of mitosis is cell-type dependent, and we indeed observed that the BFA-resistance prometaphase/metaphase time window is much shorter in cells that divide faster (for example NRK cells, used by Seemann et al). Consequently, it is very unlikely to detect the BFA-resistant structure in populations of fast dividing cells without following the Golgi in live cells or adding BFA immediately after a shake-off of unsynchronized cells, which could explain why the BFA-resistant Golgi-like structure was not observed by Seemann et al. Interestingly, the Golgi inheritance controversy may result in part from cell type-dependent mitotic kinetics.

Another study provided biochemical data showing that mitotic Golgi and ER membranes of Nocodazole-arrested mitotic-like HeLa cells can be separated in the presence of BFA only if BFA is added during Nocodazole arrest and not prior to it (Jesch and Linstedt, 1998). Yet in that study the use of Nocodazole precluded a definitive conclusion: BFA effects depend on the presence of functional microtubules (Lippincott-Schwartz et al., 1990), and mitosis is blocked in an artificial metaphase-like state (at the spindle assembly checkpoint) and does not complete under these conditions. Here we show, in agreement with Lee et al. but in Nocodazole-free conditions, that BFA is unable to induce ER/Golgi fusion in prometaphase/metaphase. However, we show that BFA inhibits the normal

mitotic dispersion of the Golgi and probably its fusion with the ER. Therefore, the interpretation of the biochemical data reported in that study must now be re-evaluated. BFA cannot be used in biochemical experiments to test for the independence of Golgi and ER in mitosis because we show that it modifies the behavior of mitotic Golgi membranes and exaggeratedly isolates them from the ER. Our in vivo real time observations additionally show that Golgi remnants remain BFA-resistant during anaphase/telophase and can still be observed after the completion of cytokinesis if the drug is added in prometaphase/metaphase in unsynchronized cells.

A speculative mechanism for the memory effect

Because BFA has more than one target (Spano et al., 1999), it is difficult to hypothesize a precise mechanism for the BFA-insensitivity of prometaphase Golgi fragments and the formation of this BFA-resistant structure in telophase. Unpublished data of our lab (A. Roux, B. Goud) suggest that more than 20 additional proteins associate with rat liver Golgi membranes upon incubation with rat liver cytosol and BFA, which indicates that many other protein candidates have to be considered. For example, a complete understanding of this process should take into account the BFA-induced ADP-ribosylation of CtBP/BARS-50 and GAPDH (Mironov et al., 1997) and their effect on Golgi membrane dynamics.

Our data indicate that BFA must be used with caution to study Golgi dynamics in mitosis: we show that Golgi membranes resist BFA action even though the primary target of BFA, Arf1/COPI, is inactivated. It was completely unexpected that BFA, which induces the accelerated artificial retrograde transport of Golgi membranes to the ER within minutes of treatment in interphase cells, apparently blocks the natural dispersion of Golgi membranes in prometaphase/metaphase (all the more as this dispersion could be a consequence of their retrograde transport to the ER).

The minus end-directed movement of BFA-resistant Golgi-like membranes suggests that the dynein machinery is already active at this stage (Addinall et al., 2001; Niclas et al., 1996), and that its binding to membranes and microtubule-based movement are normally restored in the presence of BFA. This is surprising since the spectrin/ankyrin meshwork, necessary for dynein/dynactin membrane attachment, is highly sensitive to BFA (Godi et al., 1998). This may indicate that part of the Golgi maturation process still occurs in the presence of BFA at mitosis exit. Completion of normal Golgi maturation is however inhibited by BFA. For instance, preliminary EM observations fail to detect stacked cisternae in cells exhibiting the Golgi-like BFA-resistant structure (data not shown). This structure seems to consist rather of vesicle/tubule clusters in the centrosome region that are similar to the Golgi tubulo-vesicular clusters observed by others in mitotic cells (Acharya et al., 1998; Jokitalo et al., 2001; Lucocq et al., 1989; Lucocq et al., 1987; Shima et al., 1997). The incomplete maturation into a normally structured Golgi indicates that BFA-sensitive factors, possibly Arf1/COPI, play a role in the process of Golgi membranes fusion into cisternae and their stacking, which could be directly tested in *in vitro* systems.

The “memory effect” we report implies that the initial state of Golgi membranes during BFA treatment is crucial. When treatment starts during prometaphase/metaphase, either factors necessary for BFA action are depleted from the Golgi initially (or inactivated, see Robertson and Allan, 2000) and cannot associate with membranes in the presence of BFA, and/or factors protecting the Golgi from BFA action cannot dissociate from those membranes in the presence of BFA. Many speculative molecular schemes can be drawn to explain the memory effect. We believe that there is a molecule X, a target of BFA, that is modified (say, ribosylated) by BFA addition, and that is also modified in mitosis (say, successively phosphorylated in prophase and dephosphorylated in anaphase). Clearly, if the BFA-induced modification occurs in prophase, it can interfere with the successive action of prophase kinases and anaphase phosphatases on X, if for example the BFA-

induced modification prevents recognition of X by anaphase phosphatases as a substrate (hence the memory effect).

Persistence of an independent Golgi throughout mitosis which is transiently BFA-resistant in prometaphase/metaphase

We propose the following model, synthesizing the two current extreme but non-exclusive views of mitotic Golgi inheritance, to explain our results (Jesch et al., 2001; Jokitalo et al., 2001; Rossanese and Glick, 2001; Seemann et al., 2002; Zaal et al., 1999). The Golgi starts disassembling in prophase and generates fragments containing all classes of Golgi markers and pre-accumulated cargo. These prometaphase Golgi fragments are in a unique state in the sense that BFA treatment would not induce their fusion with the ER but block their normal mitotic dispersion, and that a continuous BFA-induced block of Golgi-intersecting traffic would isolate them from other compartments throughout mitosis in this “frozen” state but not prevent them from aggregating towards microtubule minus ends in telophase. These Golgi fragments cannot form when Golgi membranes are redistributed to the ER by BFA treatment prior to mitosis, explaining the absence of the Golgi-like structure under these conditions (Fig. 1A and 2). From prometaphase to metaphase, Golgi fragments are further dispersed, likely by progressive retrograde transport and fusion with the ER. Some fragments still remain in metaphase (visible at least in the spindle area, from which the ER is excluded, see Jesch et al., 2001) and they would behave as prometaphase Golgi fragments under BFA treatment, hence the partial BFA-resistance we observe in telophase when BFA is added in metaphase instead of prometaphase. These metaphase fragments then coalesce and contribute to Golgi reassembly in anaphase/telophase (Supplemental Movie 5). Another possibility is that there are two distinct sets of mitotic Golgi fragments (for example the already described tubulo-vesicular clusters and free vesicles) and only one of the two sets is BFA-resistant. In this case, the cisternal tubulo-vesicular remnants would be BFA-resistant while the free vesicles (essentially generated during transition from prometaphase to metaphase) would not.

One prediction of our model is that a selective ER export block initiated during the prometaphase/metaphase time window will not affect the existence of prometaphase or metaphase Golgi fragments and will allow for their aggregation into a Golgi-like structure in telophase. The role of ER export in post-metaphase Golgi reformation has in fact already been addressed by micro-injecting dominant negative mutants of the GTPase Sar1, thus blocking ER export, either in asynchronous cell populations (Zaal et al., 1999) or in prometaphase/metaphase cells (Prescott et al., 2001) and observing cells fixed in cytokinesis. Under these conditions, Golgi markers were mostly found in the ER upon mitosis exit, but some Golgi fragments remained (Nelson, 2000; Zaal et al., 1999) and were localized in the juxtannuclear region as the reforming Golgi in non-injected cells (Prescott et al., 2001). EM analysis of these cells showed that tubulovesicular clusters accumulated in the same region (Prescott et al., 2001). Altogether, we believe that these studies fit our conclusion and that the relatively small proportion of cells showing reformation of a Golgi-like structure in the absence of ER export (Prescott et al., 2001) is due to the very short time window during which this can be observed. Ideally, one should trigger the mutant Sar1-induced ER export block in prometaphase/metaphase, and observe the fate of Golgi markers in cytokinesis. This is of course very difficult even upon purified protein micro-injection of prometaphase/metaphase cells because the time of micro-injection and the start of the ER export block do not necessarily coincide.

In conclusion, our study unravels a new temporal view of the evolution of Golgi membranes in mitosis. A sharp transition in prometaphase drives Golgi membranes into a unique state in which they become BFA-insensitive and would remain exaggeratedly isolated from the ER under continuous BFA treatment throughout mitosis. Then as cells progress towards metaphase, the Golgi is progressively dispersed further, presumably through fusion with the ER, but fragments remain that bear the same BFA-resistance as

prometaphase Golgi fragments. These prometaphase and metaphase Golgi fragments can be artificially isolated from other compartments by blocking Golgi-intersecting anterograde and retrograde traffic. Therefore, a subset of Golgi membranes naturally persists throughout mitosis that contain all classes of Golgi markers and aggregate upon mitosis exit to contribute to Golgi reassembly.

Acknowledgements

We thank E.G. Berger, B. L. Tang, G. Warren, M. Rojo for the kind gift of antibodies, J. White for the GalNacT2-GFP HeLa cell line and ^{tsO45}VSVG-GFP plasmid, L. Johannes for purified STxB, N. Altan and J. Lippincott-Schwartz for communicating results prior to publication and many stimulating discussions, L. Ovtracht for expert technical assistance. We also thank D. Cassel and M. van Overbeek for helpful comments on the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, and a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC/5747).

References

- Acharya, U., Jacobs, R., Peters, J. M., Watson, N., Farquhar, M. G. and Malhotra, V.** (1995). The formation of Golgi stacks from vesiculated Golgi membranes requires two distinct fusion events. *Cell* **82**, 895-904.
- Acharya, U., Mallabiabarrena, A., Acharya, J. K. and Malhotra, V.** (1998). Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell* **92**, 183-92.
- Addinall, S. G., Mayr, P. S., Doyle, S., Sheehan, J. K., Woodman, P. G. and Allan, V. J.** (2001). Phosphorylation by cdc2-CyclinB1 kinase releases cytoplasmic dynein from membranes. *J Biol Chem* **276**, 15939-44.
- Barr, F. A., Puype, M., Vandekerckhove, J. and Warren, G.** (1997). GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae. *Cell* **91**, 253-62.
- Colanzi, A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H. and Malhotra, V.** (2000). A specific activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *J Cell Biol* **149**, 331-9.
- Farmaki, T., Ponnambalam, S., Prescott, A. R., Clausen, H., Tang, B. L., Hong, W. and Lucocq, J. M.** (1999). Forward and retrograde trafficking in mitotic animal cells. ER-Golgi transport arrest restricts protein export from the ER into COPII-coated structures. *J Cell Sci* **112**, 589-600.
- Godi, A., Santone, I., Pertile, P., Devarajan, P., Stabach, P. R., Morrow, J. S., Di Tullio, G., Polishchuk, R., Petrucci, T. C., Luini, A. et al.** (1998). ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8607-12.
- Hammond, A. T. and Glick, B. S.** (2000). Dynamics of Transitional Endoplasmic Reticulum Sites in Vertebrate Cells. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3013-3030.
- Jesch, S. A. and Linstedt, A. D.** (1998). The Golgi and endoplasmic reticulum remain independent during mitosis in HeLa cells. *Mol Biol Cell* **9**, 623-35.
- Jesch, S. A., Mehta, A. J., Velliste, M., Murphy, R. F. and Linstedt, A. D.** (2001). Mitotic Golgi is in a dynamic equilibrium between clustered and free vesicles independent of the ER. *Traffic* **2**, 873-84.
- Jokitalo, E., Cabrera-Poch, N., Warren, G. and Shima, D. T.** (2001). Golgi clusters and vesicles mediate mitotic inheritance independently of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **154**, 317-330.
- Kano, F., Takenaka, K., Yamamoto, A., Nagayama, K., Nishida, E. and Murata, M.** (2000). MEK and Cdc2 Kinase Are Sequentially Required for Golgi Disassembly in MDCK Cells by the Mitotic Xenopus Extracts. *J. Cell Biol.* **149**, 357-368.
- Klumperman, J.** (2000). The growing Golgi: in search of its independence. *Nat Cell Biol* **2**, E217-9.
- Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J. G., Schweizer, A., Berger, E. G., Hauri, H. P., Yuan, L. C. and Klausner, R. D.** (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**, 821-836.
- Lowe, M.** (2002). Golgi Complex: Biogenesis de novo? *Curr Biol* **12**, R166-7.
- Lowe, M., Gonatas, N. K. and Warren, G.** (2000). The mitotic phosphorylation cycle of the cis-Golgi matrix protein GM130. *J Cell Biol* **149**, 341-56.
- Lowe, M., Nakamura, N. and Warren, G.** (1998). Golgi division and membrane traffic. *Trends Cell Biol* **8**, 40-4.
- Lucocq, J. M., Berger, E. G. and Warren, G.** (1989). Mitotic Golgi fragments in HeLa cells and their role in the reassembly pathway. *J Cell Biol* **109**, 463-74.
- Lucocq, J. M., Pryde, J. G., Berger, E. G. and Warren, G.** (1987). A mitotic form of the Golgi apparatus in HeLa cells. *J Cell Biol* **104**, 865-74.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. and Johannes, L.** (1998). Direct Pathway from Early/Recycling Endosomes to the Golgi Apparatus Revealed through the Study of Shiga Toxin B-fragment Transport. *J. Cell Biol.* **143**, 973-990.

- Miles, S., McManus, H., Forsten, K. E. and Storrie, B.** (2001). Evidence that the entire Golgi apparatus cycles in interphase HeLa cells: sensitivity of Golgi matrix proteins to an ER exit block. *J. Cell Biol.* **155**, 543-556.
- Mironov, A., Colanzi, A., Silletta, M. G., Fiucci, G., Flati, S., Fusella, A., Polishchuk, R., Mironov, A., Jr., Di Tullio, G., Weigert, R. et al.** (1997). Role of NAD⁺ and ADP-ribosylation in the maintenance of the Golgi structure. *J Cell Biol* **139**, 1109-18.
- Misteli, T. and Warren, G.** (1994). COP-coated vesicles are involved in the mitotic fragmentation of Golgi stacks in a cell-free system. *J Cell Biol* **125**, 269-82.
- Misteli, T. and Warren, G.** (1995). A role for tubular networks and a COP I-independent pathway in the mitotic fragmentation of Golgi stacks in a cell-free system. *J Cell Biol* **130**, 1027-39.
- Nelson, W. J.** (2000). W(h)ither the Golgi during Mitosis? *J. Cell Biol.* **149**, 243-248.
- Nichols, B. J., Kenworthy, A. K., Polishchuk, R. S., Lodge, R., Roberts, T. H., Hirschberg, K., Phair, R. D. and Lippincott-Schwartz, J.** (2001). Rapid Cycling of Lipid Raft Markers between the Cell Surface and Golgi Complex. *J. Cell Biol.* **153**, 529-542.
- Niclas, J., Allan, V. J. and Vale, R. D.** (1996). Cell cycle regulation of dynein association with membranes modulates microtubule-based organelle transport. *J Cell Biol* **133**, 585-93.
- Pelletier, L., Jokitalo, E. and Warren, G.** (2000). The effect of Golgi depletion on exocytic transport. *Nat Cell Biol* **2**, 840-846.
- Prescott, A. R., Farmaki, T., Thomson, C., James, J., Paccaud, J. P., Tang, B. L., Hong, W., Quinn, M., Ponnambalam, S. and Lucocq, J.** (2001). Evidence for Prebudding Arrest of ER Export in Animal Cell Mitosis and its Role in Generating Golgi Partitioning Intermediates. *Traffic* **2**, 321-335.
- Rabouille, C., Misteli, T., Watson, R. and Warren, G.** (1995). Reassembly of Golgi stacks from mitotic Golgi fragments in a cell-free system. *J Cell Biol* **129**, 605-18.
- Robertson, A. M. and Allan, V. J.** (2000). Brefeldin A-dependent membrane tubule formation reconstituted in vitro is driven by a cell cycle-regulated microtubule motor. *Mol Biol Cell* **11**, 941-55.
- Rossanese, O. W. and Glick, B. S.** (2001). Deconstructing golgi inheritance. *Traffic* **2**, 589-96.
- Rossanese, O. W., Soderholm, J., Bevis, B. J., Sears, I. B., O'Connor, J., Williamson, E. K. and Glick, B. S.** (1999). Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**, 69-81.
- Roth, M. G.** (1999). Inheriting the Golgi. *Cell* **99**, 559-562.
- Rothman, J. E. and Warren, G.** (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr Biol* **4**, 220-33.
- Seemann, J., Pypaert, M., Taguchi, T., Malsam, J. and Warren, G.** (2002). Partitioning of the Matrix Fraction of the Golgi Apparatus During Mitosis in Animal Cells. *Science* **295**, 848-851.
- Shima, D. T., Haldar, K., Pepperkok, R., Watson, R. and Warren, G.** (1997). Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells. *J. Cell Biol.* **137**, 1211-1228.
- Shorter, J. and Warren, G.** (2002). Golgi architecture and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**, 379-420.
- Shorter, J., Watson, R., Giannakou, M. E., Clarke, M., Warren, G. and Barr, F. A.** (1999). GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system. *Embo J* **18**, 4949-60.
- Souter, E., Pypaert, M. and Warren, G.** (1993). The Golgi stack reassembles during telophase before arrival of proteins transported from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **122**, 533-40.
- Spano, S., Silletta, M. G., Colanzi, A., Alberti, S., Fiucci, G., Valente, C., Fusella, A., Salmona, M., Mironov, A., Luini, A. et al.** (1999). Molecular cloning and functional characterization of brefeldin A-ADP-ribosylated substrate. A novel protein involved in the maintenance of the Golgi structure. *J Biol Chem* **274**, 17705-10.
- Storrie, B., White, J., Rottger, S., Stelzer, E. H., Sugauma, T. and Nilsson, T.** (1998). Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering. *J Cell Biol* **143**, 1505-21.

Sutterlin, C., Lin, C.-Y., Feng, Y., Ferris, D. K., Erikson, R. L. and Malhotra, V. (2001). Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis. *PNAS*, 161283998.

Ward, T. H., Polishchuk, R. S., Caplan, S., Hirschberg, K. and Lippincott-Schwartz, J. (2001). Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export. *J. Cell Biol.* **155**, 557-570.

Warren, G. and Malhotra, V. (1998). The organisation of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 493-8.

Zaal, K. J., Smith, C. L., Polishchuk, R. S., Altan, N., Cole, N. B., Ellenberg, J., Hirschberg, K., Presley, J. F., Roberts, T. H., Siggia, E. et al. (1999). Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis. *Cell* **99**, 589-601.

Abbreviations

Arf1: ADP-ribosylation factor 1

BFA: Brefeldin A

EM: Electron microscopy

ER: Endoplasmic reticulum

GalT: β 1,4-Galactosyltransferase

GalNacT2: N-acetylgalactos-aminyltransferase 2

GFP: Green fluorescent protein

ManII: β mannosidase II

NEM: N-ethylmaleimide

NRK: normal rat kidney

Figure legends

Fig. 1. Analysis of BFA effects throughout the cell cycle.

A. Unsynchronized GalNacT2-GFP HeLa cells were treated with BFA or not and imaged by time-lapse microscopy (time indicated in min:sec). When BFA treatment was initiated in interphase, GalNacT2 was quickly relocated in the ER and remained so as cells progressed through mitosis. When BFA treatment was initiated in prometaphase, Golgi fragments did not disperse further and persisted instead throughout mitosis, aggregating into a BFA-resistant Golgi-like structure in telophase. When BFA treatment was initiated in metaphase, as the Golgi is the most dispersed, the same BFA-resistant Golgi-like structure formed in telophase, with an additional ER background. When BFA treatment was initiated as the Golgi had already started to reform (late anaphase/telophase), GalNacT2 was quickly relocated in the ER. Bar: 10 μ m.

B. GalNacT2-GFP HeLa cells were treated with BFA for 1 hour. Telophase cells containing a BFA-resistant Golgi-like structure or not were observed by time-lapse microscopy upon BFA washout. The Golgi reformed in all cells, regardless of the presence (lower cell) or absence (upper cell) of the Golgi-like structure initially. When present, the Golgi-like structure consisted the site of Golgi reassembly (arrows), as *de novo* formed GalNacT2-GFP-positive structures converged towards this site. Bar: 10 μ m.

Fig. 2. A Golgi-like BFA-resistant structure forms in mitotic cells when BFA treatment starts during mitosis.

Wild-type mitotic HeLa cells were collected by shake-off and plated on coverslips for 2 hours without (**a**) or with BFA (**b**). Alternatively, cells were treated with BFA for 3 hours, mitotic cells were collected by shake-off and plated for 2 hours with BFA (**c**). Cells were then fixed and stained for endogenous GalT. This experiment confirms that a BFA-resistant

structure reforms upon mitosis exit if BFA treatment starts during mitosis, but not if the treatment starts before entry into mitosis. Bar: 10 μ m.

Fig. 3. The Golgi-like BFA-resistant structure contains several classes of Golgi markers.

Mitotic HeLa cells were collected, immediately incubated for 2 hours with BFA, fixed and stained for endogenous Giantin, GM130, p115, ERGIC53, KDELr, Rab1, Rab6, GalT and DNA. The BFA-resistant structure is positive for Golgi enzymes, Golgi matrix markers, Golgi-associated Rabs and ER-Golgi recycling proteins. Bar: 10 μ m.

Fig. 4. The Golgi-like BFA-resistant structure is distinct from ER exit sites and is not connected to the ER.

A. Mitotic HeLa cells were collected, immediately incubated for 2 hours with BFA, fixed and stained for endogenous Giantin and Sec31. The Golgi-like structure does not correspond to COPII-positive ER exit sites. Bar: 10 μ m.

B. Mitotic GalNacT2-GFP HeLa cells were collected, treated or not with BFA and allowed to reach telophase. As indicated in figure 1, if BFA was added during anaphase/telophase, Golgi enzymes were relocated in the ER (top cell, lower panel). In these conditions, FLIP of the ER pool of GalNacT2-GFP led to an 80% reduction in total cell fluorescence. In contrast, the BFA resistant Golgi-like structure observed in cells treated during metaphase (bottom cell, lower panel), as well as the Golgi in control, non-treated cells (upper panel), were not bleached upon photobleaching of the ER. Bar: 10 μ m.

Fig. 5. The BFA-resistant Golgi-like structure forms in the absence of anterograde transport towards the Golgi.

A. The anterograde transport of ^{tsO45}VSVG was monitored in asynchronous populations of HeLa cells transfected with ^{tsO45}VSVG-GFP and incubated in the absence or presence of 5 μ g/mL BFA. Cells were fixed 180 minutes after the temperature shift (t=0 minutes) and

stained for endogenous GalT (**a, d**, red **c, f**) and DNA (DAPI, blue **c, f**). ^{tsO45}VSVG-GFP (**b, e**, green **c, f**) was entirely distributed in the ER at t=0 minutes in all cells, and therefore efficiently accumulated in the ER before the temperature shift (not shown). At t=120 minutes, ^{tsO45}VSVG-GFP was present in the Golgi area and already visible at the plasma membrane in interphase cells as well as cytokinesis cells in the absence of BFA (not shown), and at t=180 minutes it was mostly distributed at the plasma membrane (**a-c**). The anterograde transport of VSVG was thus normal in non-treated cells during mitosis exit. In the presence of BFA, ^{tsO45}VSVG-GFP remained accumulated in the ER from t=0 minutes to t=180 minutes in all cells including those that had formed the Golgi-like BFA-resistant structure upon mitosis exit (**d-f**). Therefore the Golgi-like structure forms in the absence of anterograde transport. Bar: 10 μ m.

B. The Golgi-like structure or the Golgi area was bleached in one of the 2 daughter cells in cells treated with BFA in prometaphase/metaphase (lower panel) or non-treated cells (upper panel) respectively. The fluorescence recovery was then monitored. No recovery was observed in BFA-treated cells while normal recovery, typical of ER-Golgi anterograde transport, was observed in control cells. Bar: 10 μ m.

Fig. 6. The BFA-resistant Golgi-like structure forms in the absence of retrograde transport towards the Golgi.

Mitotic HeLa cells were collected and immediately incubated for 2 hours (insets, 1 hour) with Cy3-STxB (red) in the absence (**a-c**) or presence (**d-f**) of BFA. Cells were fixed and stained for endogenous GalT (green) and DNA (blue). STxB retrograde transport functions at the end of mitosis in untreated cells (**a-c**). BFA treatment blocks STxB in tubularized endosomes (**d-f**), showing that new retrograde cargo cannot access the BFA-resistant Golgi-like structures. Bar: 10 μ m.

Fig. 7. The BFA-resistant Golgi-like structure contains pre-accumulated cargo.

HeLa cells were first incubated with Cy3-STxB for 1 hour, washed, and mitotic cells were collected by shake off. STxB-loaded mitotic cells were then incubated for 2 hours with BFA. Cells were fixed and stained for endogenous GalT (green) and DNA (blue). Pre-accumulated STxB is present in the Golgi-like structure. Bar: 10 μ m.

Supplemental Figure 1. Control, non-treated HeLa cells were stained as in Fig. 3. This shows that γ COP as well as many other endogenous Golgi markers are present on the Golgi in telophase cells. All but γ COP are also present on the BFA-resistant Golgi-like structure (Fig. 3). Bar: 10 μ m.

Supplemental Movie 1. Movie corresponding to Fig. 1B.

Supplemental Movie 2. Movie corresponding to Fig. 4B.

Supplemental Movie 3. Movie corresponding to Fig. 5B.

Supplemental Movie 4. Movie corresponding to an additional experiment. The same FRAP experiment as in Fig. 5B was repeated with a bleached region corresponding to only one of the 2 BFA-resistant Golgi-like pools present in each daughter cells (centrosome- or midbody-associated).

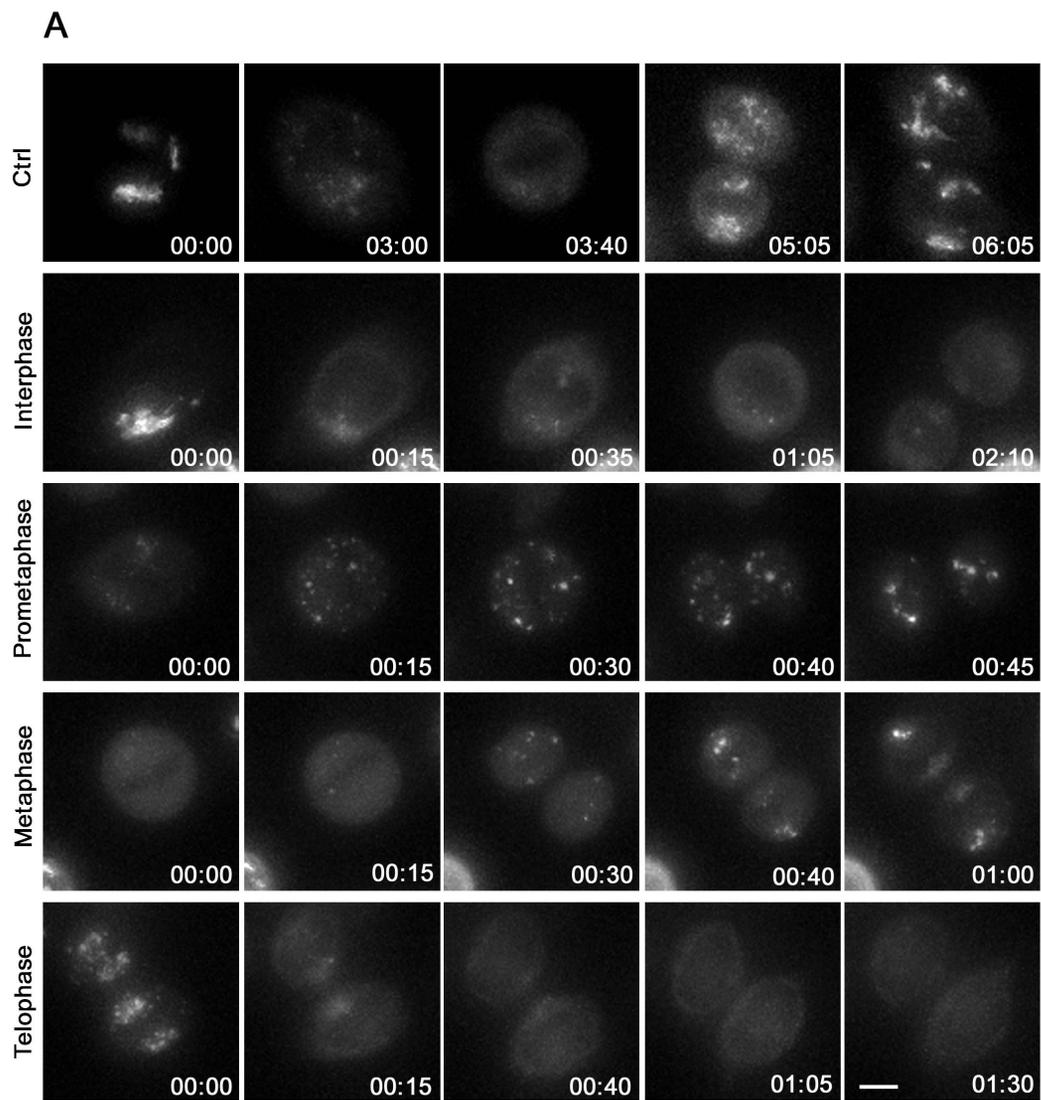
This movie shows a cell in telophase that has formed a BFA-resistant Golgi-like structure. In the lower daughter cell, a portion of a Golgi-like structure was bleached, and recovery occurred within 3/5 minutes. In the upper daughter cell, one of the two Golgi-like structures, associated with the midbody, was bleached, and rapid recovery was also observed. Movement of GalNacT2-GFP-positive membranes coming from the juxtannuclear Golgi-like structure towards the bleached region was tracked.

Very intense membrane transport occurs between the two BFA-resistant structures (centrosome- and midbody-associated in the upper daughter cell), and the recovery after photobleaching is mainly due to transport of membrane between these two structures. Such a transport is also observed between the two microtubule minus-end-associated Golgi pools

in control, non-treated, cells. This result highlights the dynamics of BFA-resistant membranes, presumably along microtubules.

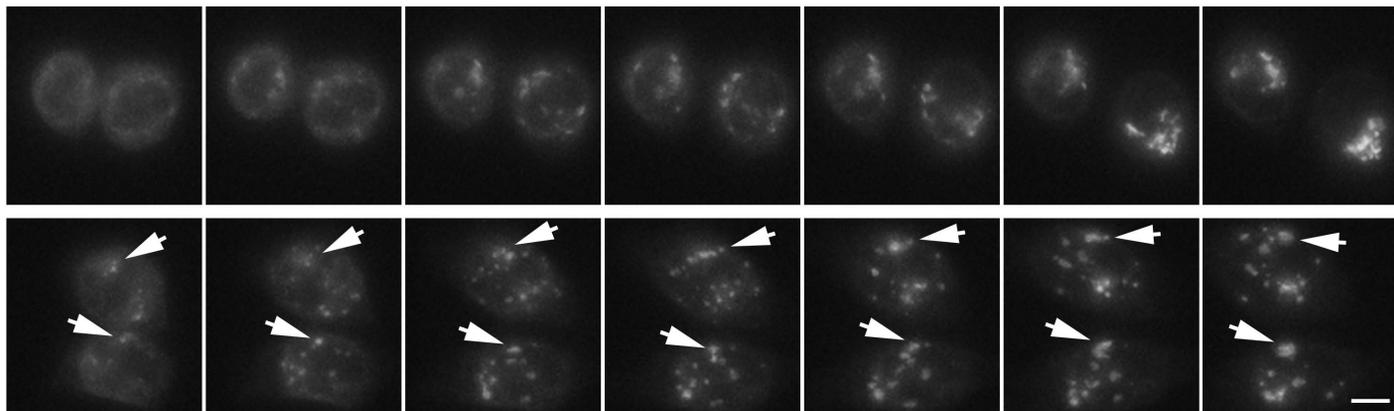
Supplemental Movie 5. Movie corresponding to an additional *in vivo* experiment. The same FLIP protocol as in Fig. 4B was applied to (non-treated) metaphase GalNacT2-GFP HeLa cells, that were then observed and continuously bleached as they progressed through mitosis.

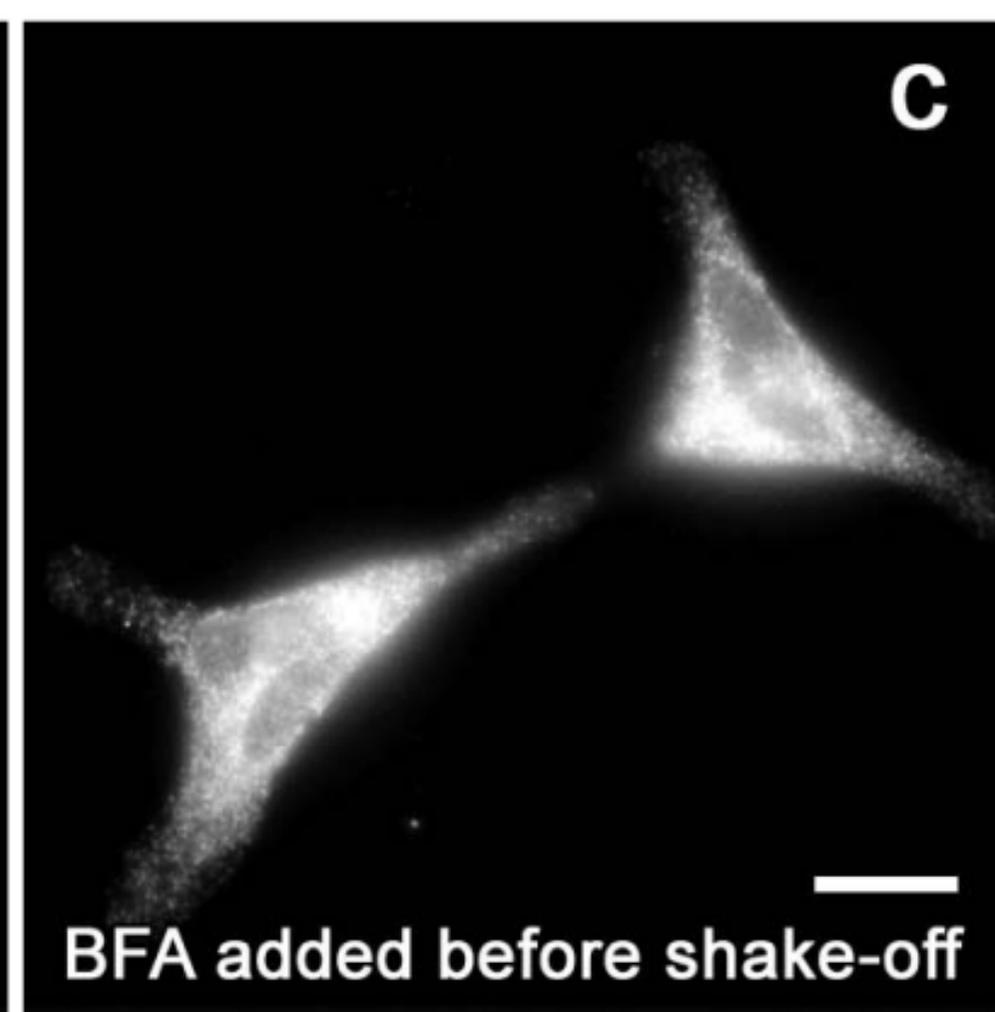
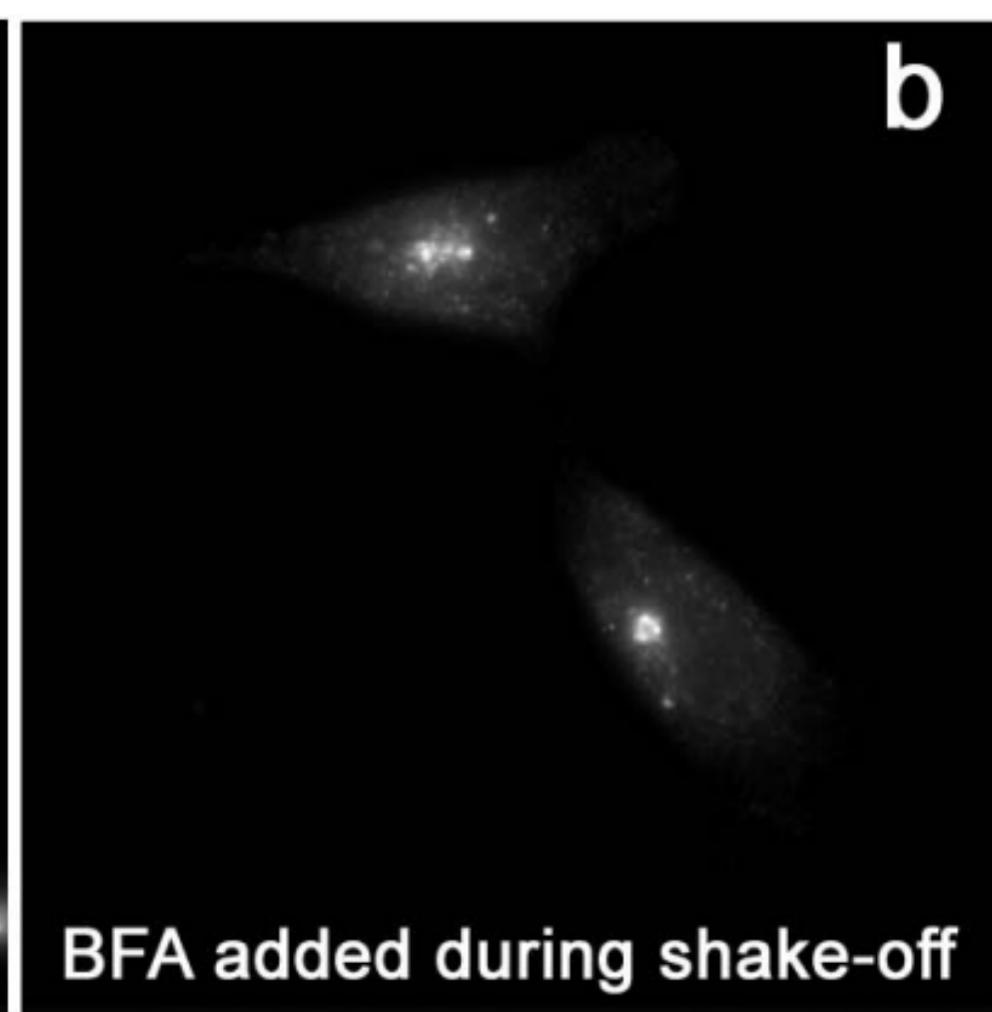
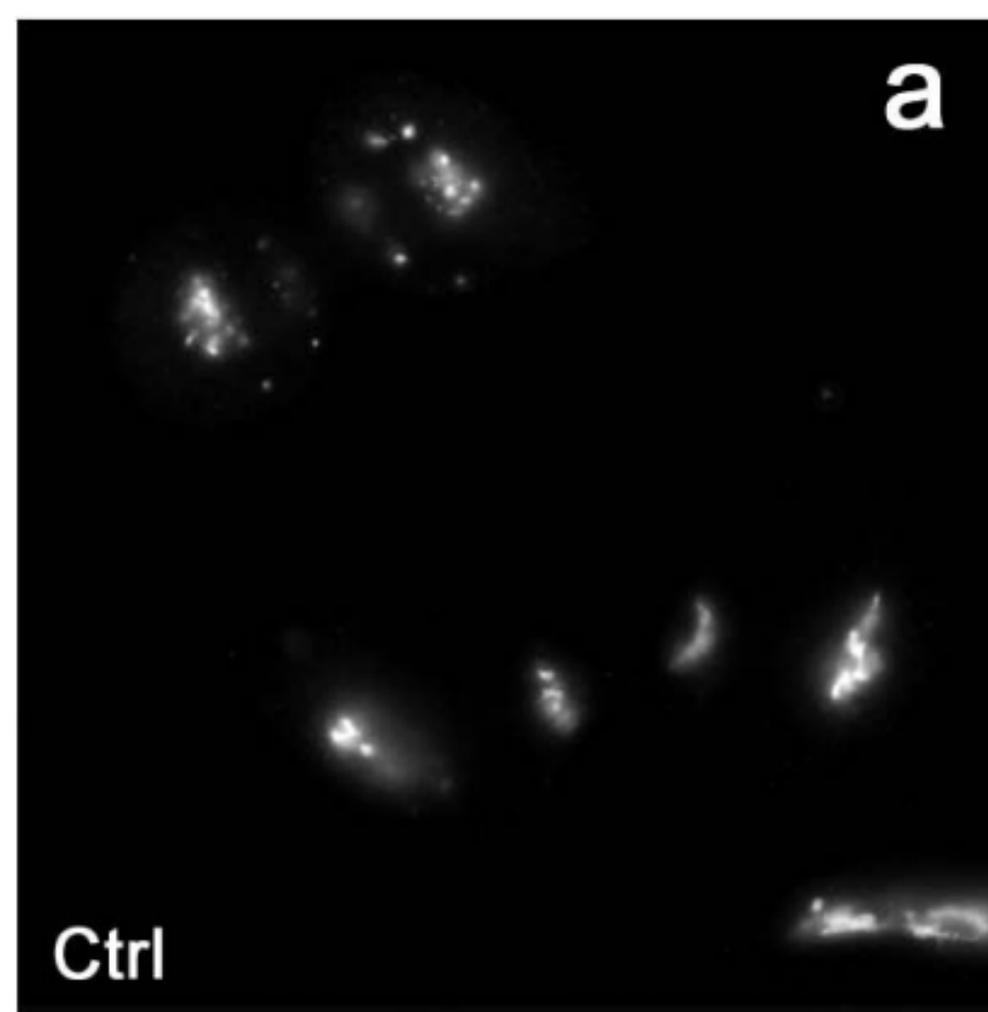
In metaphase, the GalNacT2-GFP staining is essentially diffuse, but small structures are visible. In the course of the FLIP experiment, the diffuse fluorescence signal is reduced while the fluorescent structures become more contrasted, and aggregate to form the Golgi in anaphase/telophase. This shows that small Golgi structures naturally exist in metaphase HeLa cells, and that the Golgi is reformed at least in part from these coalescing structures. We propose that the Golgi-like fragments that become frozen and aggregate into the BFA-resistant structure observed in telophase in cells treated in metaphase (Fig. 1, 2) are originated from naturally existing metaphase Golgi fragments that fuse together as the Golgi reforms in non-treated cells.

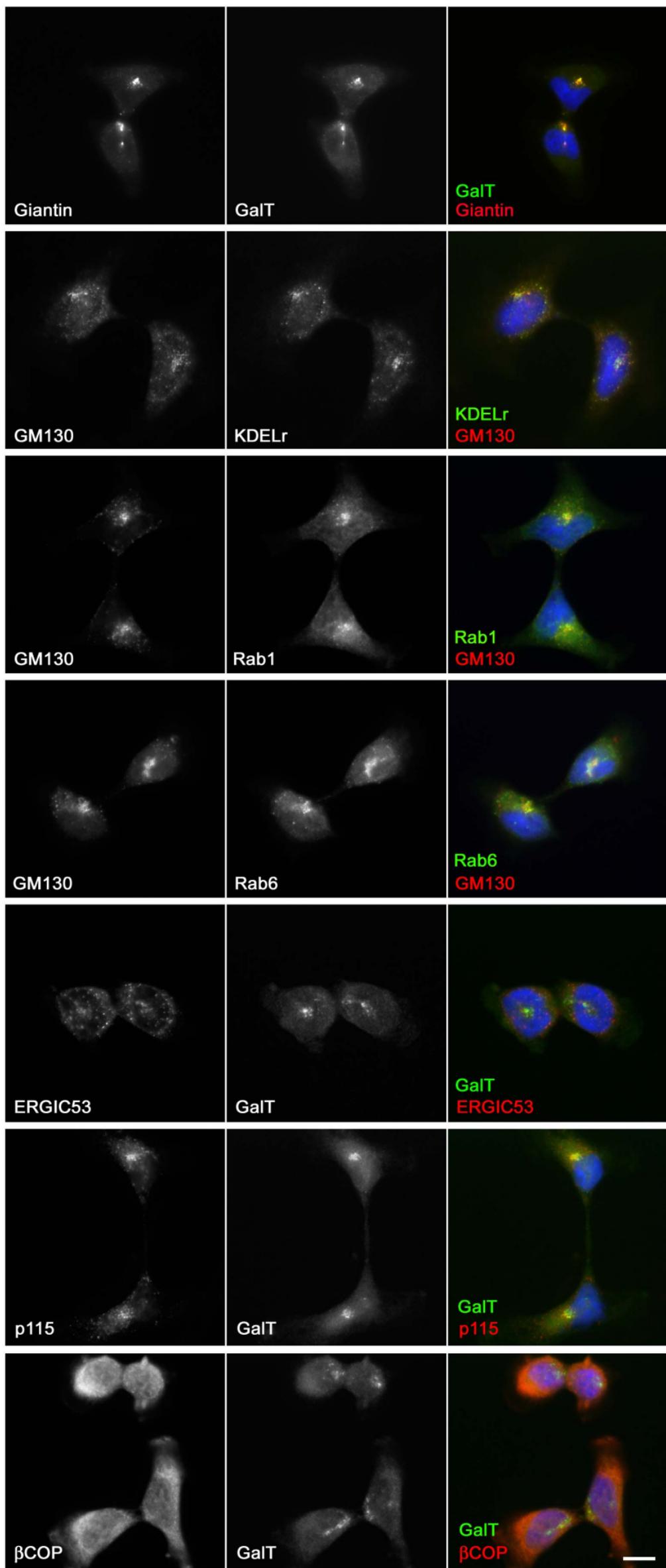


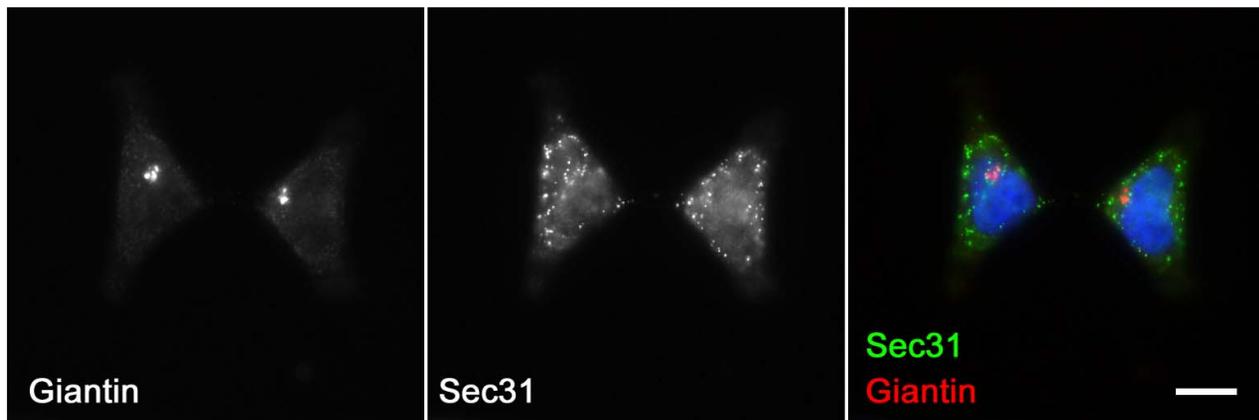
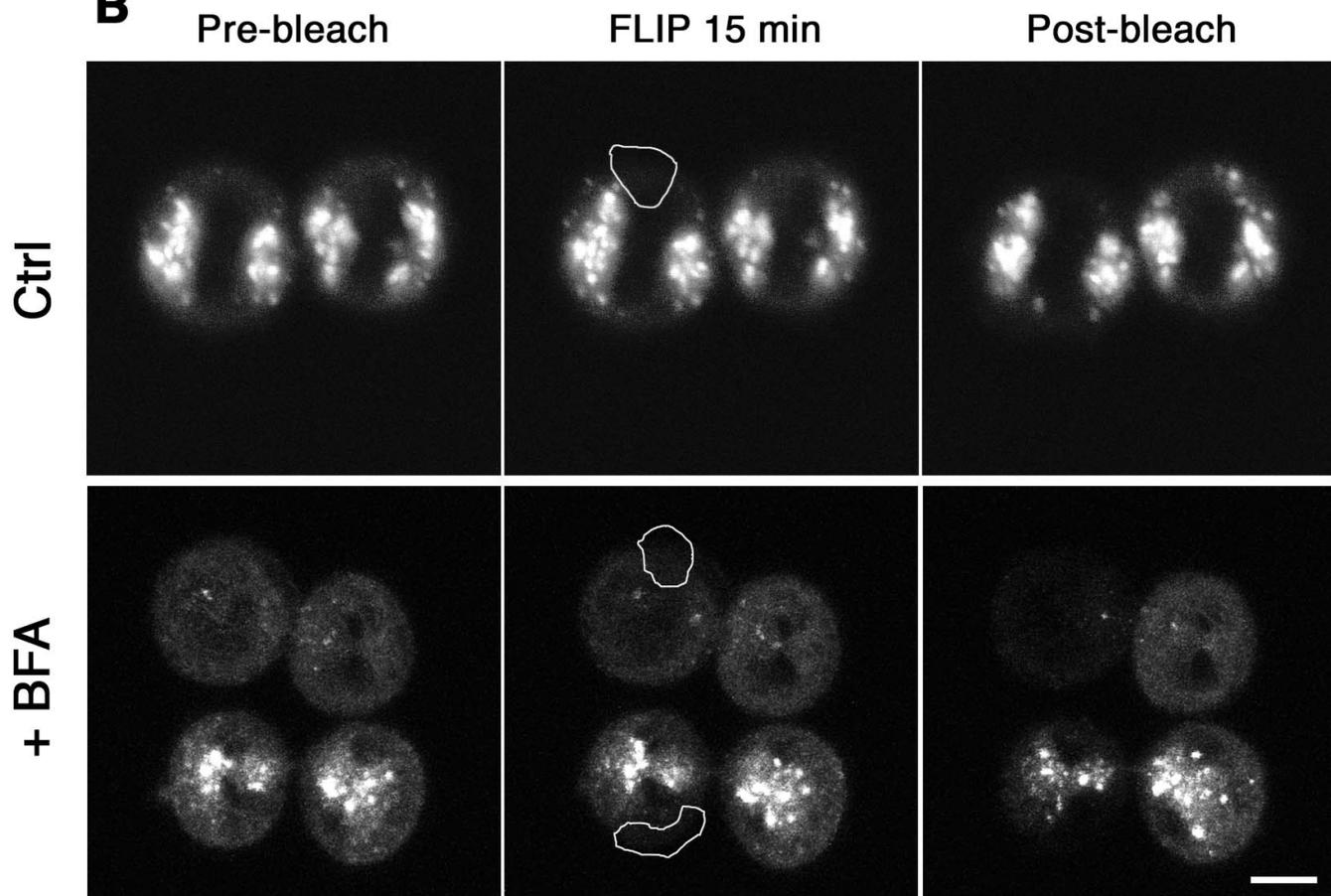
B

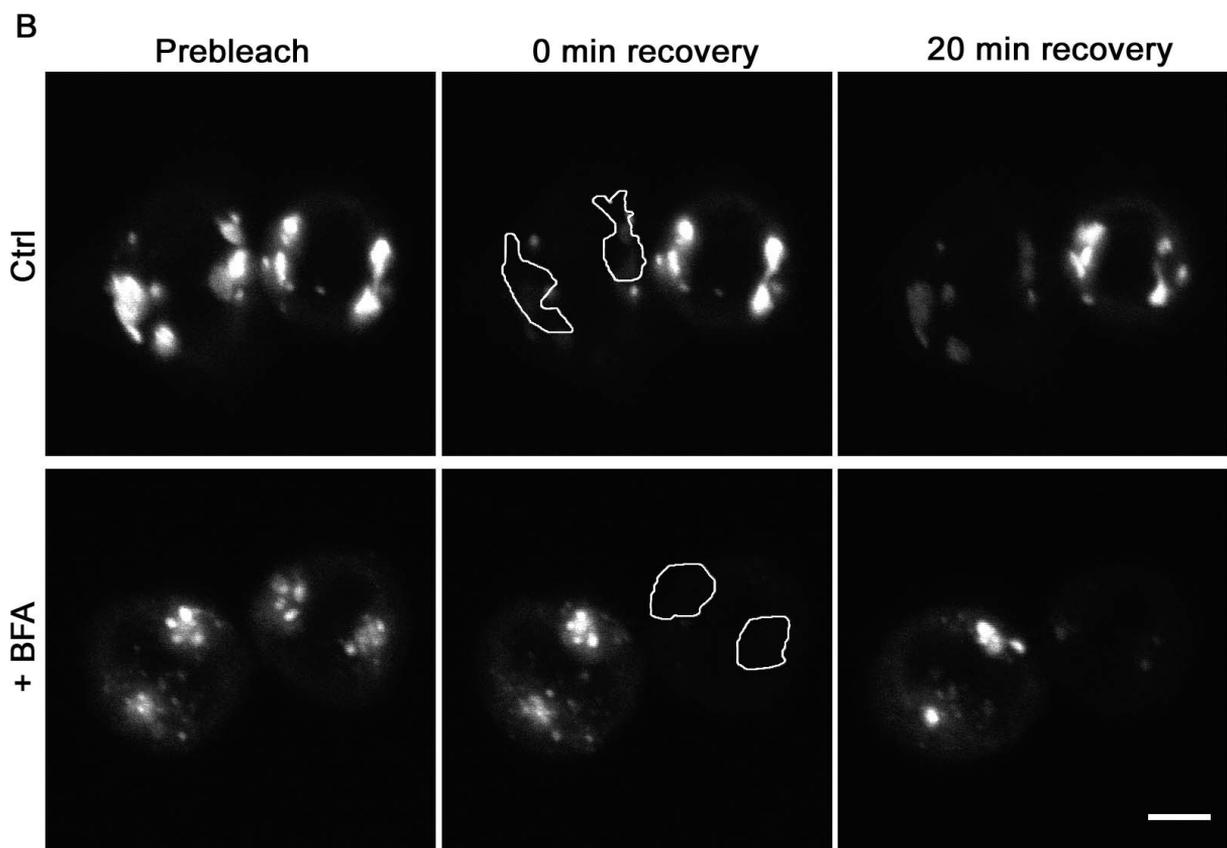
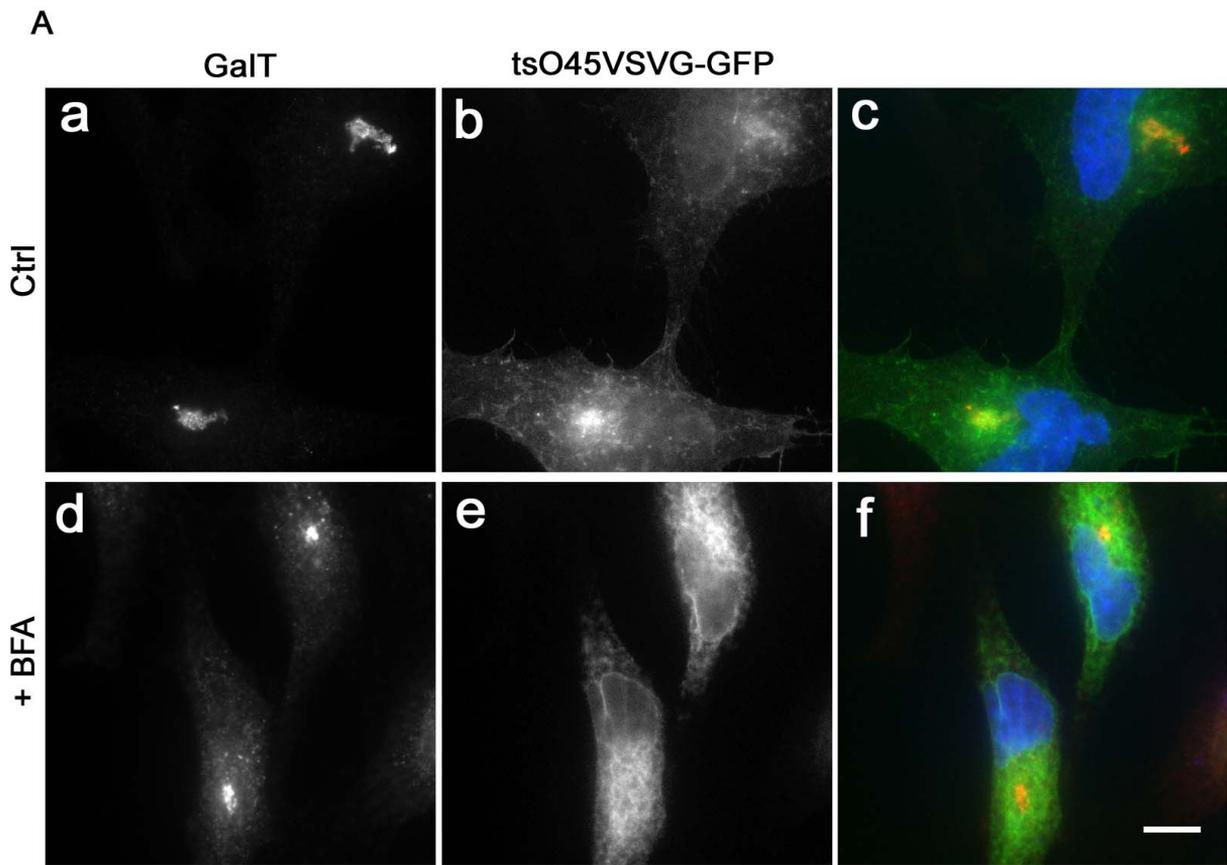
00:00 00:20 00:45 00:55 01:10 01:35 02:05

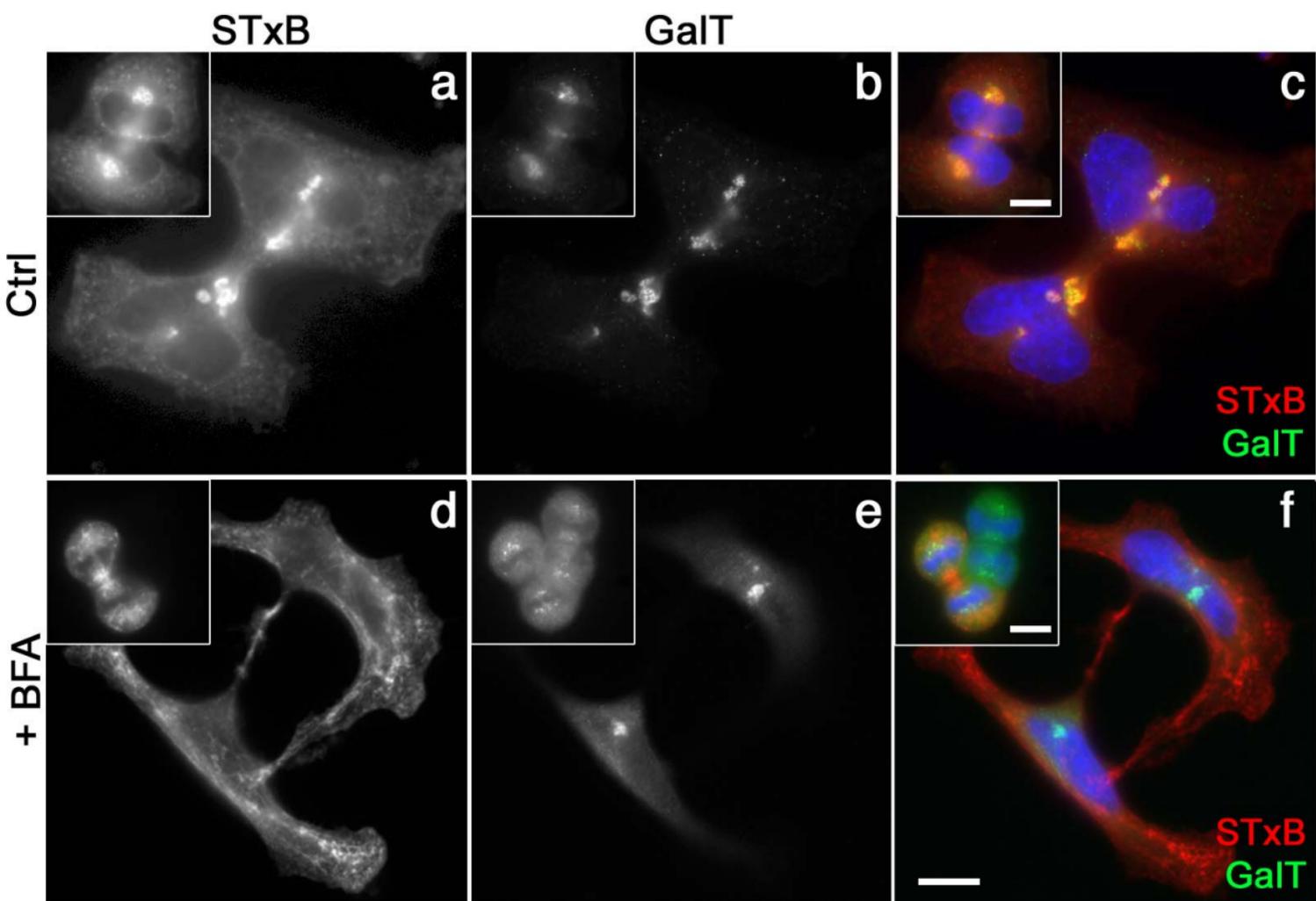




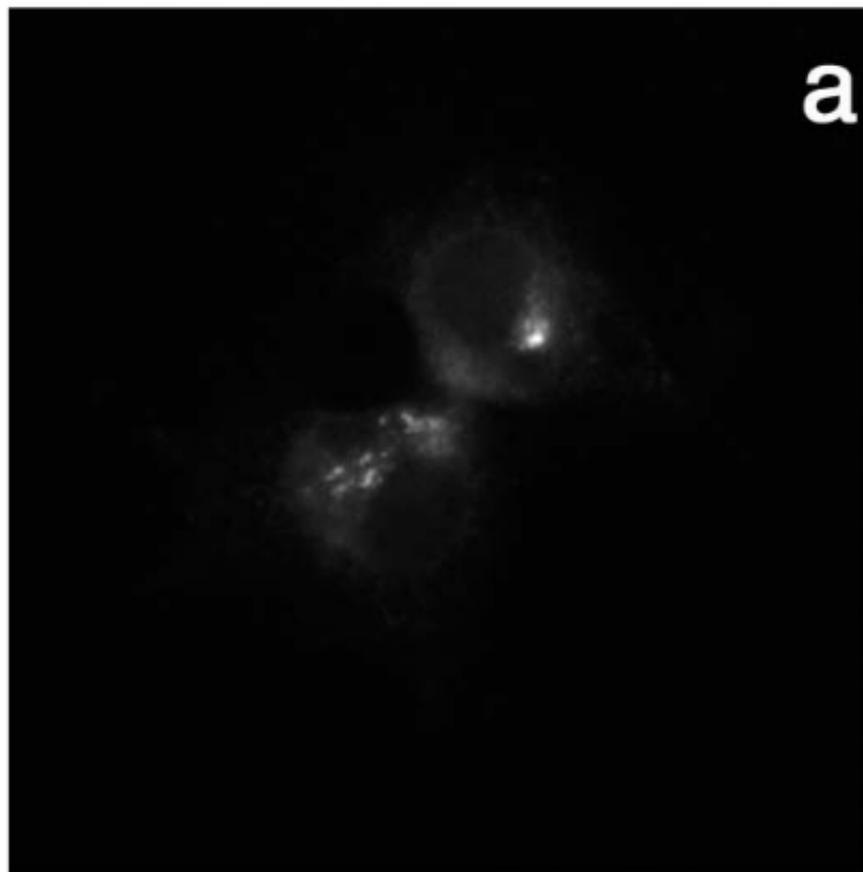


A**B**

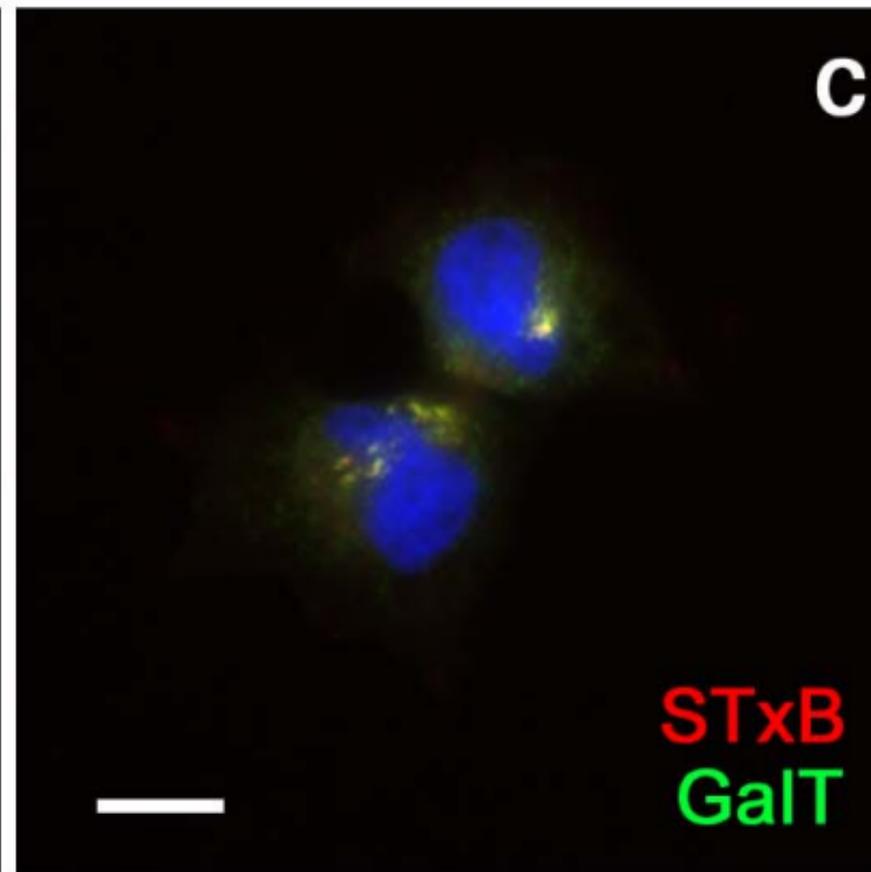
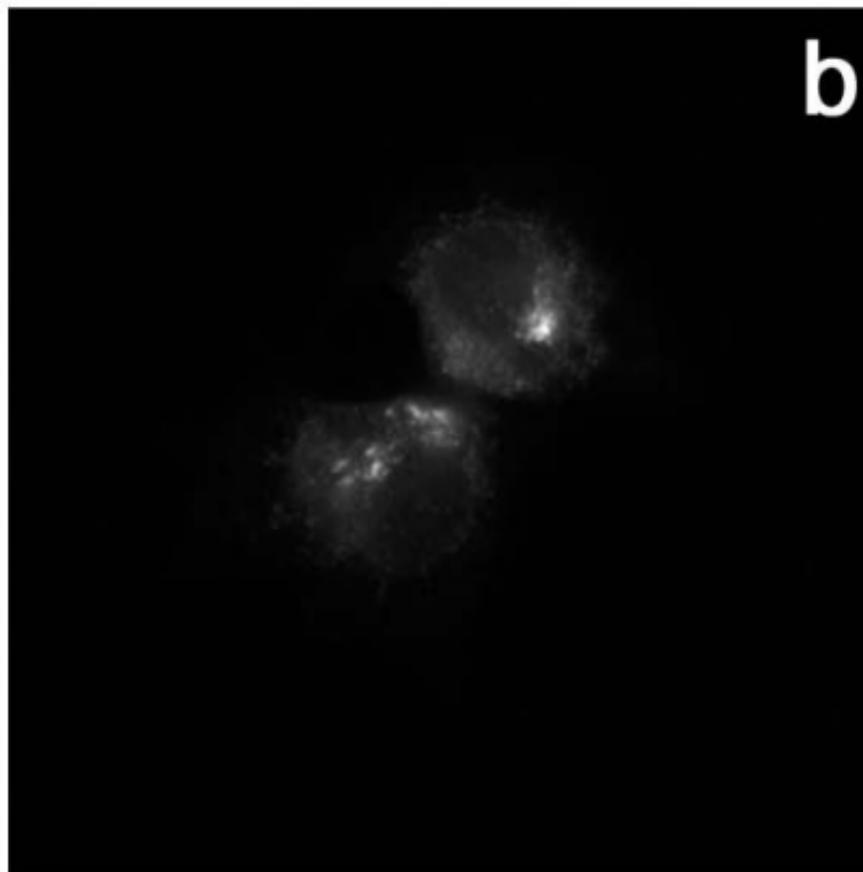


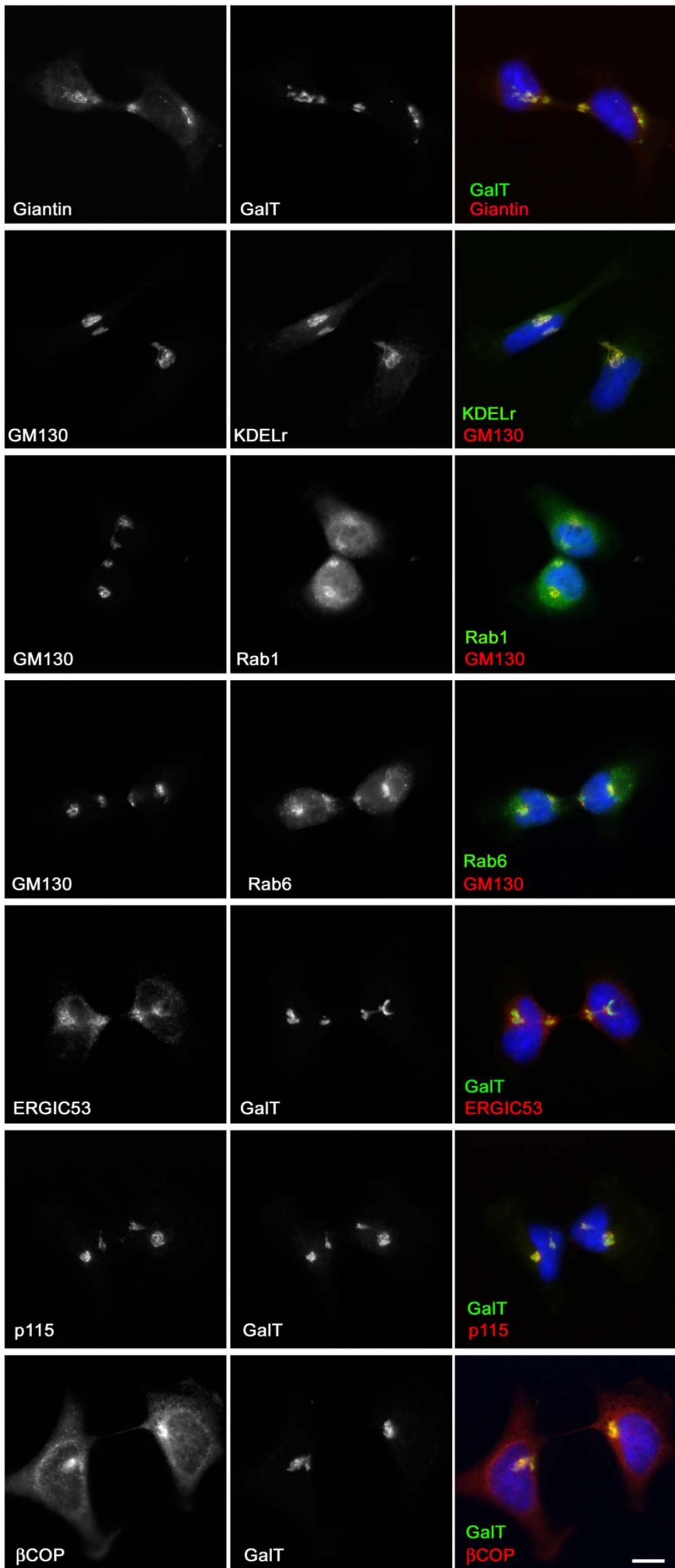


STxB



GalT





II.D.2. *Résultats, Discussion*

II.D.2.a. Deux modes d'héritage de l'appareil de Golgi en mitose

Un des aspects différenciant les deux modèles d'héritage de l'appareil de Golgi est le rôle joué par le transport de membranes entre l'appareil de Golgi et les autres compartiments lors de la mitose. Le premier modèle suppose que le trafic RE-Golgi est suractivé dans le sens rétrograde en prophase et dans le sens antérograde en télophase. Le second suppose que les membranes golgiennes ne sont pas transportées vers un autre compartiment et ne sont pas non plus produites depuis un autre compartiment en mitose. En fait les études déjà publiées montrent que l'appareil de Golgi peut être effectivement hérité via le RE quand les cellules sont traitées à la BFA ☐ cette drogue redistribue les membranes golgiennes dans le RE (et probablement la matrice golgienne au niveau des sites de sortie du RE, probablement à cause de leur motif d'interaction avec COPII), et quand les cellules entrent ensuite en division cette situation perdure jusqu'en télophase/cytocinèse. Le retrait de la drogue permet ensuite de réassembler un appareil de Golgi fonctionnel.

Nous avons tenté de bloquer le trafic golgien à différentes étapes de la mitose à l'aide de la BFA pour évaluer le rôle de ce trafic pendant la mitose. Nous avons donc observé le comportement d'un marqueur basé sur une enzyme golgienne GalNacT2 (de distribution relativement étalée sur l'empilement, mais pas présente en-dehors, au niveau du CGN ou TGN) en fusion avec la GFP au cours de la mitose en ajoutant la BFA à différents étapes. En résumé, GalNacT2-GFP est comme attendu redistribué dans le RE si les cellules sont en interphase au moment du début du traitement. De même, lorsque l'appareil de Golgi vient d'être réassemblé, en fin de mitose, GalNacT2-GFP est redistribué dans le RE si la BFA est ajoutée à ce moment. En revanche, si le traitement commence en prométaphase, lorsque l'appareil de Golgi est fragmenté mais pas encore dispersé (pas de marquage diffus, tous le marquage semble présent sous forme de fragments clairement discernables), ces fragments persistent et ne sont pas dispersés pendant les phases suivantes malgré la présence continue de la drogue. Ces fragments finissent même par s'accumuler, comme l'appareil de Golgi dans des cellules non-traitées, aux extrémités moins des microtubules (centrosome, *midbody*) en

télophase, en présence continue de BFA⁹⁰. Cette même structure résistante à la BFA se reforme aussi en télophase si le traitement commence en métaphase (la résistance n'est alors que partielle, GalNacT2-GFP est aussi en partie dans le RE). Or en métaphase les fragments golgiens sont essentiellement dispersés et le marquage est très diffus, avec quelques fragments toutefois encore visibles. Ces structures résistantes à la BFA reformées en télophase sont positives pour tous les marqueurs golgiens que nous avons testés, enzymes golgiennes, matrice, protéines cyclant entre le RE et l'appareil de Golgi, et même un cargo pré-accumulé avant la mitose. En revanche des cargos provenant du RE ou de la voie d'endocytose n'ont pas accès à ces structures à cause du bloc du trafic induit par la BFA (en l'absence de drogue ces voies de transport sont actives). Nous avons vérifié que Arf1/COPI, cible majeure de la BFA est bel et bien relargué dans le cytosol dans ces conditions, et la tubularisation des endosomes témoigne elle aussi que la BFA fonctionne normalement pendant la mitose. Et lorsque la BFA est retirée des cellules, l'appareil de Golgi se reforme dans tous les cas de figures, la structure résistante à la BFA constituant le site de réassemblage lorsqu'elle est présente. Ceci signifie que le mode alternatif d'héritage de l'appareil de Golgi indépendamment de tout autre compartiment est lui aussi possible, il suffit de bloquer le trafic golgien en prométaphase et les membranes de l'appareil de Golgi persistent alors isolées des autres organites tout au long de la mitose. Lorsque le trafic golgien est bloqué à partir de la métaphase, phase à laquelle le statut des membranes golgiennes est le plus controversé, une structure résistante à la BFA se forme en fin de mitose mais les marqueurs golgiens sont aussi partiellement redistribués. L'explication la plus simple consiste à proposer un modèle hybride des deux modèles extrêmes mais non-exclusifs d'héritage de l'appareil de Golgi. L'appareil de Golgi serait ainsi fragmenté en prophase, puis ces fragments seraient progressivement dispersés jusqu'en métaphase, par production de vésicules et probablement fusion avec le RE. Mais des fragments golgiens persistent jusqu'à cette étape, et lorsque la cellule atteint la télophase, ces fragments coalescent et contribuent au réassemblage de l'appareil de Golgi, en plus de membranes apportées par le RE (et peut-être d'autres compartiments).

Notre étude montre donc que l'entrée en mitose entraîne un changement brutal de l'état des membranes golgiennes au moment où elles commencent à se fragmenter□leur comportement vis-à-vis de la BFA est unique, puisque ces membranes ne sont pas redistribuées dans le RE et persistent dans cet état figé pendant plusieurs heures en présence de la drogue. Ces

⁹⁰ Une étude très récente montre aussi que l'appareil de Golgi peut être hérité par les cellules-filles sans fusionner avec le RE, en restant même complètement intact (Uchiyama et al. 2003). Toutefois cette étude n'aborde pas le problème du transport RE-Golgi dans ces conditions.

membranes sont en quelque sorte à la fois insensibles à la BFA puisque cette drogue n'induit pas leur fusion avec le RE, et sensibles à la BFA puisque leur dispersion est bloquée et que ces membranes, bien qu'elles soient capables de s'accumuler au voisinage des bouts moins des microtubules en télophase, ne reforment pas d'empilement golgien fonctionnel⁹¹. De plus cet effet de la drogue dépend du moment où elle est ajoutée et pas seulement du moment auquel les cellules sont observées, on parle d'hysteresis ou d'effet mémoire□en observant des cellules en fin de mitose, il est possible de savoir si la drogue a été ajoutée avant la mitose, pendant la prométaphase, ou pendant la métaphase. Cet effet mémoire rappelle celui observé dans le système in vitro du groupe de G. Warren du point de vue de la sensibilité de la reformation des empilements golgiens au GTP[S et à AIF4□ces composés, qui affectent les GTPases, n'ont pas d'effet inhibiteur sur la réassemblage des empilements lorsqu'ils sont ajoutés pendant la reformation, mais inhibent la reformation s'ils sont présents pendant le désassemblage (Rabouille, Misteli et al. 1995). Notre étude in vivo confirme l'existence de ce type de comportement et indique une fenêtre temporelle très étroite, en prométaphase, pendant laquelle les membranes golgiennes sont dans un état unique, et peuvent être isolées des autres compartiments par traitement avec la BFA tout au long de la mitose.

II.D.2.b. Trafic golgien et cytokinèse

Une autre observation intéressante dans le cadre de notre étude est que les cellules semblent effectuer leur cytokinèse en présence de BFA, c'est-à-dire en l'absence de sécrétion. Nous avons vu dans la partie Introduction que le rôle de la sécrétion dans l'apport de membrane au niveau du pont est pourtant indispensable dans certains organismes. C'est donc que la sécrétion peut être dispensable dans ce cas précis et que d'autres sources de membranes sont utilisées, comme les endosomes de recyclage (le recyclage n'étant lui pas bloqué par la BFA). Mais il faut garder à l'esprit qu'il existe probablement plusieurs types de cytokinèse dans les cellules de mammifères (ce principe est peut-être lui-même plus général)□une cytokinèse régulée, «physiologique□, et une cytokinèse «mécanique□, au cours de laquelle les cellules-filles migrent en sens inverse jusqu'à rupture du pont. Nos conditions expérimentales (faible densité cellulaire) favorisent en fait cette cytokinèse «mécanique□, et

⁹¹ Le transport golgien est bloqué, et des observations par microscopie électronique suggèrent que ces membranes sont des fragments tubulo-vésiculaires hétérogènes et des vésicules de 50-70 nm de diamètre semblables aux fragments golgiens mitotiques observés par d'autres groupes dans des cellules métaphasiques non-traitées.

ce processus a été effectivement observé dans le cas de cellules se divisant en présence de BFA. Une étude plus complète permettrait de trancher sur le rôle de la sécrétion et la nature de la cytotinèse. En revanche le rôle de l'endocytose et du recyclage est lui entièrement à étudier, et la présence de marqueurs de voie d'endocytose, en particulier des micro-domaines lipidiques, que nous avons trouvés fortement enrichis au milieu du pont, la pièce centrale (*midpiece*), encourage une telle étude. CLIPR59 et le fragment B de la toxine de Shiga, tous les deux présents dans des micro-domaines lipidiques, possèdent une dynamique intéressante au niveau du pont, et la surexpression de CLIPR59 résulte très souvent en un blocage de la cytotinèse à une phase tardive (cellules reliées par un très long pont). Ceci suggère un rôle des voies de recyclage et des microdomaines lipidiques dans l'accomplissement de la cytotinèse.

II.E. Analyse de séquences protéiques à la recherche de motifs d'interaction avec COPII

Dans la partie Introduction, je propose une explication pour l'effet différentiel du traitement avec la drogue BFA sur la localisation des enzymes résidentes golgiennes et des protéines de la matrice golgienne. Les enzymes sont redistribuées dans le RE, tandis que les protéines de la matrice sont localisées sur des structures ponctiformes qui correspondraient aux sites de sortie du RE (Ward et al. 2001)).

Mon explication est la suivante : contrairement aux enzymes golgiennes certaines protéines de la matrice golgienne seraient capables d'interagir directement avec COPII et d'être concentrés dans les sites de sortie du RE, qui restent fonctionnels en présence de BFA (Ward et al. 2001). Comme les protéines de la matrice sont en interaction deux à deux, de proche en proche cette interaction avec COPII de certaines d'entre elles permettrait de re-localiser l'ensemble de la matrice aux sites de sortie du RE quand l'appareil de Golgi disparaît.

Hors le groupe de W. Balch a proposé l'existence de motifs « consensus » d'interaction avec COPII, basés sur celui permettant à VSV-G d'interagir directement avec COPII et donc d'être sécrété rapidement. Ces signaux seraient de type « di-acide », de séquence DXE (X est un acide aminé quelconque), souvent précédé d'une tyrosine (Y) quelques résidus en amont.

J'ai donc recherché ce type de motifs, de préférence ceux qui sont conservés à travers l'Evolution, dans certaines protéines de la matrice. Je pense que p115 (Uso1p chez *S. cerevisiae*) est un excellent candidat puisque sa séquence contient au moins un motif très ressemblant à celui proposé par le groupe de W. Balch et qui est conservé à travers

l'Evolution⁹². Ceci renforcerait le rôle fonctionnel de p115 en tant que pivot de la voie RE-Golgi, depuis les sites de sortie du RE (Kondylis et Rabouille 2003) jusqu'aux étapes d'arrimage et de fusion avec l'appareil de Golgi (Allan et al. 2000 □ Shorter et al. 2002).

⁹² Une étude par mutagenèse dirigée contre les résidus critiques (acides) devrait permettre de tester cette hypothèse.

Motifs d'interaction avec COPII présents dans VSV-G et la protéine de la famille p24 gp25L2. Motifs du même type présents dans les protéines de la matrice Golgienne (mais pas dans les queues cytoplasmiques des enzymes résidentes de l'appareil de Golgi) : une explication pour l'effet différentiel sur les protéines de la matrice golgienne et les enzymes golgiennes d'un traitement des cellules à la BFA ?

VSV-G

MKCLLYLAFLFIGVNCFTIVFPHNQKGNWKNVPSNYHYCPSSDLNWHNDLIGTALQVKMPKSHKAIQADGWMCHASKWVTTTCDFRWYGPKYITHSIRSFTPSVEQCKESIEQTKQGTWLNPGFPPQSCGYATVTDAAEAVIVQVTPHHVLDVEYTGWVDSQFINGKCSNYICPTVHNSTTWHSDYKVKGLCDSNLISMDITFFSEDGELSSLGKEGTGFRSNYFAYETGGKACKMQYCKHWGVRLPSGVWFEMADKDLFAAARFPECPEGSSISAPSQTSVDVSLIQDVERILDYSLCQETWSKIRAGLPISPVDLSYLAPKNPGTGAFTIINGTLKYFETRYIRVDIAAPILSRMVGSMISGTTTERELWDDWAPYEDVEIGPNGVLRSSGKFLYKFLYMIGHGMLDSDLHLSKAAQVFEHPHIQDAASQLPDDESLLFFGDTGLSKNPIELVEGWFSWSSIASFFFIIGLIIGLFI VLRVGIHLCKIKLHHTKKRQI**YTDIE**MNRLGK

gp25L2 (famille p24) *H. sapiens*

MRTLLLVLWLATRGSALYFHIGETEKKCFIEEIPDET MVIGNYRTQLYDKQREYQPATPGLGMFVEVKDPEDKVILARQYGEGRFTFTSHTPGEHQICLHNSSTKFSLFAGGMLRVHLDIQVGEHANDYAEIAAKDKLSELQLRVRQLVEQVEIQIQEQNYQRWREERFRQTS ESTNQRVLWWSILQTLILVAIGVWQMRHLKS**FFE**AKKLV

p115 *R. norvegicus*

MNFLRGVMGGQSAGPQHTAEETIQKLCDRVASSTLLDDRRNAVRALKSLSKKYRLEVGIQAMEHLIHVLQTDSDSEIIAYALDTL**YNIISNDEE**EEVEENSTRQSEDLGSQFTEIFIKQPENVTLTLLSLEEFDFHVRWPGVRLTSLKQLGPPVQQIILVSPMGVSKLMDLLADSREIIRNDGVLLQALTRSNGAIQKIVAFENAFERLLDIITEGNSDGGIVVEDCLILLQNLKNNNSNQ**FF**KEGSYIORMKAWFVGDENPGWSAQKVTNLHMLQLVRLVLSPTNPPGATSSCQKAMFQCGLLQQLCTILMATGIPADILTETINTVSEVIRGCQVNDYFASVNAFNSNPPRAIVLLMSMVNERQPFVLRCAVLYCFQCFLYKNEKGQGEIVATLLPSTIDATGNSVSAGQLLCCGGLFSTDSLWNWCAAVALAHALQGNATQKEQLLRVQLATSIGNPPVSLQOCTNLSQGSKIQTRVGLLMLLCTWLSNCPAVTHFLHNSANVPFLTGQIAENLGEEELVQGLCALLLGISIYFNDNSLENYTKEKQLIEKRIGKENYIEKLGFIKHELYPRASQKQPFPNSPE**YMIFDH****E**FTKLVKELEGVITKAI**YKSSEED**KKEEEVKKTLEQHDNIVTH**YKNVIREOD**LQLEELKQVSTLKCQNEQLQTAVTQQASQIQQHKDQYNLLKVLGKDNHHQGSYSDGAQVNGIQPEEISRLREEIEELRSHQVLLQSLAEKDTVIENLRSSQVSGMSEQALATCSPRDAEQVAELKQELSALKSQLCSQSLEITRLQTENRELQORAETLAKSVPVEGESELVTAAKTTDVEGRLSALLQETKELKNEIKALS EERTSIQKQLDSSNSTIAILQTEKDKLYLEVTDSSKEQDLDLVLADQDQKILSLKSKLKDGLGHPVEEEDSEGDQEDDDDELDDGDRDQDI

p115 *H. sapiens*

MNFLRGVMGGQSAGPQHTAEETIQKLCDRVASSTLLDDRRNAVRALKSLSKKYRLEVGIQAMEHLIHVLQTDSDSEIIGYALDIL**YNIISNEE**EEVEENSTRQSEDLGSQFTEIFIKQQENVTLTLLSLEEFDFHVRWPGVKLLTSLKQLGPPVQQIILVSPMGVSRMLMDLLADSREIIRNDGVLLQALTRSNGAIQKIVAFENAFERLLDIIEEGNSDGGIVVEDCLILLQNLKNNNSNQ**FF**KEGSYIORMKPVFEVGDENSGWSAQKVTNLHMLQLVRLVLSPTNPPGATSSCQKAMFQCGLLQQLCTILMATGVPADILTETINTVSEVIRGCQVNDYFASVNAFNSNPPRAIVLLMSMVNERQPFVLRCAVLYCFQCFLYKQKQGEIVSTLLPSTIDATGNSVSAGQLLCCGGLFSTDSLNSWCAAVALAHALQENATQKEQLLRVQLATSIGNPPVSLQOCTNLSQGSKIQTRVGLLMLLCTWLSNCPAVTHFLHNSANVPFLTGQIAENLGEEELVQGLCALLLGISIYFNDNSLESYMEKELKQLIEKRIGKENFIEKLGFIKHELYSRASQKQPFPNSPE**YMIFDHE****E**FTKLVKELEGVITKAI**YKSSEED**KKEEEVKKTLEQHDNIVTH**YKNMIREOD**LQLEELRQVSTLKCQNEQLQTAVTQQVSQIQQHKDQYNLLKIQLGKDNHQGSYSEGAQMNGIQPEEIGRLREEIEELKRNQELLQSQLTEKDSMIENMKSSQTSQTNEQSSAIVSARDSEQVAELKQELATLKSQNSQSVEITKLQTEKQELLQKTEAFKASVEVQGETETIATKTDDVEGRLSALLQETKELKNEIKALSEERTAIQKQLDSSNSTIAILQTEKDKLELEITDSSKEQDLDLVLADQDQKILSLKNLKDGLGHPVEEEDSEGDQEDDEDESEDPGKLDHI

GM130 *H. sapiens*

MSEETRQSKLAAAKKKLREYQQRNSPGVPTGAKKKKIKNGSNPETTTSGGCHSPEDTPKDNAATLQPSDDTVLPGGVPSPGASLT SMAASQNHADADNPNLMDETKTFSSTESLRQLSQQLNGLVCESATCVNGEGPASSANLKDLESRYQLAVALDSSYVTNKQLNITIE KLKQQNQEITDQLEEEKKECHQKQALREQLQVHIQITIGILVSEKAEQLTALAHTQHAARQKEGESEDLASRLQ**YSRRRVGELE** RALSAVSTQKKADR**YNKELTKERD**ALRLELYKNTQSNEDLKQEKSELEEKLRVLVTEKAGMQLNLEELQKKLEMTLELLQQ FSSRCEAPDANQQLQAMEERAQLEAHLGQVMESVRQLQMERDKYAENLKGESAMWRQRMQQMSEQVHTLREEKECSMSRVQ ELETSLAELRNQMAEPPPEPPAGPSEVEQQLQAEAEHLRKELEGLAGQLQAQVQDNEGLSRLNREQEERLLELERAELWGEQAE ARRQILETMQNDRTTISRALSQNRELKEQLAELQSGFVKLTNENMEITSALQSEHQVKRELGKKGELQEKLSELKETVELKSQEAQ SLQQQRDQYLGHLLQ**YVAAYQOLTSEKE**VLHNQLLLQTQLVDQLQQQEAQGKAVAEMARQELQETQERLEAATQQNQQLR AQLSLMAHPGEGDGLDREEEDEEEEEEAVAVPQPMPSPEDLESREAMVA**FF**NSAVASAEQARLRGQLKEQVRRCRRLAHL L ASAQKEPEAAAPAGTGGDSVCGETHRALQGAMEKLSRFMELMQEKADLKERVEELEHRCIQLSGETDTIGEYIALYQSRAVLK

ERHREKEEYISRLAODKEEMKVKLELQELVLRVLDGDRNEWHRFLAAAQNPADPTSGAPAPQELGAANQQGDLCEVSLAG
SVEPAQGEAREGSPRDNPTAQQIMQLLREMQNPRERPLGNSNPCIPFFYRADENDEEVKITVI

GRASP65 *H. sapiens*

MGLGVSAEQPAGGAEFHLHGQVENSQAQAGLEPYDFDITIGHSRLNKENDTLKALLKANVEKPVKLEVFNMKTMRVRE
VEVVPNSMWGGQGLLGASVRFCSFRRASEQVWHVLDVEPSSPAALAGLRPYTDYVVGSDQILOESEdFFTLIESHEGKPLKL
MVYNSKSDSCREVTVTPNAAWGGEGSLGCGIGYGYLHRIPTOPPSYHKKPPGTPPPSALPLGAPPPDALPPGPTPEDSPSLETGSRQS
DYMEALLQAPGSSMEDPLPGPGSPSHSAPDPDGLPHFMETPLQPPPVQVRVMDPGFLDVSGISLLDNSNASVWPSLPSSTELTTAVS
TSGPEDICSSSSSHERGGGEATWSGSEFEVFLDSPGAQAQADHLPQLTLPLDLSLTAASPEDGLSAELLEAAQAEPEEPASTEGLDGTGEAE
GLDSQAQISTTE

Giantin *H. sapiens*

MLSRSLGANVVLHELSDDDTDQNMRAPLDPELHQESDMEFNNTTQEDVQERLAYAEQLVVELKDIIRKQDVQLQKQDEALQEE
RKAADNKIKKLLHAKAKLTSLNKYIEEMKAQGGTVLPTPEQSEEQLSKHDKSSTEEEMEIEKIKHKLQEKEELISTLQAQLTQAQA
EQPAQSSTEMEEFVMMKQQLQEKEEFISTLQAQLSQTQAEQAAQVREKDFARFETQVRLHEDELLQVLTQADVETEMQKLRVL
QRKLEEHESLVGRAQVVDLLQQELTAAEQRNQILSQQLQMEAEHNTLRNTVETEREESKILLEKMELEVAERKLSFHNLQEEMH
HLLQFEQAGQAQAELESRYSALEQKHKAEEMEKTSHILSLQKTGQELQSACDALKDQNSKLLQDKNEQAVQSAQTIQQLLEDQLQ
QKSKEISQFLNRLPLQOHETASQTSFPDVYNEGTAQVTEENIASLQKRVVELENEKGAALLSSIELEELKAENEKLSQITLLEAQNR
TEADREVSEISIVDIANKRSSSAEESGQDVLENTFSQKHKELSVLLEEMKEAQEEIAFLKLQLQGKRAEEADHEVLDQKEMKQMEG
EGIAPIKMKVFLDTGQDFPLMPNEESSLPAVEKEQASTEHSRTSEEISLNDAGVELKSTKQDGDKSLSAVDPDIGQCHQDELERLKS
QILELELNFHKAQEIEYKNDLDEKAKEISNLNQLIEEFKNADNNSAFTALSEERDQLLSQVKELSMVTELRAQVKQLEMNLAEAE
RRRLDYESQTAHDNLLTEQIHLSIEAKSKDVKIEVLQNELDDVQLQFSEQSTLIRSLQSQLQNKESVLEGAERVRHISSKVEELSQA
LSQKELEITKMDQLLLEKRDVETLQQTIEEKDQVTEISFSMTEKMOVQLNEEKFSLGVEIKTLKEQLNLSRAEEAKKEQVEEDNE
VSSGLKQNYDEMSPAGQISKEELQHEFDLLKENEQRKRKLQAALINRCELLQRVSRLEELANLKDDESKKEIPLSETERGEVEEDK
ENKEYSEKCVTSTKCOEIEiYLKQITISEKEVELQHIRKDLLEKLAEEEFQALVKQMNQTLQDKTNQIDLLQAEISENQAI
IQKLITSNTDASDGDSVALVKETVVISPPCTGSSEHWKPELEEKILALEKEKEQLQKQLQEAALTSRKAAILKKAQEKERHLREELKQK
DDYNRLQEQFDEQSKENENIGDQLRQLQIQVRESIDGKLPSTDQEQESCSTPGLPEPLFKATEQHHTQPVLESNCPDWPSHSEDASA
LQGGTVAQIKAQKLEIAEKVELELKVSTTSELTKKSEVFQLEQINKQGLEIESLKTVSHEAEVHAESLQKLESSQLQIAGLEH
LRELQPKLDELQKLISKKEEDVSYLSGQLESEKEAALTKIQTEIEEQEDLIKALHTQLEMQAKEHDERIKQLQVELCEMKQKPEEI
GEESRAKQIQKRLQAALISRKEALKENKSLQEELSLARGTIERLTKSLADVESQVSAQNKEKDTVLGRLALLQEERDKLITEMDRS
LLENQSLSSCESLKLALGLTEDKEKLVKEIESLKSSKIAESTEWEQEKHKELQKEYEILLQSYENVNSAEERIQHVVEAVRQEKQEL
YGLRSTEAANKKETEQLQEAQEMEMEKEMRKFASKQKILELEENDRLRAEVHPAGDTAKECMETLSSNASMKEELERV
KMEYETLSKKFQSLMSEKDSLSEEVQDLKHQIEDNVSKQANLEATEKHNDQNTNTEEGTQSIPGETEEQDLSMSTRPTCS
VPSAKSANPAVSKDFSSHDEINNYLQQIDQLKERIAGLEEEKQKNEKFSQTLNEKNTLLSQISTKDGELKMLQEEVTKMNLNQQI
QEELSRVTKLKETAEEKDDLEERLMNQLAELNGSIGNYCQDVTDAQIKNELLESEMKNLKKCVSELEEEKQQLVKEKTKVESEIR
KEYLEKIQGAQKEPGNKSHAKELQELLKEKQEVKQLQKDCIRYQEKISALERTVKALEFVQTESQKDLEITKENLAQAVEHRKKA
QAEASFVLLDDTQSEAAARVLADNLKKEKLSQNKESVKSOMKQKDEDLERRLEQAEKHLKEKKNMQEKLDALRREKVHLEE
TIGEIQVTLNKKDKEVQQLQENLDSTVTQLAAFTKSMSSLQDDRDRVIDEAKKWERKFSDAIQSKEEIRLKEEDNCSVLKDQLRQ
SIHMEELKINISRLHDKQIWESKAQTEVQLQKVCDTLQGENKELLSQLEETRHLHYSSQNELAKLESELKSLKDQTLTDLNSLEK
CKEQGNLEGIIRQEQEADIQNSKFSYEQLETDLQASRELTSLRHEENMKEQKIISSLSGKEEAIQVAIAELRQOHDKKEIKELNLSQE
EENIVLEENKKAVDKTNQLMETLTKTIKKENIQQAQLDSFVKSMSLQNDRDRIVGDYQOLEERHLSIILEKDQLIQEAAA
ENNLKKEEIRGLRSHMDDLNSENAKLDAELIQYREDLNQVITIKDSQQQLLEVQLQNKELENKYAKLEEKLEKESEEANEDL
RRSFNALQEEKQDLSKEIESLVVISQLTRQVTALQEEGTGLYHAQLKVKEEEVHRLSALFSSSQKRIAELEEEELVCVQKEAAK
KVGEIEDKLLKELKHLHHDAGIMRNETETAERVAELARDLVEMEQLLMVTKENKGLTAIQSFGRSMSSLQNSRDHANEELDEL
KRKYDASLKELAQKLEQGLLNRRERDALLSETAFSMNSTEENSLSHLEKLNQQLSKDEQLLHLSQLEDSYNQVQSFSKAMA
SLQNERDHLWNELEKFRKSEEGKQRSAAQPSTPAEVQSLKKAAMSSLQNDRDRLLKELKNLQQYQLQINQEITELHPLKAQLQE
YQDKTKAFQIMQEELRQENLSWQHELHQLRMEKSSWEIHERRMKEQYLMASDKDQQLSHLQNLIRELRSSSQTPPLKVYQYRQ
ASPETSASPDSQNLVYETELLRTQLNDSLKEIHQKELRIQQLNSNFSQLLEEKNTLSIQLCDTSQSLRENQHYGDLLNHCALVEK
QVQELQAGPLNIDVAPGAPQEKNGVHRKSDPEELREPQQSFSEAAQQLCNTRQEVNLRKLLLEERDQRAAENALSVAEEQIRRL
HSEWDSRTPHIGSCGTQEQAALLIDLTSNSCRRTSGVWKRVRLSLCHSRTRVPLLAAYFLMIHVLLILCFTGHL

II.F. Annexes techniques

Pour faciliter la lecture du manuscrit, je vais introduire brièvement dans ce chapitre deux techniques récemment décrites que j'ai développées et utilisées lors de ma thèse : la microscopie de fluorescence de cellules vivantes et la déplétion de protéines par interférence ÀRN dans les cellules de mammifères. Ce chapitre ne constitue pas une revue exhaustive concernant ces deux techniques, mais aborde essentiellement les points centraux et les détails utiles à la compréhension des expériences que je présente dans la partie Résultats. De plus, je présente très brièvement une technique de quantification du mouvement des intermédiaires de transport que j'avais mise au point au cours de mon stage de DEA dans le cadre de la partie consacrée à la microscopie in vivo.

II.F.1. *Observation par microscopie de fluorescence de cellules vivantes*

II.F.1.a. Microscopie classique

J'ai utilisé un microscope à fluorescence à géométrie inversée pour observer des cellules vivantes exprimant des protéines de fusion avec la GFP. Je vais décrire très brièvement les possibilités offertes par cette technique.

Un jeu de filtres d'excitation et de détection permettent de détecter la fluorescence d'un échantillon, et il suffit de changer de filtres pour détecter plusieurs fluorophores dans un même échantillon. Evidemment la vitesse à laquelle les filtres peuvent être échangés limite la vitesse d'acquisition et la nature des processus cellulaires observables. Si l'on observe un seul fluorophore, alors le temps entre deux prises de vue n'est plus limité que par le temps de pose et le transfert des données de la caméra CCD à l'ordinateur. Le temps de pose est typiquement de l'ordre de 50 ms à 500 ms suivant l'intensité des signaux, et le temps de transfert peut être négligeable devant le temps de pose si les informations sont transférées à la RAM plutôt qu'écrites sur le disque. Dans le cas du transport intracellulaire, les vésicules se déplacent à des vitesses de l'ordre du $\mu\text{m/s}$, et donc en quelques centaines de ms une vésicule parcourt une distance de l'ordre de celle résolue par le microscope (les vésicules étant en général de dimension inférieure à cette résolution⁹³, sauf dans le cas de tubules de longueur micronique).

⁹³ Contrairement à une idée largement répandue, un objet de taille inférieure, même largement inférieure, à la distance minimale résolue par un microscope peut être détecté par ce microscope. La résolution d'un microscope, selon le critère de Rayleigh, est la distance la plus petite que l'on peut avoir entre deux sources ponctuelles (de taille négligeable devant la

Ceci signifie que l'image peut être rendue floue si le temps de pose dépasse 100 ms et les structures difficiles à suivre si le temps entre deux prises de vue dépasse 2 s.

II.F.1.b. Microscopie confocale

J'ai observé aussi des cellules vivantes exprimant des protéines de fusion avec la GFP (ou ses variants spectraux CFP et YFP) sur un microscope confocal. Cette technique permet de visualiser un plan focal et d'ignorer la lumière émise par des sources fluorescentes en-dehors de ce plan focal. Je ne vais pas rappeler le principe de fonctionnement d'un tel microscope, mon but est simplement ici d'insister sur deux propriétés de cette technique qui sont essentielles pour l'analyse de la dynamique intracellulaire.

La première est que si une géométrie confocale permet d'ignorer la lumière provenant de points situés en-dehors du plan focal, elle implique néanmoins l'excitation de ces points par la lumière incidente. Ainsi, on éclaire l'échantillon sur toute sa profondeur, et on ne regarde que la lumière provenant d'un plan. Ceci est très important à considérer pour analyser des expériences de photoblanchiment (Lippincott-Schwartz et al. 2001) (ou photo-activation (Patterson et Lippincott-Schwartz 2002)). En effet, lors d'une expérience mettant en jeu un photoblanchiment spécifique dans une région d'intérêt latérale (en xy), le photoblanchiment est réalisée sur toute la profondeur de champ de l'objectif (en général de l'ordre de ou plus grande que l'épaisseur de la cellule), tandis que la détection est toujours confinée au plan focal. Donc on éteint la fluorescence des sources présentes dans un volume délimité latéralement par la zone d'intérêt mais de la hauteur de la cellule, et on ne regarde que les images des sources situées dans un plan. Seules les techniques multi-photoniques permettent d'exciter spécifiquement un point d'un échantillon, et donc de ne photoblanchir que certaines sources au sein d'un volume réduit plutôt que toutes celles comprises sur le parcours du faisceau laser.

La seconde propriété de la microscopie confocale sur laquelle j'aimerais insister est que la géométrie confocale repose sur une stratégie de balayage de l'échantillon point par point à l'aide d'un laser focalisé. Ceci signifie que contrairement à l'image obtenue sur un microscope classique à l'aide d'une caméra CCD, l'image obtenue sur un microscope confocal n'est pas une photographie à un instant donné, mais une photographie distordue. Si

résolution) tout en étant capable de séparer les images de ces deux sources. Ce critère ne limite pas la taille de l'objet détecté. Par exemple, un atome (rayon 10^{-10} m) qui émet

le balayage est effectué de haut en bas et de gauche à droite, le point en haut à gauche est scanné en premier et le point en bas à droite en dernier, et le temps entre les deux prises de vue ponctuelles est typiquement de l'ordre de la seconde. Or à cette échelle d'une seconde, les vésicules de transport sont capables de se déplacer, grâce aux moteurs moléculaires, d'une distance de l'ordre du micron, c'est-à-dire plusieurs fois la résolution du microscope. Cet inconvénient est toutefois compensé par un avantage majeur. En effet, localement, la prise de vue ponctuelle prend quelques microsecondes, en comparaison avec un temps de pose de quelques dizaines/centaines de millisecondes pour un microscope classique et sa caméra CCD. Par conséquent l'image est moins distordue localement, et souvent moins floue. De plus, j'ai pu observer que la toxicité de certains fluorophores (comme Cy3) systématique par microscopie classique est extrêmement réduite par microscopie confocale.

II.F.1.c. Quantification de la dynamique intracellulaire par des méthodes de corrélation

En plus des méthodes de photoblanchiment ou de photoactivation (qui permettent d'étudier la diffusion d'un marqueur au cours du temps par exemple), une autre analyse est en cours de développement dans le cadre du transport intracellulaire □ celle du mouvement des intermédiaires de transport au sein de la cellule. La dynamique de ces objets est souvent impressionnante □ par exemple si l'on suit le recyclage de la transferrine dans des cellules vivantes au moyen de molécules de transferrine fluorescente, on observe des dizaines d'objets se déplaçant entre le centre de la cellule (endosome de recyclage péricentriolaire) et la membrane plasmique en périphérie, dans les deux directions, à des vitesses de l'ordre du $\mu\text{m/s}$. Une stratégie «naturelle» pour analyser ce mouvement consiste à identifier chacun de ces objets sur chacune des images d'un enregistrement (stratégie de segmentation). En principe, la connaissance de la position de chaque objet à chaque instant permettrait en effet de calculer directement la vitesse moyenne de ces objets, de mettre en évidence des trajectoires privilégiées ...

Cependant, cette stratégie est rendue très compliquée à réaliser en pratique pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les intermédiaires de transport endosomaux positifs pour la transferrine sont très nombreux et se déplacent très vite □ il est difficile d'obtenir un enregistrement sur lequel on peut suivre clairement un objet au cours de son déplacement puisque sa trajectoire

suffisamment de lumière peut être détecté, mais son image sera une tache de diffraction de quelques centaines de nm.

en croise de nombreuses autres□ la fréquence d'acquisition doit être au moins d'une image par seconde, ce qui induit très souvent une cytotoxicité ou tout du moins une diminution rapide du signal par photoblanchiment. Ensuite, ces objets fusionnent et se fissionnent en permanence, donc leur nombre varie souvent, et la plupart des algorithmes de segmentation automatique ne sont pas capables de rendre compte de ces événements fréquents. En fait, même si les événements de fusion et fission sont suffisamment rares, la plupart des algorithmes de segmentation automatique sont incapables de suivre deux objets qui se croisent.

Au cours de mon stage de DEA, j'avais mis au point une méthode différente pour analyser quantitativement le mouvement des intermédiaires de transport dans les cellules vivantes. Plutôt que de chercher à segmenter les images en objets et de les suivre au cours de leur évolution individuellement pour ensuite extraire des données statistiques, j'avais tenté d'appliquer directement les techniques classiques d'analyse statistique à ces enregistrements, une méthode largement utilisée en traitement du signal. Ainsi, certaines fonctions statistiques, faciles à calculer à partir des données brutes, peuvent donner des indications générales et quantitatives sur le mouvement des objets sans avoir à en suivre un seul au cours de son mouvement. Un exemple simple est de calculer l'image moyenne d'un film pour faire apparaître les trajectoires privilégiées□ les chemins souvent empruntés par des objets différents sont ainsi mis en évidence.

C'est sur l'utilisation des fonctions de corrélation que j'ai porté mon attention□ ce type de fonction statistique permet de détecter si deux images d'un même enregistrement (auto-corrélation) ou de deux enregistrements distincts (corrélations croisées) séparées d'un intervalle temps donné « se ressemblent », c'est-à-dire dans quelle mesure elles sont corrélées. Prenons l'exemple de la fonction d'auto-corrélation□ elle permet de déterminer dans quelle mesure deux images d'un même enregistrement se ressemblent en fonction de l'intervalle de temps entre les deux prises de vue. Si la fréquence d'acquisition est assez élevée, les objets n'ont pas le temps de bouger beaucoup entre deux prises de vue successives, il y a un recouvrement substantiel entre les pixels représentant le même objet entre les deux images. Par conséquent, deux images successives se ressemblent beaucoup et leur corrélation est grande. J'ai choisi de mesurer cette corrélation en sommant les intensités des pixels de l'image « produit », obtenue en multipliant les valeurs de pixels de mêmes coordonnées des deux images sources et en attribuant cette valeur au pixel correspondant de l'image produit. J'ai effectué quelques contrôles sur des objets blancs sur fond noir en mouvement pour vérifier la validité de cette approche. J'ai aussi utilisé cette approche pour « recadrer » un enregistrement dans lequel la position de la cellule dérive en fonction du temps□ je calcule la

translation à effectuer entre deux images successives qui rend la corrélation maximale entre ces deux images, ce qui permet d'annuler ces effets de dérive.

La fonction d'auto-corrélation elle-même est obtenue de la manière suivante : pour chaque intervalle de temps (de l'intervalle minimum, entre deux images successives, à l'intervalle maximum, la durée de l'enregistrement), on calcule la corrélation moyenne de deux images du film séparées par cet intervalle. Cette fonction a sa valeur maximale quand l'intervalle est le plus petit (deux images successives se ressemblent beaucoup), puis elle décroît, en général linéairement sur la portion initiale de la courbe. La pente de cette droite permet de quantifier le mouvement : si elle est petite, c'est que le mouvement est lent (il faut un intervalle assez grand entre deux images pour qu'elles commencent à ne plus se ressembler), si elle est grande le mouvement est rapide.

Je n'ai pas eu le temps de finaliser l'écriture des algorithmes, mais je présente en annexe (voir IV) le programme que j'avais écrit sous la forme de «`macro`» du logiciel NIH Image, qui repose sur un langage proche du Pascal. Ce programme gagnerait à être transcrit en tant que «`macro`» de la nouvelle version de ce logiciel, Image J, qui est basé sur le langage Java. Le programme ci-après contient donc le calcul de la fonction d'auto-corrélation d'un film, mais aussi la procédure de «`recadrage`», ainsi qu'une procédure de segmentation reconnaissant systématiquement l'appareil de Golgi sur toutes les images d'un film (basée sur l'intensité relativement homogène de cet objet continu et compact). Il suffit de cliquer sur un pixel de l'appareil de Golgi sur la dernière image, et l'organe est reconnu sur celle-ci et toutes les images précédentes, puis le programme mesure l'intensité moyenne associée avant de calculer sa fonction d'auto-corrélation (cette fois-ci ce n'est pas la corrélation de deux images d'un film, mais la corrélation de l'intensité golgienne dont l'apparence est souvent bruitée).

II.F.2. Déplétion de protéines par Interférence ARN dans des cellules de mammifères

L'interférence ARN est utilisée depuis quelques années pour dépléter les cellules de certains organismes, comme *C. elegans* (Jantsch-Plunger et Glotzer 1999) ou *D. melanogaster*, (Caplen et al. 2000) spécifiquement du produit d'un gène d'intérêt (Fire 1999). Cette technique a vu le jour grâce à l'observation inattendue que l'introduction d'un ARN double-brin codant pour la séquence d'un gène dans les cellules de *C. elegans* inhibe la traduction de l'ARN messager endogène correspondant (Fire et al. 1998) plus fortement que l'introduction «traditionnelle» d'un ARN anti-sens.

Très récemment, l'existence de séquences ARN endogènes d'environ 22 nucléotides a été révélée. Ces *micro-RNAs* sont présents dans les cellules de nombreuses espèces, animales et végétales, et semblent réguler la traduction de messagers dans de nombreux processus tel le développement chez *D. melanogaster* et *C. elegans*. Le groupe de T. Tuschl (et récemment celui de S. Cohen (Brennecke et al. 2003)) a identifié un grand nombre de ces *micro-RNAs* (Lagos-Quintana et al. 2001), et a aussi remarqué que les ARNs double-brins utilisés dans les expériences de RNAi sont en réalité clivés en oligonucléotides d'environ 22 paires de bases dans les cellules de *D. melanogaster* et que ce sont ces oligonucléotides qui entraînent l'inhibition de traduction des messagers (en fait leur destruction) (Elbashir, Lendeckel et al. 2001).

Pendant de nombreuses années, l'interférence ARN n'était pas utilisable dans les cellules de mammifères à l'origine parce que l'introduction d'un ARN double-brin de la longueur du messager d'intérêt déclenchait une réaction similaire à celle déclenchée par une infection par un virus à ARN, c'est-à-dire le blocage général de la traduction de tous les ARN et ensuite la mort cellulaire. L'équipe de T. Tuschl a donc décidé d'introduire des oligonucléotides double-brin d'ARN spécifiques du messager d'intérêt dans des cellules animales, et a observé que ce messager d'intérêt voyait sa traduction fortement inhibée sans que des effets non-spécifiques et généraux soient observables (Elbashir, Harborth et al. 2001). La technique d'interférence ARN est donc désormais généralisée aux mammifères, même si nous verrons dans les parties suivantes que les effets sont sensiblement différents dans les cellules de mammifères et dans les cellules de *C. elegans* par exemple. Le mécanisme est encore mal connu, et son caractère amplificateur par exemple semble dépendre de l'espèce des cellules traitées. Enfin il faut garder à l'esprit que cette technique repose sur des mécanismes endogènes d'inhibition de traduction des messagers par des *micro-RNAs* présents dans les génomes de nombreuses

espèces, et que les études concernant ces *micro-RNAs* jusqu'alors ignorés révèlent un pan entier de la régulation de l'expression des gènes.

III. DISCUSSION

Dans cette partie Discussion, je vais analyser les résultats de mes travaux de thèse dans le contexte des problématiques présentées dans la partie Introduction□ le comportement de la Giantine vis-à-vis de la définition d'une matrice golgienne, la nature des intermédiaires de transport (vésicules sphériques ou tubules) et le rôle de l'activité des Rabs dans le contrôle de leur morphologie, et le devenir des membranes golgiennes au cours de la mitose. Ensuite je proposerai une nouvelle méthode d'étude du transport intracellulaire□ une stratégie plus globale, tirant partie de la finesse des mécanismes moléculaires élucidés par de nombreux groupes ces dernières années, et tentant de rendre compte du transport à l'échelle cellulaire en tant que système dynamique hors équilibre. Finalement, je présenterai les perspectives d'application de la technique d'*Antibody Phage Display*, dont le développement a constitué l'essentiel de mon travail de thèse et dont (j'espère) le spectre d'application se révélera large.

III.A. La Giantine et la définition d'une matrice golgienne

La structure unique de l'appareil de Golgi en empilement de citernes fascine de nombreux biologistes. Cette structure est conservée à travers l'Evolution, et est aussi observée dans des préparations d'appareil de Golgi purifié. Une protéolyse ménagée de telles préparations rompt l'empilement des citernes, et donc le groupe de G. Warren a proposé l'existence d'une matrice golgienne, un squelette protéique qui maintiendrait les membranes de l'appareil de Golgi. Ce squelette protéique aurait des propriétés biochimiques comparables au cytosquelette de microtubules ou à la matrice nucléaire, et en particulier serait insoluble dans des détergents non-ioniques. La matrice golgienne isolée par le groupe de G. Warren était donc initialement définie comme la structure protéique obtenue après extraction au Triton X100 et lavage salin.

Cependant, les protéines présentes dans cette matrice et celles qui ont été ajoutées à la liste pour des raisons fonctionnelles⁹⁴ ou de similitude de séquence ont souvent des dynamiques intracellulaires incompatibles avec leur rôle supposé en tant qu'échafaudage golgien statique. Elles ne sont pas stablement ancrées à l'appareil de Golgi mais semblent être en permanent échange entre le cytosol et ces membranes golgiennes ainsi que des tubules transportés à leur proximité (Marra et al. 2001; Ward et al. 2001□

⁹⁴ leur rôle dans le réassemblage de l'appareil de Golgi en fin de mitose ou lorsque la BFA est retirée de cellules

La Giantine semble être plus stablement ancrée à l'appareil de Golgi, même lorsqu'il est désassemblé avec la BFA ou par dépolymérisation des microtubules (voir partie Résultats). Seulement il n'existe pas d'homologue connu de la Giantine dans de nombreuses espèces dans lesquelles l'appareil de Golgi possède sa structure en empilement. Et surtout la Giantine semble absente des mini-empilements golgiens dans les cellules de mammifères traitées au Nocodazole, ce qui exclut son rôle dans leur formation et maintien.

En fait à part les GRASPs et p115, aucune protéine de la matrice golgienne ne semble exister chez *S. cerevisiae*, qui présente pourtant dans certaines conditions cette structure golgienne en empilement de citernes. Mais dans des cellules de mammifères traitées à la BFA, GRASP65 semble s'accumuler sur des tubules partant de l'appareil de Golgi vers la périphérie et aux sites de sortie du RE, et donc être déplété de l'appareil de Golgi bien avant la disparition de cet organite (contrairement à la Giantine) (Ward et al. 2001). Si une telle matrice golgienne devait exister, elle doit être composée de protéines conservées chez tous les eucaryotes dans lesquels l'appareil de Golgi est empilé, depuis *S. cerevisiae* jusqu'aux mammifères, mais aussi chez les plantes (dans lesquelles l'appareil de Golgi existe sous la forme d'un empilement de très nombreuses citernes), et présentes sur les empilements golgiens tant qu'ils persistent.

Les GRASPs et p115 semblent cependant se rapprocher le plus de cette définition, la dynamique de la chimère GRASP65-GFP en traitement BFA ne correspond peut-être pas au comportement de la protéine endogène. Les golgines ne sont pas toutes complètement caractérisées, il est possible que certaines déjà connues ou d'autres à venir satisfassent aux critères ci-dessus. Le rôle des GRASPs et p115 dans le réassemblage de l'appareil de Golgi en fin de mitose, la fonction-pivot de p115 dans le transport RE-Golgi (depuis la sortie du RE jusqu'à l'arrimage golgien (Kondylis et Rabouille 2003)), la fonction de GRASP65 proposée par V. Malhotra dans l'initiation du désassemblage en début de mitose et le contrôle mitotique associé (Sutterlin et al. 2002), ainsi que les clivages observés lors de l'apoptose de GRASP65 et p115 facilitant la fragmentation de l'appareil de Golgi dans ces conditions (Chiu, Novikov et al. 2002 □ Lane et al. 2002 □ Machamer 2003), suggèrent que ces protéines jouent un rôle central dans la structure de l'appareil de Golgi. Il est possible que GRASP65 ait un comportement extrêmement dynamique, en échange entre le cytosol⁹⁵, les membranes golgiennes, et des tubules qui relient le cis-Golgi aux membranes des compartiments intermédiaires tardifs (Marra et al. 2001). La structure de l'appareil de Golgi en empilement

de citernes découle très probablement de sa fonction dans le trafic membranaire⁹⁶, et si cette structure semble très stable les molécules qui la composent peuvent très bien posséder une dynamique intense.

Les membranes elles-mêmes, qui composent cet empilement stable, peuvent très bien avoir une dynamique intense. Certains mutants thermosensibles du facteur d'échange de Arf1, Sec7p, chez *S. Cerevisiae*, bloquent la sécrétion à la température restrictive à une étape immédiatement postérieure à l'export du RE, et induisent la formation exagérée de larges citernes empilées au voisinage des sites de sortie du RE (Figure 17) (Deitz et al. 2000). De manière générale, la structure en empilement de citernes de l'appareil de Golgi pourrait être due à une accumulation locale de membranes en raison de l'équilibre des flux de membranes entrant et sortant de l'appareil de Golgi. Cette structure est observée dans les préparations de Golgi, mais cette fois-ci les composants golgiens sont figés, le couplage entre la dynamique golgienne et sa structure est donc inaccessible dans de tels systèmes in vitro. La solution utilisée par le groupe de G. Warren d'étudier le réassemblage post-métaphasique de l'appareil de Golgi permet de re-créeer in vitro le couplage structure-dynamique, mais idéalement ce couplage devrait être étudié dans des cellules vivantes. Une autre approche récente est d'étudier l'appareil sécrétoire à une étape précise du développement dans des larves de *D. melanogaster*. En suivant la localisation de marqueurs golgiens par microscopie électronique, le groupe de C. Rabouille a montré que des vésicules et tubules fusionnent pour produire un empilement de citernes, et que ce processus est dépendant de NSF. La formation de l'appareil de Golgi associée à cette étape est aussi un système unique pour étudier la biogenèse de l'appareil de Golgi (Kondylis et al. 2001; Dunne et al. 2002).

Une autre piste pourrait être révélée par l'étude de l'apparition de l'appareil de Golgi chez les eucaryotes primitifs, en particuliers certains parasites. Si *T. gondii* possède un appareil de Golgi composé d'un unique empilement de 5 citernes (comme dans la levure *P. pastoris*, au voisinage de sites de sortie du RE concentrés près du noyau) (Joiner et Roos 2002; Pelletier et al. 2002), le protozoaire *G. intestinalis*, probablement parce que ce parasite a émergé très tôt dans l'arbre évolutif des eucaryotes, ne possède apparemment pas d'appareil de Golgi (observations par microscopie électronique), et ne dispose pas non plus d'un certain nombre

⁹⁵ à moins que les observations du groupe de J. Lippincott-Schwartz soient dues à la surexpression excessive d'une chimère GRASP65-GFP

⁹⁶ en revanche cette structure n'est pas nécessaire au transport, puisque la sécrétion chez *S. cerevisiae* ne met pas en jeu d'empilement golgien en conditions normales, et que la déplétion de p115 dans des cellules de drosophile altère la structure golgienne sans grandement affecter le transport golgien (Kondylis et Rabouille 2003).

de compartiments comme les mitochondries ou les peroxisomes qui ont été acquis plus tardivement par les eucaryotes (Marti, Regos et al. 2003)⁹⁷. Mais des observations récentes ont montré que lors de la phase d'encystation (formation d'une paroi, *cyst wall*, pour protéger le parasite au sein d'une vacuole dans les cellules-hôtes), la nécessité de sécréter certaines protéines déclenche l'apparition de sites spécialisés du RE, COPII-positifs, depuis lesquels les protéines destinées à former la paroi sont exportées. Ces protéines sont ensuite empaquetées dans des vésicules spécialisées pour l'encystation, et ces vésicules portent successivement le manteau COPI et le manteau clathrine au cours de leur maturation avant d'atteindre la membrane externe, comme les membranes de la voie de biosynthèse-sécrétion des eucaryotes possédant un appareil de Golgi⁹⁸ (Figure 18). Il s'agit probablement d'un appareil de sécrétion ancestral, et ces vésicules d'encystation constituent ainsi une forme primitive de l'appareil de Golgi des eucaryotes plus complexes (Marti, Li et al. 2003; Marti, Regos et al. 2003)

Il serait intéressant de déréguler les cinétiques de transport en jouant par exemple sur le facteur d'échange de Arf1 (homologue de Sec7p chez *S. cerevisiae*), s'il existe chez ce parasite, et d'observer si en modifiant uniquement les flux membranaires on parvient à transformer les vésicules d'encystation en citernes éventuellement empilées. Au cours de l'Evolution des eucaryotes, ce nouveau compartiment est peut-être devenu un noeud central dans la topologie de complexité toujours croissante du réseau des voies de transport, et serait ainsi devenu un réservoir de membranes jouant à la fois le rôle de tampon et de tri entre ces voies. Cette accumulation locale de membranes pourrait expliquer sa structure, un moyen efficace d'accumuler de la surface dans un espace confiné étant par exemple de produire des empilements compacts de membranes parallèles. Notons cependant que ces membranes, s'il est possible qu'elles s'auto-organisent localement en empilements comme dans les phases lamellaires eau/lipides, sont dans un état de compaction tel que cette structure n'est probablement pas spontanée et nécessite l'intervention d'autres facteurs, qui maintiennent ces membranes sous tension pour abaisser leurs fluctuations par exemple. Il serait aussi intéressant de chercher si *G. intestinalis* possède un homologue de GRASP65 et de p115, et si tel n'est pas le cas de voir si l'expression de ces protéines suffit à produire un empilement de citernes à partir des vésicules d'encystation. Cet organisme-modèle pourrait donc permettre

⁹⁷ Il est aussi possible que ces organites (tout du moins les mitochondries (Baldauf 2003)) aient été «perdus» au cours de l'Evolution. Cet appareil sécrétoire de *G. intestinalis* pourrait être plutôt un «fossile» de l'appareil de Golgi, mais n'en reste pas moins un système d'étude permettant de comprendre son fonctionnement «minimal».

⁹⁸ Le manteau COPI recouvre les membranes du compartiment intermédiaire RE-Golgi, celles des extrémités des citernes de l'appareil de Golgi, et la clathrine est présente sur le TGN.

de trancher entre l'hypothèse matricielle et l'hypothèse du couplage structure-dynamique pour expliquer la structure de l'appareil de Golgi, à moins que ces deux visions ne soient trop caricaturales et que la matrice golgienne elle-même possède une dynamique qui impose la structure golgienne.

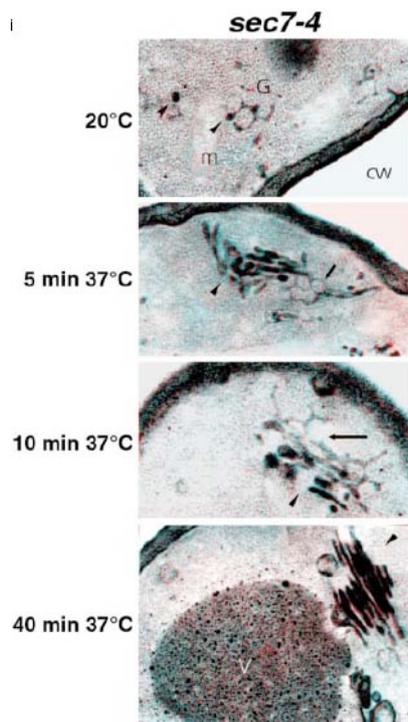


Figure 17. Mutant *Sec7* chez *S. cerevisiae* (Deitz et al. 2000). L'allèle *sec7-4* est à l'origine d'un phénotype thermosensible correspondant à un défaut de sécrétion. Ce défaut est dû à l'altération de la biogenèse de l'appareil de Golgi, plus précisément de la transition ER-Golgi. La structure de l'appareil de Golgi à la température permissive est identique à celle des souches sauvages, en mini-réseau réticulé. En quelques dizaines de minutes après passage à la température restrictive, de longs tubes se forment à partir des éléments de transition du RE, et y restent connectés. Au fur et à mesure de leur accumulation, les membranes s'arrangent en empilements de citernes.

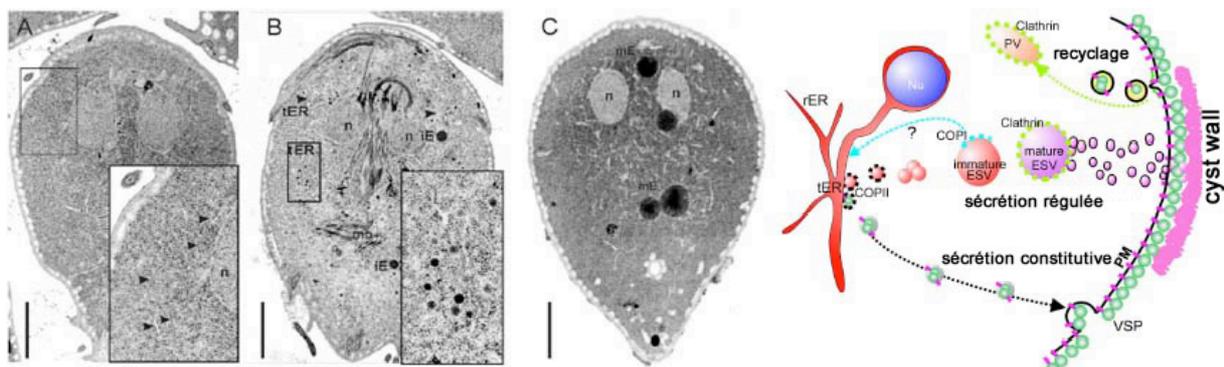


Figure 18. Sécrétion de la paroi d'encystation chez *G. intestinalis* (Marti, Li et al. 2003; Marti, Regos et al. 2003). Le parasite *G. intestinalis* secrète constitutivement des protéines vers la membrane plasmique mais ne possède pas d'appareil de Golgi (identifiable par microscopie électronique). Lorsque le processus d'encystation par sécrétion régulée est déclenché, des éléments de transitions positifs pour COPII apparaissent au niveau du RE, les membranes bourgeonnées produisent des vésicules d'encystation qui sont recouvertes successivement de COPI et de clathrine au cours de leur maturation, avant de délivrer leur contenu en fusionnant avec la membrane plasmique pour former la paroi (*cyst wall*).

Quoi qu'il en soit, une description complète de cet organite passe par une étude systématique de sa structure et des facteurs la régulant dans différentes espèces à travers les eucaryotes, des formes plus primitives (levures, parasites) aux formes les plus évoluées (mammifères, plantes), en passant par *D. melanogaster*, *C. elegans*, *D. discoideum*. Puisque cette structure hiérarchique en empilement est si bien conservée, les mécanismes responsables de son établissement et sa maintenance le sont probablement aussi.

III.B. Intermédiaires de transport sphériques ou tubulaires

Une question centrale dans l'étude du transport intracellulaire est la nature des intermédiaires de transport (Ayala 1994). Une partie du trafic intracellulaire au moins nécessite l'intervention de vésicules (sphériques ou de géométrie plus complexe) qui sont échangées entre différents compartiments. Il a été longtemps pensé que ces vésicules étaient nécessairement sphériques, comme le montraient les observations par microscopie électronique depuis les travaux fondateurs de G. Palade et L. Orci. Récemment, la microscopie de fluorescence sur cellules vivantes a révélé que des objets membranaires de géométrie plus complexe, des tubules ou des structures tubulo-vésiculaires, sont échangés entre compartiments pour transmettre des cargos. Ces structures sont aussi visibles dans des cellules fixées, mais plus rarement, et observables par microscopie de fluorescence ou électronique. En revanche les vésicules sphériques observées par microscopie électronique, en particulier autour de l'appareil de Golgi, sont rarement observées dans des cellules vivantes (si l'on suit le manteau COPI par exemple). Ceci signifie que même si des vésicules sphériques existent, comme les vésicules COPI observées par microscopie électronique, le manteau COPI n'est pas suffisamment enrichi sur celles-ci pour les révéler⁹⁹. In vitro, des vésicules sphériques sont accumulées en général lorsque le système contient une GTPase qui recrute un manteau et un analogue non-hydrolysable du GTP, c'est-à-dire un système dans lequel la dynamique moléculaire est artificiellement figée. S'il est peu probable que les tubules visualisés par microscopie de fluorescence in vivo soient des trains de vésicules non-résolues à l'échelle photonique, il est en revanche possible que les vésicules sphériques

⁹⁹ sans que leur taille les rendent invisibles pour autant, la limite de résolution empêchant uniquement de les distinguer si elle sont trop proches (comme au voisinage de l'appareil de Golgi probablement), voir l'annexe technique de la partie Résultats. Au contraire, les vésicules sphériques d'endocytose recouvertes de clathrine observées par microscopie électronique sont elles facilement observables même dans des cellules vivantes par microscopie de fluorescence (Gaidarov et al. 1999).

observées par microscopie électronique soient dues à des artefacts de fixation (chimique ou cryogénique). Cette dernière possibilité reste néanmoins très peu probable, car la fixation cryogénique fige les structures cellulaires très rapidement (en quelques ms). Un dernier argument est la difficulté d'observer par microscopie électronique des structures en trois dimensions, et les méthodes de type tomographique et stéréoscopique suggèrent parfois que de nombreuses structures se révèlent être davantage connectées en tubules (dont les sections sur coupe fine peuvent ressembler à des vésicules) qu'on ne le pensait jusqu'alors (A. Rambourg, communication personnelle).

D'un point de vue physique, la controverse sur la forme des intermédiaires de transport, sphériques ou tubulaires, peut se ramener à une controverse sur leur taille. L'élasticité de courbure des membranes impose en fait une forme sphérique si l'intermédiaire de transport est de petite taille, et autorise des géométries globalement non-sphériques si l'intermédiaire de transport est plus grand — tout dépend du rapport entre la taille globale de l'intermédiaire de transport et la longueur de persistance de ces membranes (longueur sur laquelle la rigidité d'une membrane influe sur sa forme). La forme des intermédiaires de transport de grande taille peut de plus être imposée par leur mouvement au sein du cytosol visqueux, et si celui-ci s'effectue le long de microtubules (relativement rectilignes à l'échelle cellulaire) et suffisamment rapidement (à l'aide de moteurs moléculaires voyageant à des vitesses supérieures à $0.1 \mu\text{m/s}$), la géométrie adaptée est tubulaire. La formation de tubules à partir d'un réservoir membranaire effectuée uniquement par des moteurs se déplaçant sur les microtubules a d'ailleurs été démontrée *in vitro* (Roux et al. 2002).

La question biologique est donc la suivante — quelle est la taille des intermédiaires de transport, et comment est-elle régulée ? Les tubules visualisés *in vivo* partent en général du RE ou de l'appareil de Golgi, deux compartiments de grande surface membranaire continue et dont les membranes sont relativement pauvres en cholestérol et donc souples (relativement petite longueur de persistance). La membrane plasmique est plus rigide et n'émet pas de tubule en conditions normales¹⁰⁰, et la petite taille des endosomes les empêche probablement de former de grands intermédiaires de transport (même si la morphologie des endosomes de recyclage révèle l'existence de zones tubulaires permettant le tri). Donc seulement certains compartiments semblent capables de générer de tels intermédiaires de transport tubulaires de grande taille (plusieurs microns), le reste du trafic pouvant s'expliquer par l'échange de plus petits intermédiaires sphériques et éventuellement par maturation de compartiments. Par

exemple il est possible que les vésicules sphériques d'endocytose formées à la membrane plasmique fusionnent pour former des endosomes, qui échangent du matériel et trient leur contenu directement par fusion et fission (sans échanger de vésicules, un phénomène encore une fois visualisé par microscopie de fluorescence *in vivo* (Perez et al. 2002)), et mûrissent ainsi en lysosomes ou fusionnent avec le TGN.

La taille des intermédiaires de transport formés à partir du RE ou de l'appareil de Golgi pourrait être régulée en fonction de l'intensité du trafic. Il est possible que la machinerie de bourgeonnement et de tri ne parvienne pas à former suffisamment d'intermédiaires de transport à la surface du RE ou de l'appareil de Golgi lorsque le trafic doit être accéléré, et donc à nombre d'intermédiaires constant une augmentation de leur taille permettrait d'augmenter le flux de cargos et de membranes.

Comment la taille des intermédiaires de transport pourrait être régulée? Nous avons vu que l'incubation de membranes golgiennes avec un cytosol déplété du manteau COPI permet de reconstituer le transport intra-Golgi, en l'absence de vésicules sphériques, et des extensions tubulaires sont produites. Le désassemblage mitotique de l'appareil de Golgi *in vitro* fait intervenir une voie dépendante de COPI de formation de vésicules sphériques et une voie indépendante de COPI qui produit des fragments hétérogènes de citernes. Si la dynamique de COPI est figée par un anticorps ou un mutant activé de Arf1, le transport rétrograde dépendant de Rab6 et indépendant de COPI des enzymes golgiennes n'est pas bloqué. La Bréfeldine A déplace le manteau COPI des membranes et engendre la formation de très longs tubes membranaires qui se déplacent le long de microtubules. La surexpression de Rab6 (White et al. 1999; Nizak et al. 2003), mais aussi d'autres Rabs¹⁰¹, entraîne la formation de tubes similaires. Ce faisceau de résultats semble converger vers l'idée générale qu'il existe un équilibre entre la fonction des manteaux (en particulier COPI) et celle des Rabs, et que cette balance contrôle la taille des intermédiaires de transports. L'interaction de Rab6 avec une kinésine et la dynactine, qui promeut le transport des membranes par l'intermédiaire de moteurs moléculaires dans les deux sens sur les microtubules, suggère un mécanisme similaire à celui observé dans le système minimal *in vitro* de la formation de tubes à partir d'un réservoir de membranes (Roux et al. 2002). Cependant ce modèle reste à généraliser puisque Rab1 et Rab33 n'ont pas de moteur moléculaire parmi leurs effecteurs connus (pour

¹⁰⁰ Des tubules sont formés quand un mutant de la dynamine, régulateur de la fission, est exprimé.

¹⁰¹ Rab1, Rab33, observations que j'ai effectuées en collaboration avec R. Sannerud et J. Saraste, ainsi que J. Young et T. Nilsson.

le moment seuls des facteurs d'arrimage, liés éventuellement à des complexes SNAREs, ont été décrits pour ces deux Rabs (Valsdottir et al. 2001), d'ailleurs aussi pour Rab6).

J. Rothman et G. Warren ont proposé que l'équilibre entre fusion homotypique et fusion périplasmique¹⁰² contrôle la taille des organites et des vésicules (Rothman et Warren 1994). Il est possible que la fonction des manteaux (comme COPI) favorise la fusion périplasmique, et donc la fission, tandis que celle des Rabs favorise la fusion homotypique. La fonction des manteaux dans le bourgeonnement et le tri est établie, et ces processus s'accompagnent de fission membranaire (le couplage entre ces processus est tel que des interactions entre machineries de bourgeonnement/tri et fission sont prévisibles). La surexpression de Rab5 (en particulier son mutant activé) entraîne la formation d'endosomes de taille exagérée (Duclos et al. 2003). D'une façon générale, le rôle des Rabs dans la régulation de la fusion membranaire, en particulier par le recrutement de facteurs d'arrimage, est suggéré par un nombre croissant d'études. Notre étude a démontré que la surexpression de Rab6, même légère, transforme les intermédiaires de transport de petite taille (sphères de 1 μm de diamètre et courts tubes de 2 μm de long quand ils se déplacent rapidement) en longs tubes stables de 5 à 20 μm de long (Nizak et al. 2003). Rab6 est présent dans son état lié au GTP sur ces longs tubes, mais il nous aurait fallu disposer d'un anticorps spécifique de la conformation GDP pour savoir si une des deux formes est préférentiellement enrichie sur les tubes. La surexpression d'une Rab (en général d'une petite GTPase) a probablement tendance à saturer d'une part le facteur d'échange et d'autre part la protéine activatrice, et donc à ralentir le passage d'une conformation à l'autre. Je pense que c'est le ralentissement du cycle des Rabs qui entraîne une modification de la forme et la taille des vésicules, plutôt que l'enrichissement de Rabs activées sur les membranes qui recruteraient des moteurs en excès et déformeraient exagérément les membranes.

Ce processus serait plus «*universel*», et correspondrait aux observations déjà reportées sur le fonctionnement de Rab5 en tant que *timer* (dont le cycle est beaucoup plus rapide que le rythme de fusion des vésicules) (Rybin et al. 1996), et de façon plus générale aux observations des cycles «*rapides*» de Sar1 et Arf1 in vitro et in vivo et de l'importance de

¹⁰² Fusion homotypique = fusion de membranes d'un même type de compartiment, par exemple deux endosomes fusionnent pour en former un plus gros.

Fusion périplasmique = fusion des feuillettes internes d'une bicouche, menant à la fission membranaire. Par exemple dans un tube membranaire pincé en son centre, les feuillettes internes sont en contact et peuvent fusionner, ce qui favorise ensuite la fusion des feuillettes externes et provoque la fission du tube en deux tubes plus courts.

cette cinétique de cyclage rapide pour la fonction correcte de ces GTPases dans le transport membranaire.

Ainsi, la fonction de Rab6 (et d'autres Rabs) dans le transport intracellulaire pourrait être de favoriser la fusion homotypique vis-à-vis de la fusion périplasmique favorisée par COPI (et plus généralement les manteaux), et ainsi de contrôler la géométrie des intermédiaires de transport en fonction de l'intensité du trafic. A cette fonction s'ajouterait ensuite le déplacement des membranes sur le cytosquelette par des moteurs régulés par la dynactine (effecteur de Rab6), cette seconde fonction jouant peut-être un rôle secondaire puisque le transport golgien antérograde et rétrograde est largement insensible à l'absence de cytosquelette (Kreis et al. 1997).

III.C. Héritage de l'appareil de Golgi au cours de la mitose

Je vais tout d'abord revenir vers un point que j'ai rapidement abordé dans la partie Introduction □ la possibilité que les mécanismes d'héritage de l'appareil de Golgi qui ont été identifiés jusqu'ici soient souvent influencés par le point de contrôle d'assemblage du fuseau. Ensuite, je discuterai l'importance de la problématique concernant les modes d'héritage de l'appareil de Golgi.

III.C.1. Mécanismes de désassemblage et réassemblage de l'appareil de Golgi □ un biais vers le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique □

L'étude dynamique de l'appareil de Golgi en mitose a permis de valider l'hypothèse de départ du groupe de G. Warren □ l'appareil de Golgi est désassemblé en début de mitose au moins en partie par une inhibition de la machinerie de fusion membranaire (déstabilisation du complexe de facteurs d'arrimage), et réassemblé en fin de mitose par une réactivation de cette machinerie (rétablissement du complexe d'arrimage, rôle central des voies de fusions dépendantes des ATPases NSF et p97). Il est cependant clair qu'en retour que la nature des mécanismes caractérisés dans cette dynamique mitotique des membranes golgiennes a été largement influencée par l'hypothèse de départ attribuant un rôle majeur à la régulation de la fusion membranaire. Le système in vitro mis au point n'en reste pas moins un système très puissant permettant de tester systématiquement le rôle de nombreuses protéines dans ces processus.

L'identification de GRASP65 en tant que protéine associée aux membranes, accessible au cytosol (ou du moins au NEM) uniquement en mitose, et jouant un rôle spécifique dans l'empilement des citernes reformées, est une découverte décisive et qui ne repose pas sur un mécanisme caractérisé auparavant (Barr et al. 1997). Cette protéine n'était apparentée à aucune autre déjà connue, son rôle dans la structure de l'appareil de Golgi semble crucial, et cette protéine est bien conservée chez les eucaryotes. La seule critique que je trouve à apporter à cette étude est la nature du cytosol mitotique de désassemblage de l'appareil de Golgi. GRASP65 a été identifiée en tant que protéine associée aux membranes golgiennes (et donc au moins en partie non-soluble), inaccessible au cytosol en interphase, et accessible après fragmentation mitotique de l'appareil de Golgi. Le problème est que le cytosol mitotique utilisé est un cytosol de cellules HeLa bloquées par traitement au Nocodazole, c'est-à-dire de cellules arrêtées au *spindle assembly checkpoint* recrutement de Mad2 aux kinétochores (Abrieu et al. 2001 Martin-Lluesma et al. 2002), cascades de signalisation associées, lorsque le Nocodazole est retiré la mitose reprend mais dans des conditions clairement différentes de la situation physiologique. GRASP65 pourrait donc être une protéine golgienne accessible et fortement phosphorylée dans des cellules arrêtées au *spindle assembly checkpoint* et non pas lors d'une mitose « normale », le rôle de GRASP65 serait, dans ce cas, surtout essentiel dans le réassemblage de l'appareil de Golgi après le retrait du Nocodazole¹⁰³. Le fait qu'un anticorps anti-GRASP65, de même que le peptide dérivé cible de cet anticorps, aient un effet inhibiteur de l'entrée en mitose (Sutterlin et al. 2002), et que l'homologue de GRASP65 chez *S. cerevisiae* Grh1p soit impliqué dans le *spindle assembly checkpoint* (Norman et al. 1999), suggèrent que GRASP65 est une protéine golgienne impliquée dans le contrôle de la mitose. Son rôle serait activé dans certaines conditions comme le déclenchement de certains points de contrôle, mais pas nécessairement dans la mitose « physiologique »¹⁰⁴. Une hypothèse qui reste à tester est qu'en utilisant des cytosols « mitotiques » de cellules bloquées par traitement au Nocodazole, les mécanismes identifiés par les groupes de G. Warren et V. Malhotra soient biaisés par l'induction du *spindle assembly checkpoint* et donc spécifiques de cette situation. Par exemple, il est possible que l'accessibilité au cytosol et la phosphorylation massive de GRASP65 soit un moyen dépendant de l'appareil de Golgi d'empêcher la sortie de mitose si le fuseau n'est pas correctement assemblé (et de bloquer la reformation « aberrante » de l'appareil de Golgi avant

¹⁰³ et peut-être dans l'inhibition de réassemblage tant que le fuseau mitotique n'est pas en place

¹⁰⁴ Peut-on parler de mitose physiologique dans des lignées cellulaires immortalisées ?

la transition vers l'anaphase). La confirmation des rôles de CDK1 et MEK1 dans le système semi-in vitro utilisant des extraits mitotiques d'œufs de Xénope valide néanmoins au moins une partie des résultats obtenus initialement en présence de Nocodazole. Mais le rôle de GRASP65 et aussi celui de la polo-kinase Plk1, deux protéines apparemment impliquées dans le *spindle assembly checkpoint* et d'autres points de contrôle de mitose (Arnaud et al. 1998 [Hu et al. 2001 [Hu et Elledge 2002 [Seong et al. 2002 [Gruneberg et Nigg 2003]), doit être maintenant testé dans des conditions mitotiques dépourvues de Nocodazole¹⁰⁵.

Le résultat important de notre étude, qui a nécessité la mise au point technique d'imagerie in vivo et de méthodes de photoblanchiment, est que les membranes golgiennes connaissent une transition soudaine en prophase qui leur confère un comportement très particulier vis-à-vis de la drogue BFA. Précisément au moment où elles sont sur le point de se fragmenter et se répartir presque uniformément au sein de la cellule, la drogue empêche cette dispersion, tandis que l'effet connu de cette drogue est de provoquer la disparition de l'appareil de Golgi en quelques minutes par fusion avec le RE en interphase. Bien que nous n'ayons pas encore caractérisé les mécanismes moléculaires correspondants, ceci met en lumière une modification majeure et soudaine de l'appareil de Golgi en prophase. Idéalement, il faudrait disposer de nouveaux réactifs, par exemple des drogues issues d'un crible qui rendent les membranes à nouveau capables de se disperser en présence de BFA, des anticorps phospho-spécifiques, pour étudier plus avant ce phénomène. En tout cas, je pense que l'étude du devenir de l'appareil de Golgi au cours de la mitose nécessite ce type d'approche par imagerie de cellules vivantes, puisque comme pour l'effet surprenant que nous avons observé, c'est la seule technique qui permette de suivre l'évolution des membranes dans une même cellule¹⁰⁶.

III.C.2. *Polémique sur le mode d'héritage de l'appareil de Golgi*

Un autre aspect n'a pas été étudié dans les systèmes in vitro ou semi-in vitro d'étude de l'appareil de Golgi en mitose [la possibilité que l'essentiel des membranes golgiennes fusionnent avec le RE de manière transitoire au cours de la mitose. Il serait intéressant d'étudier la régulation de la machinerie de fusion Golgi-RE au cours du cycle cellulaire, et les

¹⁰⁵ Le rôle de GRASP65 dans le réassemblage vient d'être démontré in vivo (Wang et al. 2003).

¹⁰⁶ En effet, le même type d'expérience que les nôtres ont été effectuées par deux groupes (Jesch et Linstedt 1998 [Seemann et al. 2002]), et notre utilisation de l'imagerie in vivo nous a permis de réinterpréter les résultats de ces études biochimiques et d'immunolocalisation sur cellules fixées.

approches déjà mises en œuvre pourraient être adaptées à ce problème. Par exemple, il serait intéressant de tester si la machinerie de fusion du transport rétrograde Golgi-RE est affectée au cours des étapes successives de la mitose. Il faudrait d'abord disposer de cytosols de cellules synchronisées à différentes étapes du cycle (prophase, métaphase, télophase, interphase), ce qui peut être obtenu en récupérant des cellules à différentes étapes après un blocage en phase S à l'aphidicoline. Ces cytosols pourraient être ajoutés à des cellules semi-perméabilisées ou des membranes d'appareil de Golgi et de RE purifiés *in vitro*, et la fusion Golgi-RE peut être quantifiée en mesurant les modifications post-traductionnelles golgiennes d'une protéine séquestrée dans le RE. En interphase, cette fusion doit être minimale, en présence de BFA (tout du moins dans les cellules) elle doit être maximale, et l'échelle ainsi obtenue permettrait de tester l'existence d'une fusion Golgi-RE induite en prophase. Le rôle du complexe Sec20p/Tip20p/Dsl1p (Andag et al. 2001 □ Reilly et al. 2001 □ Vanrheenen et al. 2001) et de la tSNARE du RE Ufe1p, ainsi que celui de Rab6 et de COPI dans le transport rétrograde Golgi-RE pourrait être évalué en utilisant des anticorps dirigés contre ces protéines ou des peptides dérivés dans ces systèmes.

La controverse quant aux poids respectifs des stratégies d'héritage de l'appareil de Golgi à partir de fragments isolés ou après fusion avec le RE est un problème probablement moins central que celui du contrôle mitotique golgien déjà évoqué (voir I.B.3.). En effet, les deux stratégies peuvent fonctionner, les composants de l'appareil de Golgi sont équitablement hérités si l'appareil de Golgi est artificiellement redistribué dans le RE (Ward et al. 2001 □ Seemann et al. 2002) ou au contraire isolé des autres compartiments tout au long de la mitose (voir partie Résultats et une étude récemment publiée (Uchiyama et al. 2003)). De plus, il semble que dans la levure *S. cerevisiae*, les mécanismes d'héritage basé sur la fusion avec le RE et sur la fragmentation soient utilisés respectivement pour hériter les composants golgiens proximaux (du cis-Golgi) et distaux (du trans-Golgi) (Figure 19) (Rossanese et al. 2001).

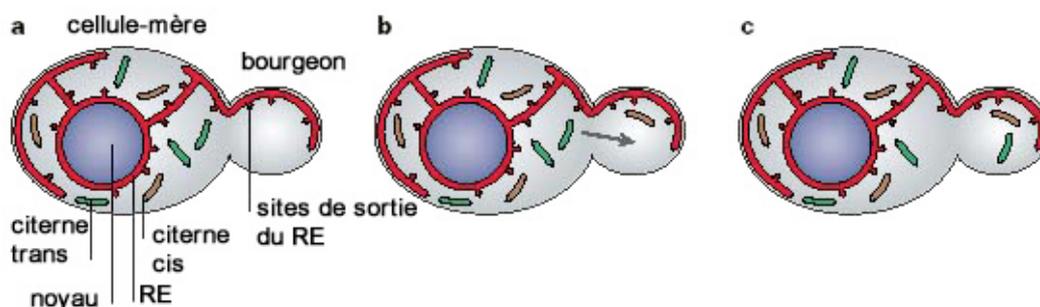


Figure 19. Modèle d'héritage de l'appareil de Golgi chez *S. cerevisiae* (Rossanese et Glick 2001 □ Glick 2002). Les deux mécanismes d'héritage sont utilisées en parallèle en fonction de la position

des membranes le long de la voie de biosynthèse-sécrétion. Les membranes golgiennes cis sont régénérées à partir des éléments de transition du RE en permanence (selon un modèle de type maturation des citernes), y compris dans le bourgeon. Les membranes golgiennes trans sont héritées par le bourgeon par déplacement de citernes trans depuis la cellule-mère jusqu'au bourgeon, probablement le long de filaments d'actine par la myosine de classe V Myo2p.

Notre étude est en fait aussi en faveur d'un modèle utilisant les deux modes d'héritage golgien□ la partie de l'appareil de Golgi qui résiste au traitement par la BFA quand la drogue est ajoutée en métaphase témoigne de l'existence de membranes qui sont forcément héritées indépendamment de tout autre compartiment au cours de la mitose. En revanche, la partie de l'appareil de Golgi qui se retrouve accumulée dans le RE dans les mêmes conditions¹⁰⁷ témoigne probablement de la partie de l'appareil de Golgi qui est héritée via le RE, ou bien via des vésicules qui semblent en contact privilégié avec le RE.

Cette controverse est en fait typique (et finalement intimement liée à) de nombreux aspects du trafic membranaire□ on tente de trancher entre deux modèles non-exclusifs d'un phénomène, en bloquant une des deux voies ou en l'exagérant. La même stratégie a été suivie dans le cadre de la controverse sur la nature du transport intra-Golgi en utilisant des cargos de grande taille. Un problème majeur de cette stratégie est que le système peut se ré-adapter à cette perturbation en inventant une solution basée essentiellement sur la voie privilégiée par la perturbation.

III.C.3. Liens avec d'autres controverses dans le cadre du transport intracellulaire

Des exemples de telles controverses déjà citées sont l'existence d'un tri spécifique des protéines destinées à être exportées depuis le RE ou l'export depuis le RE par défaut, l'existence de voies distinctes du transport rétrograde Golgi-RE, la directionnalité du transport dépendant de COPI, celle du transport dépendant de AP1, le rôle des vésicules dans le transport intra-golgien¹⁰⁸ ...

¹⁰⁷ Les proportions varient grandement d'une cellule à l'autre, l'équilibre entre ces deux modes ne semble pas robuste.

¹⁰⁸ Nous avons déjà mentionné dans ce dernier cas pourquoi le mode d'héritage par fusion avec le RE favorise l'hypothèse de transport golgien par maturation des citernes tandis que le modèle d'héritage par fragmentation favorise le modèle vésiculaire (voir partie Introduction) (Glick 2002□Lowe 2002).

La directionnalité des voies COPI et AP1 n'est pas encore complètement comprise. Les protéines formant le manteau COPI ont été caractérisées chez *S. cerevisiae* aussi bien comme des mutants de sécrétion que comme des mutants de rétention au RE, et donc la fonction de COPI semble nécessaire pour le transport rétrograde et antérograde. Etant donnée l'interaction de COPI avec les séquences de rétention au RE, on considère souvent que COPI fonctionne directement dans le transport rétrograde et que l'effet sur la sécrétion est indirect, par exemple des SNAREs du transport RE-Golgi doivent être efficacement recyclées au RE (après fusion et désappariement) pour le prochain événement de transport antérograde. De même l'adaptateur de manteau clathrine AP1 a été impliqué dans le transport entre endosomes et TGN dans les deux sens. Clairement, dans les deux cas, une compréhension globale nécessite de tenir compte simultanément des deux sens de la voie, la finesse dans la connaissance des détails moléculaires désormais atteinte est telle qu'on ne peut plus étudier le rôle d'une protéine dans une voie sans tenir compte des voies directement connectées. Pour les mêmes raisons, dans le cas de la polémique sur l'héritage de l'appareil de Golgi, il devient nécessaire de tenir compte des deux mode d'héritage possibles pour rendre compte des observations.

III.D. Organisation en compartiments □ système statique en équilibre ou système dynamique hors équilibre □

De façon générale, il est possible que l'étude du transport intracellulaire soit intrinsèquement limitée par l'analyse moléculaire de processus de transport entre des compartiments considérés comme fixes reliés par des voies de transport considérées comme essentiellement isolées et indépendantes. Si cette approche a permis d'identifier un certain nombre d'acteurs-clés de ces événements de transport, la description globale du transport à l'échelle de la cellule n'est pas encore acquise. En effet, bien que le problème de la spécificité de fusion membranaire au sein des cellules soit assez bien compris (existence de règles combinatoires d'interaction des SNAREs), celui de l'adressage correct des molécules vers les compartiments ne l'est pas encore. Il semble acquis qu'une vésicule portant une vSNARE donnée ne fusionne qu'avec le compartiment-cible qui porte les tSNAREs correspondantes. Mais les mécanismes assurant la spécificité d'adressage des SNAREs vers les bonnes membranes ne sont pas encore élucidés. De même dans le cas des Rabs, qui constitue l'autre famille de protéines jouant un rôle majeur dans la spécificité des événements de transport et dont chacun des membres est localisé sur un domaine membranaire très précis. Le problème de la spécificité d'adressage est actuellement abordé en recherchant un récepteur spécifique

pour chacune de ces protéines, le récepteur pouvant éventuellement être un lipide de la membrane à laquelle elles sont adressées¹⁰⁹. Cependant cette approche ne permet probablement pas de rendre compte de l'organisation cellulaire en compartiments délimités par des membranes de compositions distinctes et contenant spécifiquement certaines molécules, puisque ce modèle présuppose l'existence de tels compartiments délimités par des membranes différentes qui servent de récepteurs spécifiques à la machinerie du transport.

D'un point de vue physique, le modèle d'organisation de la cellule en compartiments subcellulaires fixes qui échangent des vésicules correspond à une description en termes de système statique en équilibre. Une façon de dépasser les limitations auxquelles sont confrontées notre compréhension du trafic intracellulaire et de l'organisation des compartiments serait peut-être de tenter de décrire cette organisation plutôt en tant que système dynamique hors équilibre. En effet, ce système est à la fois dynamique et extraordinairement stable. La perturbation la plus violente intervient en mitose, lorsque certains organites comme l'appareil de Golgi sont désassemblés et le trafic est interrompu. A chaque division, la cellule doit très rapidement reformer ses organites et reprendre le trafic intracellulaire, en partie parce que le déroulement correct de la mitose nécessite certaines étapes de transport intracellulaire. Ce système est donc extrêmement stable, il est en permanence réorganisé de zéro. La consommation d'énergie par la machinerie de transport (par hydrolyse de GTP et d'ATP respectivement par les protéines Sar/Arfs/Rabs et NSF) suggère que ce système est hors d'équilibre.

La modélisation d'une organisation cellulaire complexe en tant que système dynamique hors équilibre a déjà été effectuée dans un autre contexte: celui de la formation des asters de microtubules et du fuseau mitotique, c'est-à-dire des différents assemblages de microtubules au sein des cellules (Nedelec et al. 1997 □ Surrey et al. 1998 □ Surrey et al. 2001 □ Nedelec 2002 □ Nedelec et al. 2003). Au moyen de simulations numériques, dont les prédictions ont été testées dans un système *in vitro*, ces études ont montré qu'à partir d'ingrédients très simples, à savoir les propriétés mécaniques de flexion des microtubules et leur interaction avec des moteurs moléculaires, on peut rendre compte de la formation de structures complexes dynamiques hors d'équilibre (les moteurs consommant de l'énergie) à une échelle bien plus grande que celle de ses constituants élémentaires (les microtubules et les moteurs). En effet,

¹⁰⁹ Une autre hypothèse est que les protéines transmembranaires sont retenues par les membranes dont l'épaisseur correspond à la longueur du segment transmembranaire (Colley 1997). En fait cette hypothèse présuppose aussi que les membranes sont distribuées au bon

les simulations numériques montrent qu'un mélange aléatoire de microtubules (en instabilité dynamique) et de moteurs est capable de s'organiser spontanément en aster ou en fuseau bipolaire.

Dans le cadre du transport intracellulaire, une telle approche reviendrait à chercher les acteurs minimaux en plus de liposomes lipidiques contenant différentes sortes de lipides qui permettraient d'obtenir et maintenir une organisation stable en compartiments de compositions différentes (en termes de compositions membranaire et protéique). Ces acteurs minimaux seraient des protéines, dont certaines interagiraient avec les lipides (avec une affinité différentielle pour les différentes sortes de lipides, pour permettre le tri lors du bourgeonnement), d'autres convertiraient l'énergie obtenue par hydrolyse d'ATP ou GTP pour former et maintenir les gradients de composition entre compartiments. Il me semble qu'un ingrédient-clé serait la machinerie de fusion NSF/SNAP/SNARE, puisqu'elle remplit à elle seule toutes ces conditions (les SNAREs interagissent avec les membranes, NSF hydrolyse de l'ATP, et cette machinerie semble capable de rapprocher spécifiquement des liposomes en fonction d'une règle combinatoire très stricte). Ces expériences peuvent consister en parallèle d'une part en de classiques tests *in vitro* de fusion puis d'analyse de composition des liposomes (par cytométrie de flux par exemple) et d'autre part en simulations pour tester l'auto-organisation spontanée du système et explorer un très grand nombre de conditions beaucoup plus rapidement que manuellement *in vitro*.

D'une manière générale, je pense que l'étude des voies de transport intracellulaire nécessite désormais l'utilisation de simulations numériques afin d'évaluer les taux de transport d'un compartiment à un autre (en tenant compte de la voie rétrograde ou d'échange avec le cytosol) et les proportions d'une molécule donnée dans chacun des compartiments d'une voie, afin de rendre compte de l'activité très dynamique de ce système sans pour autant oublier le fait qu'il fonctionne en régime stationnaire. Ce genre d'analyse permettra probablement de réconcilier de nombreux résultats apparemment contradictoires (implication d'une protéine dans une voie antérograde plutôt que rétrograde par exemple) et offrira un cadre global de description de l'ensemble des voies de transport.

III.E. Perspectives de la technique d'Antibody Phage Display

endroit pour retenir les protéines sur le bon compartiment, et ce modèle n'explique pas la localisation des membranes.

Finalement, je vais conclure ma thèse sur la technique de production d'anticorps recombinants que j'ai le plus développée au cours de mes travaux au laboratoire et dont le champ d'application, jusqu'ici relativement restreint, mérite d'être considérablement étendu.

Les anticorps constituent un outil central pour étudier les fonctions des protéines et plus généralement des molécules au sein des cellules□ ils peuvent servir à détecter, purifier, ou perturber la fonction de ces molécules. Les méthodes classiques de production d'anticorps dans les animaux sont limitées pour plusieurs raisons, qui peuvent être surmontées en sélectionnant des anticorps recombinants *in vitro* par présentation à la surface de phages filamenteux. Nous avons démontré que la technique d'*Antibody Phage Display* permet d'obtenir en une semaine des anticorps recombinants contre des antigènes préservés dans leur contexte natif, en produisant des anticorps recombinants spécifiquement dirigés contre des protéines de la périphérie de l'appareil de Golgi ou la conformation liée au GTP de la GTPase Rab6. Récemment, notre groupe a produit en collaboration de nouveaux anticorps recombinants contre des membranes golgiennes mitotiques ¹¹⁰, GRASP65, des formes particulières de tubuline, et aussi des anticorps restreints pour un complexe MHC1-peptide. La diversité des cibles accessibles à partir de la même banque naïve est donc très grande, et cette méthode permet d'obtenir rapidement des anticorps qu'il serait difficile d'obtenir chez l'animal.

Nous avons aussi développé l'utilisation de ces anticorps recombinants pour suivre *in vivo* les protéines-cibles endogènes. De plus, dans le cas de Rab6, nous avons montré que la dynamique d'une protéine endogène diffère clairement de celle de la même protéine légèrement surexprimé en fusion avec la GFP, ce qui suggère un rôle direct du niveau d'expression de Rab6 dans la modulation de la géométrie des intermédiaires de transport. Ce résultat encourage à la production de tels intra-anticorps dirigés contre d'autres acteurs du transport intracellulaire, afin d'observer leur dynamique endogène (et visualiser ensuite l'effet de leur surexpression). Par exemple, il est possible que les observations de longs tubes en tant qu'intermédiaires de transport soient dues à la surexpression du régulateur de transport imagé ou à l'exagération de l'intensité du trafic comme dans le cas des expériences de transport du mutant thermo-sensible tsO45 de VSV-G□lorsque le bloc de température est relâché, VSV-G accumulé pendant des heures dans le RE est exporté vers l'appareil de Golgi au sein de structure de très grande taille, et ensuite au sein de très longs tubes depuis le TGN jusqu'à la membrane plasmique. Il est possible que ces longs tubules soient formés à cause d'une

augmentation soudaine du trafic lorsqu'une quantité très importante de molécules cargo est exportée depuis le RE. Plus généralement, l'utilisation de chimères de fusion avec la GFP exprimées, même stablement à un niveau équivalent à l'endogène, ne donne pas accès à la dynamique d'une protéine endogène, il s'agit déjà d'une surexpression, et cet aspect a été très souvent négligé jusqu'ici. Par exemple, il est très courant de recourir à l'expression de protéines étiquetées plusieurs fois par la GFP pour localiser une protéine en particulier dans les cellules de petite taille de *S. cerevisiae* (pour faciliter la détection), ou de considérer qu'une expression stable d'une protéine en fusion à la GFP à un niveau équivalent à l'endogène permet d'inférer le comportement de la protéine endogène.

Toujours dans le cas de Rab6, nous avons pu observer la dynamique intracellulaire d'une molécule dans une conformation bien précise. L'intérêt majeur de cette approche est qu'elle peut être étendue à n'importe quelle GTPase¹¹¹ sans avoir à connaître au préalable de partenaire de la GTPase dans sa conformation GTP (au contraire de la méthode basée sur les domaines de liaison des effecteurs pour tracer la conformation d'une GTPase). Dans le cas de Arf1 ou Sar1, cette méthode pourrait permettre de connaître l'état conformationnel de ces GTPases lors des phases de tri, bourgeonnement et déplacement des vésicules COPII et COPI.

Une approche de type photo-blanchiment (ou GFP photo-activable (Patterson et Lippincott-Schwartz 2002)) permettrait aussi d'étudier *in vivo* le cycle d'activité GTPasique de ces protéines. En effet, si le temps d'association anticorps/antigène est assez grand (et si la fraction d'anticorps non-lié à l'antigène est assez réduite), il serait possible, par exemple dans le cas de Rab6, de photoblanchir (ou activer) le signal fluorescent au niveau de l'appareil de Golgi, des vésicules, ou du cytosol, et de déterminer les cinétiques de retour à l'équilibre. Ces cinétiques seraient celles du cycle GDP-GTP de Rab6 endogène *in vivo*. Ainsi, il serait possible de tester l'effet de la surexpression de Rab6 sur ce cycle, et de vérifier par exemple la prédiction mentionnée plus haut (paragraphe sur Rabs et tubes) que cette surexpression ralentit le cycle.

En conclusion, cette approche, de mise en œuvre à la fois peu coûteuse, rapide et reposant sur des techniques de base de biologie moléculaire, permet d'étudier très finement la fonction des protéines, en tenant compte de leur changement de conformation ou de modification par phosphorylation par exemple, en particulier *in vivo*.

¹¹⁰ obtenues par incubation de préparations golgiennes de foie de rat avec un cytosol de cellules HeLa traitées avec le Nocodazole

¹¹¹ ou type de molécule que l'on sait figer dans une conformation bien précise *in vitro*

IV. Annexe

Tout d'abord, j'inclus dans cette annexe l'article décrivant la protéine CLIPR59, apparentée à la famille des CLIPs, étude à laquelle j'ai participé en observant par microscopie de fluorescence *in vivo* simultanément les comportements de CLIPR59-GFP et de la sous-unité B de la toxine de Shiga (couplée au fluoropore Cy3), voir I.A.10.d.

Dans les pages suivantes, je présente le programme sous forme de Macro du logiciel NIH Image que j'ai écrit afin de quantifier le mouvement des intermédiaires de transport dans les enregistrements par microscopie de fluorescence de cellules vivantes (voir II.F.1.c.).

CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family

Franck Perez,¹ Karin Pernet-Gallay,¹ Clément Nizak,¹ Holly V. Goodson,² Thomas E. Kreis,³ and Bruno Goud¹

¹Institut Curie, CNRS UMR144, 75248 Paris, France

²University of Notre Dame, Department of Chemistry and Biochemistry, Notre Dame, IN 46556

³University of Geneva, Department of Cell Biology, 1211 Geneva 4, Switzerland

The microtubule cytoskeleton plays a fundamental role in cell organization and membrane traffic in higher eukaryotes. It is well established that molecular motors are involved in membrane–microtubule interactions, but it has also been proposed that nonmotor microtubule-binding (MTB) proteins known as CLIPs (cytoplasmic linker proteins) have basic roles in these processes. We report here the characterization of CLIPR-59, a CLIP-170–related protein localized to the trans-most part of the Golgi apparatus. CLIPR-59 contains an acidic region followed by three ankyrin-like repeats and two CLIP-170–related MTB motifs. We show that the 60–amino acid–long carboxy-terminal domain of CLIPR-59 is necessary and sufficient to achieve

Golgi targeting, which represents the first identification of a membrane targeting domain in a CLIP-170–related protein. The MTB domain of CLIPR-59 is functional because it localizes to microtubules when expressed as a fragment in HeLa cells. However, our results suggest that this domain is normally inhibited by the presence of adjacent domains, because neither full-length CLIPR-59 nor a CLIPR-59 mutant missing its membrane-targeting region localize to microtubules. Consistent with this observation, overexpression of CLIPR-59 does not affect the microtubule network. However, CLIPR-59 overexpression strongly perturbs early/recycling endosome–TGN dynamics, implicating CLIPR-59 in the regulation of this pathway.

Introduction

The cytoskeleton plays a fundamental role in cell organization. The microtubule network is particularly important in higher eukaryotes, determining organelle localization and regulating the exchange between membranous compartments (Cole and Lippincott-Schwartz, 1995; Schroer, 2000). In particular, it has long been known that microtubules are required for the acquisition and maintenance of Golgi complex localization and structure, which in fibroblastic cells normally consists of long stacks of cisternae juxtaposed to the microtubule organizing center (Thyberg et al., 1980; Ho et al., 1989; Cole et al., 1996; Tian et al., 1996; Kreis et al., 1997). The intrinsic asymmetry of microtubules is used by the cells to generate cytosolic polarity. The rapidly polymerizing microtubule plus ends generally point toward the cell periphery, whereas the more slowly polymerizing minus ends are associated with the microtubule organizing center. Steady-state organelle localizations are thought to result

mainly from a “balance of power” between the activity of plus end–directed kinesin family motors and minus end–directed dynein-related motors (Goodson et al., 1997), and this “equilibrium model” has been particularly well studied in the case of Golgi complex localization (Burkhardt, 1998).

Although these data might suggest that the steady-state localization of organelles like the Golgi complex relies only on the function of these microtubule-based motors, it has been suggested that membranous organelles can also interact with microtubules via nonmotor microtubule-binding (MTB)* proteins known as cytoplasmic linker proteins (CLIPs). One hypothesis suggests that these CLIPs promote the initial interaction of membranous organelles with microtubules and, once docking is achieved, may participate in the regulation of motor activity (Rickard and Kreis, 1996). CLIP-170 was the first characterized CLIP. *In vitro* experiments have shown that CLIP-170 is essential for efficient

The online version of this article includes supplemental material.

Address correspondence to Franck Perez, Institut Curie, CNRS UMR144, 26 rue d’Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France. Tel.: 33-14-234-6440. Fax: 33-14-234-6382. E-mail: franck.perez@curie.fr

Key words: microtubules; Golgi apparatus; trans-Golgi network; endocytosis; intracellular traffic

*Abbreviations used in this paper: CLIP, cytoplasmic linker protein; CLIPR, CLIP-related protein; E/P, glutamic acid and proline; GalT, β 1,4-galactosyltransferase; GFP, green fluorescent protein; GoLD, Golgi localization domain; LBPA, lyso-bis-phosphatidic acid; MTB, microtubule binding; Rh-Tf, rhodamine-labeled transferrin; STxB, Shiga toxin B subunit; TfR, transferrin receptor.

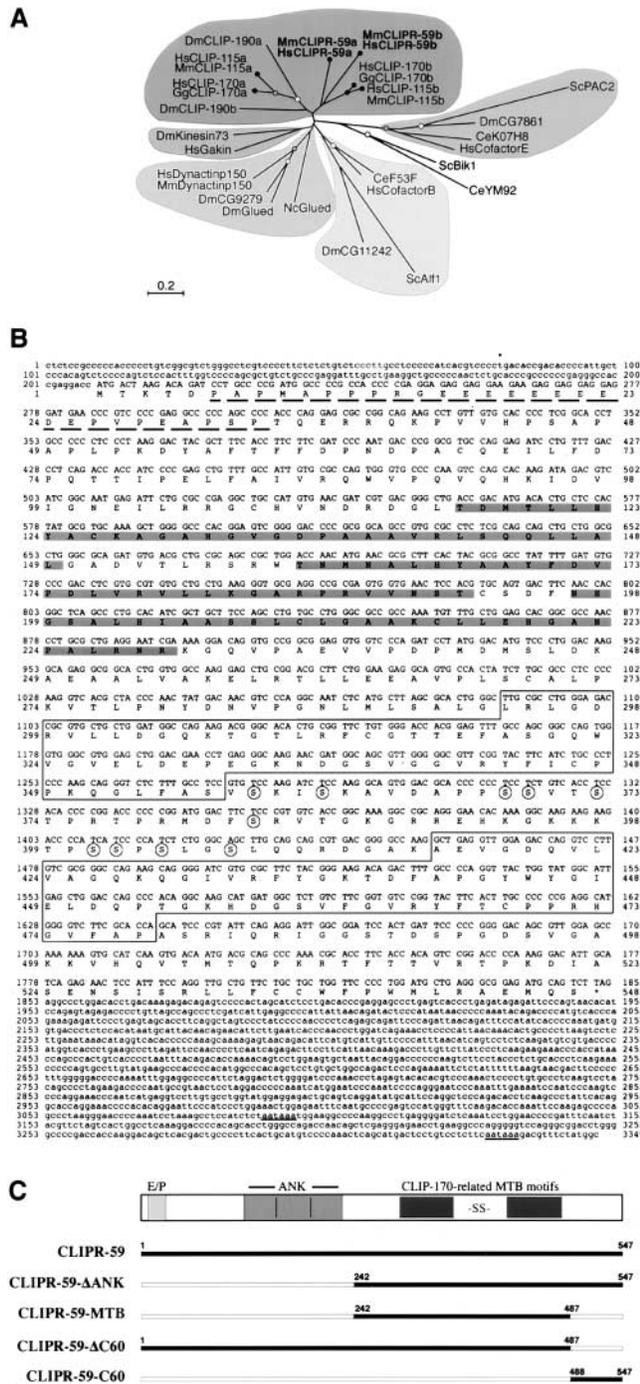


Figure 1. Identification of CLIPR-59, a new CLIP-170 family member. (A) Phylogenetic tree of the MTB motifs of CLIP-170-related proteins. A phylogenetic tree was generated by the neighbor joining method (as described in Online supplemental material) after using ClustalX to align the MTB motifs of CLIP-170-related proteins. Confidence in the sequence groupings was estimated by bootstrap analysis (black circle, groupings found in >90% of trials; gray circle, 75%; white circle, 50%). This bootstrap analysis showed that the new protein identified (CLIPR-59, containing two MTB motifs “a” and “b”) did not strongly cluster with any previously characterized subfamilies, i.e., the CLIP-170, glued, cofactor B, or cofactor E subfamilies. (B) Cloning of CLIPR-59. CLIPR-59 cDNA contains an open reading frame coding for a protein of 547 amino acids (59.5 kD). Inspection of this sequence identifies an in-frame stop (asterisk) upstream from the first ATG and two polyadenylation signals at the

binding of endocytic carrier vesicles to microtubules (Rickard and Kreis, 1990; Pierre et al., 1992), whereas experiments in vivo have suggested that CLIP-170 interacts, directly or indirectly, with the dynein regulator dynactin complex (Valetti et al., 1999; Vaughan et al., 1999).

CLIP-170 is an elongated homodimeric protein bearing an amino-terminal MTB domain. The MTB domain allows CLIP-170 to interact in a particular way with microtubules because it is specifically and dynamically localized at the plus extremity of growing microtubules (Pierre et al., 1992; Perez et al., 1999), probably through a rapid association with polymerizing tubulin subunits (Diamantopoulos et al., 1999). The MTB domain of CLIP-170 contains two repeats of an MTB motif (referred to as the CAP-GLY motif in the PROSITE database) found in other tubulin-interacting proteins (Pierre et al., 1992). The family of proteins containing this motif includes other proteins that may be functionally considered to be CLIPs. Notably, one of the subunits of the dynactin complex, p150^{glued}, contains a CLIP-170-related MTB domain (Swaroop et al., 1987; Holzbaur et al., 1991). A close relative of CLIP-170, CLIP-115, has been localized in neurons on dendritic lamellar bodies (De Zeeuw et al., 1997), and a CLIP-170 homologue in *Drosophila*, CLIP-190, has been localized on Golgi membranes (Sisson et al., 2000). Another yet unidentified CLIP-170-related protein is involved in the interaction of peroxysomes with microtubules in vitro (Thiemann et al., 2000).

Not all CLIPs are related to CLIP-170, as exemplified by CLIMP63 (Klopfenstein et al., 1998), an integral membrane protein that links ER membranes to microtubules. A number of other proteins, including the Golgi microtubule-associated protein GMAP-210 (Infante et al., 1999), have also been implicated in membrane-microtubule interactions. However, it is attractive to speculate that the CLIP-170 family contains additional CLIPs. We thus systematically analyzed sequence databases to identify new members of the CLIP family (HVG, FP, and TK in preparation). We report here the cloning and characterization of a 59.5-kD member of this family, CLIPR-59 (CLIP-170-related protein of 59 kD). Like CLIP-170, CLIPR-59 contains two MTB motifs separated by a serine-rich region. Three ankyrin-like repeats and an acidic domain are present amino-terminal to the CLIP domain, whereas the carboxy-terminal region is not strongly related to any protein in the databases. We show that in HeLa cells, CLIPR-59 is localized to Golgi-like structures, most likely related to the TGN, and the carboxy-terminal 60 amino acids are necessary

end of the 3' untranslated region. A region rich in glutamic acid and proline (underlined) is present in the amino-terminal part of CLIPR-59, followed by three ankyrin-like repeats (grayed). The two CLIP domains (boxed) are present in the second half of the protein, separated by a serine-rich region (the 10 serines are circled). (C) Summary and nomenclature of the CLIPR-59 deletion mutants used in this study. The structure of CLIPR-59 is schematized at the top, and the black lines underneath represent the portion of CLIPR-59 retained in the respective deletion mutants. Numbers indicate the position of the first and last amino acid in the deletion construct relative to full-length CLIPR-59. All the constructs were tagged amino terminally with either an HA or a GFP tag. The sequence of human CLIPR-59 cDNA is available from Genbank/EMBL/DDJB under accession no. AJ427922.

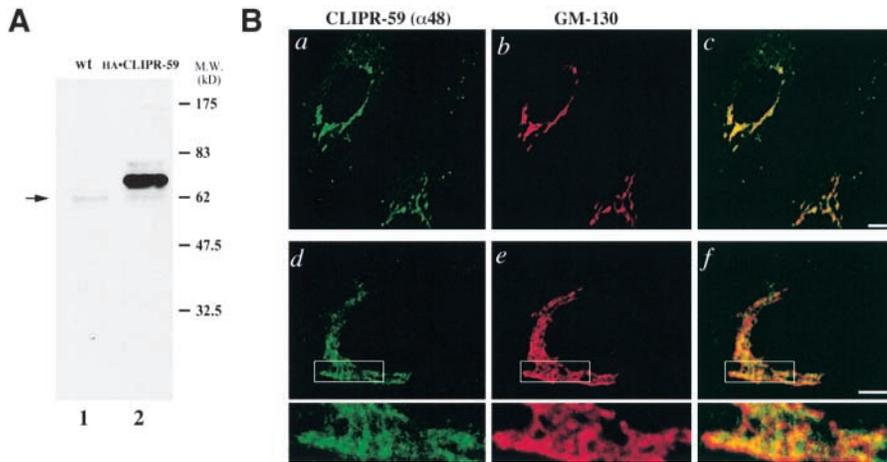


Figure 2. CLIPR-59 is localized on Golgi-like structures. An antibody directed against recombinant CLIPR-59 was raised in rabbit ($\alpha 48$) and affinity purified. (A) Western blot analysis showed that $\alpha 48$ detects a faint band at 60 kD (indicated by the arrow) in wild-type HeLa cells (lane 1). In HeLa cells transfected with a plasmid coding for HA-tagged CLIPR-59, $\alpha 48$ detects a strong additional band at a higher molecular weight (lane 2). (B) HeLa cells were fixed in paraformaldehyde and processed for immunofluorescence using the $\alpha 48$ antibody (green; a and d) together with a monoclonal anti-GM-130 antibody (red; b and e) to stain the Golgi complex. Two examples of images

acquired by confocal microscopy are shown (a–c and d–f), indicating that the $\alpha 48$ antibody stains the same reticular structure as the anti-GM-130 antibody, hence it is likely to be the Golgi complex. It should be noted that although the colocalization between CLIPR-59 and GM-130 is extensive, it is not perfect, as is particularly visible on the boxed area shown enlarged underneath c–f. Bars, 10 μ m.

and sufficient for this localization. We further show that the activity of the MTB motifs of CLIPR-59 is regulated in vivo by the adjacent domains, preventing cytoskeletal rearrangement upon overexpression. In contrast, major reorganization and perturbation of TGN/endosomal compartments, together with alteration of retrograde transport, can be observed in these overexpression conditions. Altogether, these data suggest that CLIPR-59 is a TGN CLIP involved in early endosome–TGN dynamics.

Results

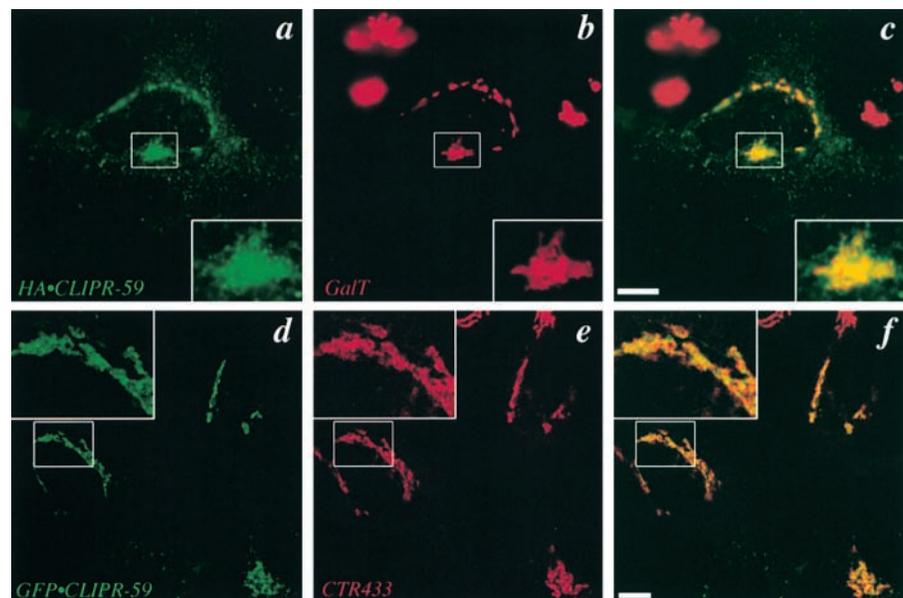
CLIPR-59 is a new CLIP-170-related protein localized to Golgi structures

We used the CLIP-170 MTB motifs to search the sequence databases for the family of proteins related to CLIP-170. Two sequences (ESTH2 and ESTH4) grouped with each other at a moderate confidence level, suggesting that they might encode related proteins, but did not group with any other known

CLIP-170-related protein (Fig. 1 A). The ESTH4 sequence was chosen for further analysis. Corresponding cDNA clones were obtained from the IMAGE consortium and, with the help of RT-PCR, we reconstructed a full-length clone of the 3.4-kb cDNA (Fig. 1 B). The corresponding gene, localized on chromosome 19q13, has been sequenced by the human sequencing project and found to be spliced in 14 exons spanning 17 kb. The open reading frame codes for a 59.5-kD protein that we call CLIPR-59. Because the nomenclature is very confusing in the CLIP field, we propose that the name “CLIPR” may only be given to proteins possessing at least one CLIP-170-related MTB motif. CLIPR-59 is expressed in many different tissues as indicated by EST database analysis (see Unigene Cluster hs.7357). Northern blot analysis confirmed the presence of CLIPR-59 mRNA in various tissues, although we observed that expression in the brain is particularly high (unpublished data).

Schematically, CLIPR-59 possesses a four-domain structure (Fig. 1, B and C). The amino terminus contains an

Figure 3. Transfected HA- and GFP-tagged CLIPR-59 localize to Golgi-like structures. (A) HeLa cells were transiently transfected for 36 h with a plasmid coding for HA•CLIPR-59 (a–c), or stably transfected with GFP•CLIPR-59 (d–f), and fixed in paraformaldehyde. Immunofluorescence was then performed using a mixture of monoclonal anti-HA antibody (green; a and c) together with a polyclonal anti-GaT (red; b and c), or using the natural green fluorescence of the GFP tag (green; d and f) and the CTR433 anti-Golgi antibody (red; e and f). Both HA- and GFP-tagged CLIPR-59 are targeted to Golgi-like structures. Careful examination of the overlaid images (c and f) shows that the colocalization is only partial with the different Golgi markers used. Bars, 10 μ m.



acidic region rich in glutamic acid and proline (E/P region) followed by three ankyrin-like repeats (ANK domain). The second half of the protein contains the two CLIP-170-related MTB motifs separated, as is the case in CLIP-170, by a serine-rich region. Finally, the carboxy-terminal region following the two MTB motifs shows no significant similarity to any protein in the databases.

We raised anti-CLIPR-59 antibodies in rabbits, and Western blot analysis using affinity-purified anti-48 antibody (Fig. 2 A) showed that this antibody detects a faint band at around 60 kD in HeLa cell extracts. An additional stronger band is detected in the extract of cells transfected with HA•CLIPR-59 (also detected by an anti-HA antibody; unpublished data). Immunofluorescence experiments showed that anti-48 stains a Golgi-like structure (Fig. 2 B), although careful analysis suggested that it only partially colocalizes with the *cis*/medial marker GM-130. This staining was obtained in nontransfected HeLa cells only upon long antibody incubation time and was much stronger after transfection of tagged or untagged CLIPR-59 (unpublished data), further suggesting that CLIPR-59 is only weakly expressed in HeLa cells. Immunofluorescence analysis of HeLa cells transiently expressing HA•CLIPR-59 (Fig. 3, a–c) or stably expressing green fluorescent protein (GFP)•CLIPR-59 (Fig. 3, d–f) showed that the recombinant proteins localized to Golgi-like structures very similar to the structures stained by the anti-48 antibodies in untransfected HeLa cells. Similarly, the colocalization was only partial with the different Golgi markers tested so far (CTR433, GM-130, mannosidase II, galactosyltransferase, TGN46; Figs. 3 and 5, and unpublished data).

We further analyzed CLIPR-59 localization by immunogold labeling of cryosections of HeLa cells transiently or stably expressing GFP•CLIPR-59 (Fig. 4). In agreement with our immunofluorescence data, GFP•CLIPR-59 was detected on Golgi stacks as well as on tubulovesicular elements juxtaposed to Golgi cisternae. Colabeling experiments indicated that GFP•CLIPR-59 was localized on the same side of Golgi stacks as galactosyltransferase. This suggests that CLIPR-59 is localized to membranes of the trans-Golgi/TGN.

Golgi and microtubule localization domains of CLIPR-59

Thus far, no membrane-targeting domains have been characterized in proteins of the CLIP-170 family. Therefore, we were particularly interested in studying the regions of CLIPR-59 responsible for membrane targeting. Deletion of the ankyrin repeat-containing amino terminus (CLIPR-59- Δ ANK) had no effect on the subcellular localization of the expressed protein (Fig. 5 b). In contrast, the deletion of the last 60 amino acids of CLIPR-59 was sufficient to completely abolish Golgi targeting (Fig. 5 c). This 60-amino acid domain is not only necessary but sufficient for Golgi targeting because the HA-tagged (and GFP-tagged, unpublished data) carboxy-terminal domain of CLIPR-59 efficiently localized to the Golgi (Fig. 5 d). This indicates that the carboxy terminus of CLIPR-59 is a Golgi localization domain (GoLD), but its sequence is different from previously described GoLDs (see Discussion).

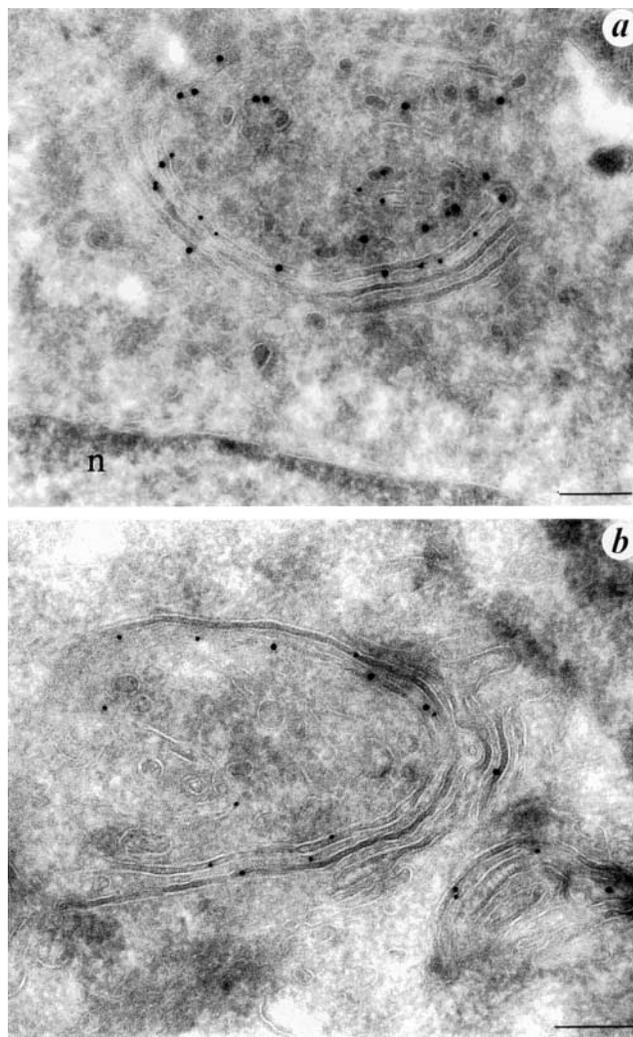


Figure 4. GFP-tagged CLIPR-59 localizes to the trans-Golgi/TGN. Cells transiently (a) or stably (b) transfected with GFP•CLIPR-59 were fixed by glutaraldehyde and processed for cryoelectron microscopy. Cryosections were labeled using an anti-GFP antibody and an anti-GalT antibody revealed with protein-A coupled to 15- or 10-nm gold particles, respectively. Electron microscopic observation confirmed that GFP•CLIPR-59 is targeted to membranous structures colocalized or juxtaposed to GalT-positive Golgi cisternae, indicating that CLIPR-59 is predominantly localized to the trans-most part of the Golgi complex. Bars, 200 nm.

Although CLIPR-59 possesses two MTB motifs highly related to those of CLIP-170, neither endogenous nor recombinant CLIPR-59 was observed to localize to microtubules, and overexpression of CLIPR-59 had no discernible effect on the microtubule cytoskeleton. This was unexpected because constructs containing the MTB motifs of CLIP-170 localize to microtubules and provoke microtubule bundling upon overexpression (Pierre et al., 1994). A possible explanation was that the GoLD signal of CLIPR-59 was dominant to the MTB domain, precluding quantitative microtubule localization of CLIPR-59. We thus tried to reveal microtubule binding of the cytosolic mutant CLIPR-59- Δ C60 by preextracting the cells with Triton X-100 before fixation (Fig. 6). Under these conditions, full-length GFP-

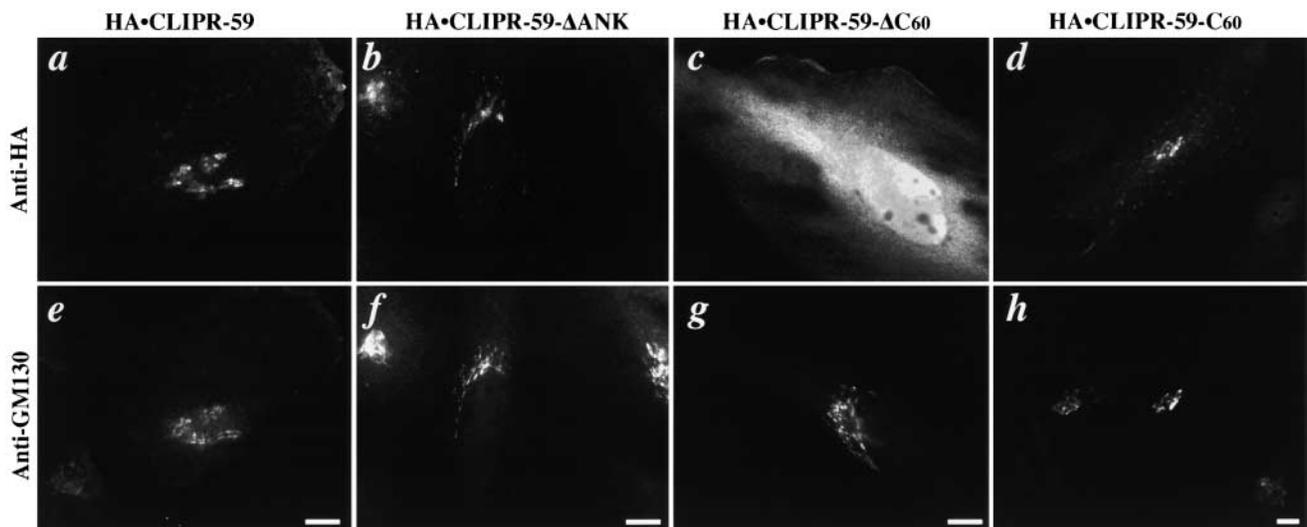


Figure 5. The carboxy-terminal 60 amino acids of CLIPR-59 are necessary and sufficient for Golgi targeting. HeLa cells were transfected with plasmids coding for HA-tagged full-length CLIPR-59 (a and e), or one of the following deletion mutants: HA-tagged CLIPR-59 missing its amino-terminal, ankyrin repeat-containing domain (b and f) or CLIPR-59 missing its carboxy-terminal 60 amino acids (c and g). Alternatively, a construct encompassing only these 60 amino acids fused to the HA tag was transfected (d and h). Cells were fixed 36 h later in paraformaldehyde and processed for immunofluorescence using a monoclonal anti-HA antibody (a–d) together with a polyclonal anti-GM-130 antibody (e–h). These experiments showed that the amino-terminal half of CLIPR-59 is dispensable for proper Golgi targeting, whereas the carboxy-terminal 60 amino acids are required. This carboxy-terminal domain is not only necessary but sufficient to achieve Golgi targeting, and thus represents a novel GoLD. Bars, 10 μ m.

tagged CLIPR-59 stained central structures, and no significant microtubule localization could be observed (Fig. 6, a–c). As expected, GFP•CLIPR-59– Δ C60 was dispersed in the cytosol but still did not show extensive microtubule localization (Fig. 6, d–f). However, upon closer examination, it was

clear that the GFP•CLIPR-59– Δ C60 faintly stained some filamentous structures that were colocalized with microtubules (Fig. 6, arrowheads). This observation suggested that CLIPR-59 devoid of GoLD can bind microtubules in vivo. However, the apparent weakness of this association sug-

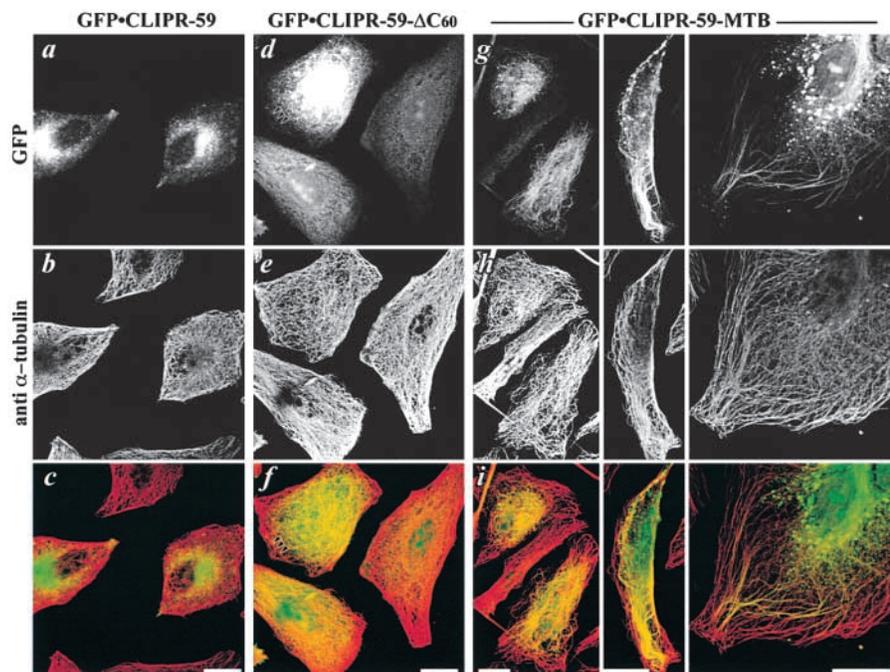


Figure 6. Microtubule association of the CLIPR-59 CLIP domain is inhibited by the ankyrin repeat-containing region together with the GoLD. HeLa cells were transfected with plasmids coding for GFP•CLIPR-59 (a–c), GFP•CLIPR-59– Δ C60 (d–f), or the GFP-tagged CLIP domain (GFP•CLIPR-59–MTB; g–i). 24 h later, cells were preextracted in 0.5% Triton X-100 and fixed in methanol before being processed for immunofluorescence. Transfected proteins were detected using the natural fluorescence of GFP (a, d, and g), whereas microtubules were stained using a monoclonal anti- α -tubulin antibody followed by Texas red anti-mouse secondary antibody (b, e, and h). Images were acquired by confocal microscopy and the overlay of the green and red channels is shown in the bottom pictures (c, f, and i). We observed no clear microtubule labeling for full-length CLIPR-59 and only a very faint microtubule staining can be observed for CLIPR-59– Δ C60 (arrowheads). In contrast, clear microtubule labeling could be observed when the

CLIP domain was expressed fused to GFP (three different fields are shown in g–i). Bundling of microtubules can even be observed upon CLIPR-59 MTB overexpression, in a dose-dependent manner. It is also worth pointing out that only a subfraction of microtubules seems to be recognized by the CLIPR-59 MTB domain. Note that the bright fluorescent spots observed upon GFP•CLIPR-59–MTB expression were not seen using the HA-tagged version of this protein and are likely due to nonspecific precipitation. Bars, 20 μ m.

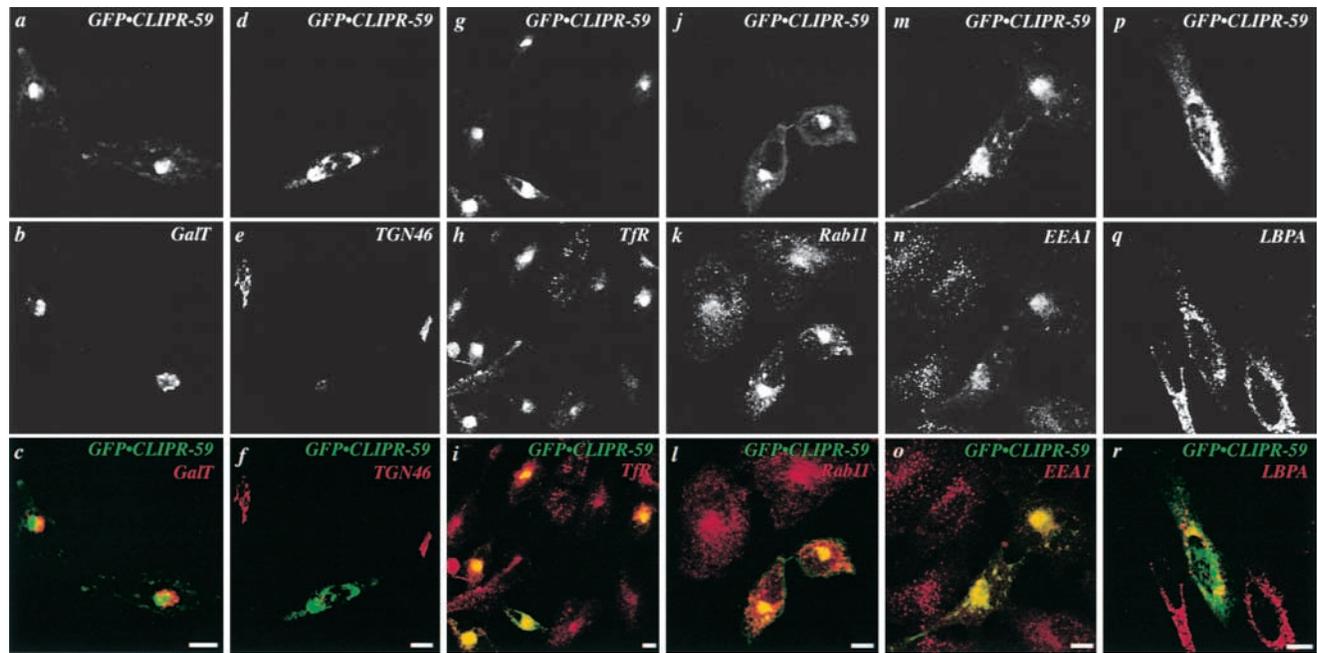


Figure 7. Overexpressed CLIPR-59 does not localize to the Golgi complex and perturbs early endosome/TGN compartments. (A) HeLa cells were transfected with GFP•CLIPR-59 (green; a, d, g, j, and m), fixed in paraformaldehyde 36 h later, and processed for immunofluorescence. Cells were stained with antibodies directed against GalT (a–c), TGN46 (d–f), TfR (g–i), Rab11 (j–l), EEA1 (m–o), or LBPA (p–r) followed by Texas red–labeled secondary antibodies, and images were acquired by confocal microscopy. The bottom panels show the overlaid images. Strong overexpression of CLIPR-59 leads to a segregation between CLIPR-59 and Golgi staining. In these conditions, the labeling for TGN46 is strongly reduced and TfR- and Rab11-positive membranes coaccumulate with CLIPR-59 at the center of the cells. EEA1-positive early endosomes also tend to coaccumulate with CLIPR-59, although EEA1 staining seems more diffuse. In contrast, no significant effect is observed on late endosomes/lysosomes. Bars, 10 μ m.

gested that the amino terminus containing the E/P domain and the ankyrin repeats might also be inhibitory. To test this hypothesis, we expressed in HeLa cells the GFP-tagged CLIPR-59 MTB domain and observed under the same conditions as above. GFP•CLIPR-59–MTB (or HA•CLIPR-59–MTB, unpublished data) showed comparatively strong microtubule binding (Fig. 6, g–i). Indeed, this construct was even able to induce microtubule bundling upon overexpression, in a dose-dependent manner. Careful examination revealed that the colocalization between GFP•CLIPR-59–MTB and microtubules was only partial. This suggests that only a subset of microtubules are recognized by CLIPR-59. Similar behavior had already been described for CLIP-170 (Pierre et al., 1992; Diamantopoulos et al., 1999; Perez et al., 1999).

Overexpression of CLIPR-59 affects membrane dynamics of early endosome and TGN membranes

We noticed that high overexpression of full-length CLIPR-59 often resulted in loss of colocalization between the CLIPR-59 proteins and Golgi markers. In as many as 35% of transfected cells (depending on length and efficiency of transfection), overexpressed CLIPR-59 accumulated in one or more discrete locations, usually juxtaposed to Golgi membranes (Fig. 7, a–c). Because immunoelectron microscopy indicated that CLIPR-59 localizes to the trans/TGN part of the Golgi, we tested the localization of the TGN marker TGN46 under these conditions. We observed that CLIPR-59 overexpression leads to reduced TGN46 stain-

ing in the Golgi region (Fig. 7, d–f; see also Fig. 10 A). The steady-state localization of TGN46 results from active recycling between the plasma membrane, early/recycling endosomes, and the TGN. It was thus interesting to check the localization of other markers in this pathway. We found that the localization of both transferrin receptor (TfR, a marker of early/recycling endosomes) and Rab11 (a marker of the recycling endosome) was strongly perturbed. Moreover, we observed extensive colocalization of TfR- and Rab11-positive membranes with juxtannuclear CLIPR-59 aggregates (Fig. 7, g–l). Similarly, we found that the punctiform early endosomes positive for EEA1 were depleted from the cell periphery and coaccumulated with CLIPR-59, although EEA1 staining seemed more diffuse than that of Rab11 or TfR (Fig. 7, m–o). In the same conditions, we observed no significant effect on the localization of lyso-bis-phosphatidic acid (LBPA)–containing late endosomes or lysosomes (Fig. 7, p–r), or on the localization of cation-independent mannose-6-phosphate receptor (unpublished data). In agreement with our previous experiments (Fig. 6), no effect on microtubule organization could be observed under these conditions. It is also worth noting that CLIPR-59 lacking the GoLD does not affect TGN/endosome localization (unpublished data).

Immunoelectron microscopy confirmed the presence of accumulated, CLIPR-59–positive, vesicular membranes in a juxta-Golgi location (Fig. 8 a). These tubulo-vesicular membranes were densely packed and not homogenous in size (Fig. 8, b and c). It is worth noting that some of the vesicu-

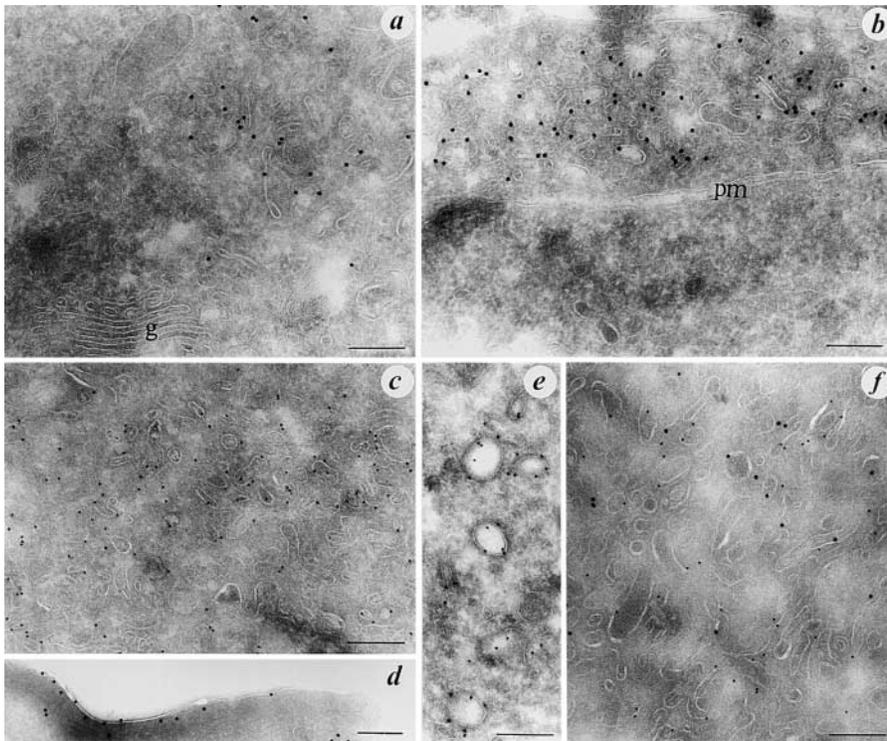


Figure 8. Overexpression of CLIPR-59 leads to endosome-like membrane aggregation in a peri-Golgi region, as observed by immunoelectron microscopy.

Cells were transfected and processed for immunocryoelectron microscopy using anti-GFP to stain for overexpressed GFP•CLIPR-59. As observed by immunofluorescence, electron microscopic observation shows that GFP•CLIPR-59 overexpression leads to accumulation of endosome-like membranes in a peri-Golgi region (a). Under these conditions, CLIPR-59 does not stain Golgi cisternae but is found on the aggregated membranes. These CLIPR-59-positive membranes have many sizes and shapes, and are reminiscent of early endosomes present in nontransfected control cells (b and c). Plasma membrane staining is sometimes visible (d), and some coated structures can also be seen in these vesicular clusters (e). In agreement with immunofluorescence data, TfR-positive membranes (15-nm gold) coaccumulate with CLIPR-59-positive membranes (10-nm gold) in overexpressing cells (f). g, Golgi complex; pm, plasma membrane. Bars, 200 nm.

lar structures present in these membrane clusters appeared to be coated (Fig. 8 e), although more work is necessary to address the nature of this coat and the frequency of such a coating. We noticed that overexpression sometimes led to plasma membrane staining (Fig. 8 d), which was also observed by immunofluorescence (unpublished data). Finally, in agreement with our immunofluorescence data, immunoelectron microscopic analysis showed that TfR-positive vesicular membranes were present in these aggregated membranes (Fig. 8 f).

Because CLIPR-59 overexpression altered the localization of early and recycling endosomes, we tested whether these aggregated endosomes were still functional in internalizing rhodamine-labeled transferrin (Rh-Tf). We found that transferrin could be actively endocytosed by GFP•CLIPR-59-transfected cells. As observed before for its receptor, the localization of endocytosed transferrin was altered in overexpressing cells. Under the same conditions, endocytosed α 2-macroglobulin was still transported to late endosomes/lysosomes and did not reach the CLIPR-59-positive aggregated membranes (unpublished data). Internalized transferrin was transported to the center of the cells where it extensively, although not perfectly, colocalized with GFP•CLIPR-59 (Fig. 9 A). In agreement with the observed depletion of the punctiform EEA1-positive structures from the cell periphery, fewer Rh-Tf-positive peripheral endosomes were present. In comparison, no effect of GFP•CLIPR-59- Δ C60 on internalized transferrin localization could be detected (Fig. 9 A).

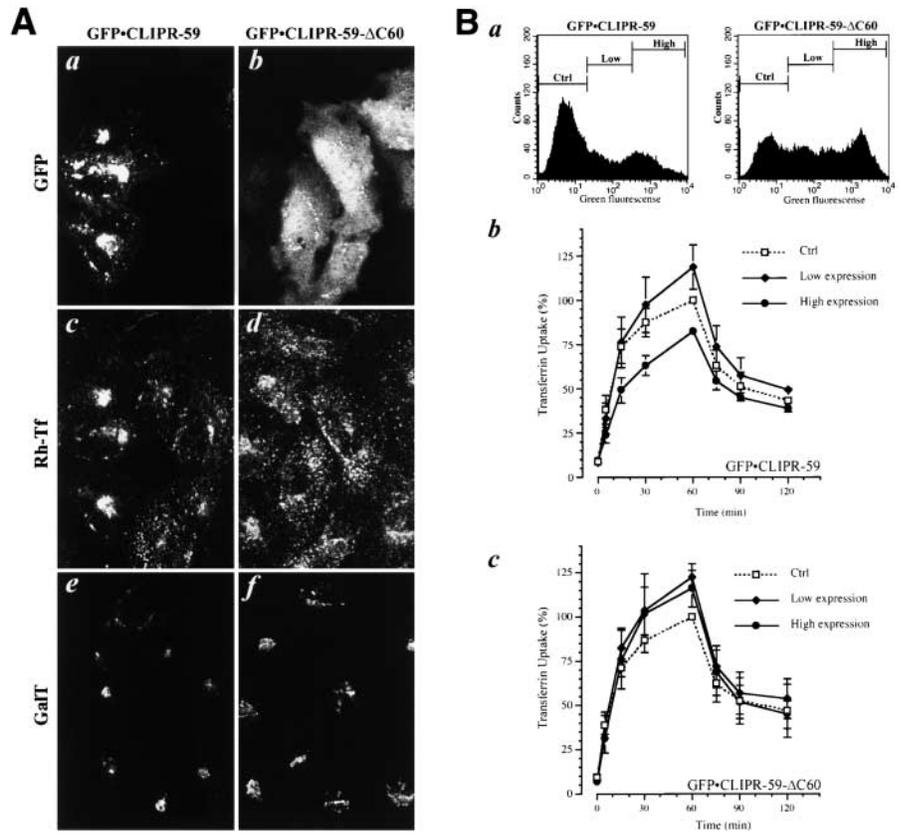
We then quantified the effect of CLIPR-59 overexpression on transferrin uptake and recycling. Because only cells strongly overexpressing CLIPR-59 showed the aggregation phenotype, we had to devise a way to measure the kinetics of transferrin endocytosis in the population of moderate and

strong overexpressing cells, respectively. We used FACS[®] analysis to this end, measuring in parallel the green fluorescence of transfected GFP-tagged protein and the red fluorescence of internalized transferrin. Three windows were defined, corresponding to control, low, or high levels of green fluorescence (Fig. 9 B, a), and the kinetics of transferrin endocytosis and recycling were measured (Fig. 9 B, b and c). In agreement with immunofluorescence data, we observed that cells strongly overexpressing CLIPR-59 were still able to internalize transferrin. However, we also observed, in these high overexpressors, a reproducible reduction of transferrin uptake (80% of control) whereas the kinetics of transferrin release were not affected. This could indicate a reduction in the motility of early endosomes or in the pool of endosomes participating in transferrin endocytosis. No such reduction was observed for low level GFP•CLIPR-59 expression. Indeed, both low levels of GFP•CLIPR-59 expression and any level of GFP•CLIPR-59- Δ C60 expression led to a slight increase in transferrin internalization. This observation may indicate that the normal function of CLIPR-59 is to accelerate the rate of internalization, and the CLIPR-59- Δ C60 mutant titrates out a negative regulator of endogenous CLIPR-59.

Immunofluorescence data (Fig. 6) suggested that not only early endosomes, but also the TGN was affected by CLIPR-59 overexpression. Triple staining immunofluorescence analysis of CLIPR-59-overexpressing cells (Fig. 10 A) indicated that cells with accumulated TfR-positive membranes also had reduced TGN46 labeling. In comparison, β 1,4-galactosyltransferase (GalT) staining was much less affected. We thus conducted uptake experiments to test whether the TGN46 pathway, from plasma membrane to early endosomes and the TGN, still occurs in cells overexpressing CLIPR-59. We used a well-known and easy to follow marker of this pathway, the B

Figure 9. Endocytosed transferrin is transported to aggregated early endosomes in cells overexpressing GFP•CLIPR-59 with slightly slower kinetics. (A) HeLa cells were transfected with plasmids encoding GFP•CLIPR-59 (A and B, left panels) or, as a control, CLIPR-59-ΔC60 (right panels). 36 h after transfection, cells were incubated either with 25 μg/ml Rh-Tf (A) for 90 min at 37°C. Cells were then washed with medium and fixed with paraformaldehyde before being processed for immunofluorescence using a polyclonal anti-GaIT antibody followed by a Cy5-labeled anti-rabbit antibody. Note that aggregated early/recycling endosomes obtained upon overexpression of CLIPR-59 are still accessible to internalized transferrin even though fewer peripheral early endosomes are visible than in control conditions. (B) Cells were transfected as in A, scraped, pelleted, and resuspended in Alexa633-Tf-containing medium. Internalization and recycling of transferrin was then measured by FACS[®] as described in the Materials and methods. The kinetics of transferrin uptake and release were quantified in three different cell populations that were defined according to cell green fluorescence (Control [Ctrl], Low, and High).

The mean Alexa633-Tf fluorescence was then calculated for the three populations and expressed as a percentage of the fluorescence obtained in the control cell population after 60 min of internalization. The plots represent the means ± SEM of four independent experiments. Cells strongly overexpressing CLIPR-59 are still able to internalize and recycle transferrin but with slightly reduced kinetics (b, High). In contrast, no such reduction was observed in cells moderately expressing CLIPR-59 (b, Low) or expressing CLIPR-59-ΔC60 at low and high levels (c). In these conditions, we instead observed increased transferrin endocytosis.



subunit of the Shiga toxin (STxB). STxB is transported from the plasma membrane to the TGN via early/recycling endosomes (Wilcke et al., 2000). GFP•CLIPR-59-transfected cells were incubated with fluorescently labeled STxB for 90 min at 37°C, and the localizations of endocytosed STxB, GFP•CLIPR-59, and the Golgi complex were analyzed (Fig. 10 B). Cells transfected with GFP•CLIPR-59-ΔC60 transported STxB to the Golgi complex normally. In contrast, although mild GFP•CLIPR-59 overexpression did not perturb STxB transport, cells strongly overexpressing GFP•CLIPR-59 showed a reduced ability to transport the endocytosed STxB to the Golgi complex. Interestingly, the colocalization of STxB with CLIPR-59 was clear at the cell periphery but far less at the cell center, suggesting that STxB might be blocked in the prerecycling endosomal compartment.

Because only strong overexpression led to perturbation of STxB transport, we were unable to directly quantify this effect. To further document the interaction between the CLIPR-59-sensitive pathway and the pathways followed by STxB and transferrin, we followed GFP•CLIPR-59 and fluorescent endocytosis markers in living cells (unpublished data). These experiments revealed that although GFP•CLIPR-59 does not colocalize with either endocytosed transferrin or STxB, it is “dynamically juxtaposed” with these markers, moving beside them in the cytoplasm without apparent mixing. This observation suggests that the two

target compartments somehow interact during transportation and/or sorting steps.

Discussion

CLIPR-59 is a new Golgi CLIP from the CLIP-170 family

We have identified a new member of the CLIP-170 family that behaves as a cytoplasmic linker protein involved in the TGN-endosome dynamics. The structure of CLIPR-59 differs notably from that of the other CLIPs from the CLIP-170 family because it has its MTB motifs near the carboxy terminus, has no identifiable coiled-coil region, and possesses three ankyrin-like repeats. The function of the CLIPR-59 ankyrin repeats is unknown, but it has generally been observed that ankyrin repeats form exposed domains involved in protein-protein interactions (Michaely and Bennett, 1992; Gorina and Pavletich, 1996). It is thus attractive to propose that the CLIPR-59 ankyrin domain mediates interaction with other proteins, although it could also be a regulatory domain (see below).

The localization of CLIPR-59 is also unusual for the CLIP-170 family. Both endogenous and recombinant CLIPR-59 are localized on Golgi membranes in vivo, and not on microtubules. In contrast, although association of CLIP-170, CLIP-115, or p150^{glued} (as part of the dynactin complex) has been documented on various cellular organelles (Pierre et al., 1992; De Zeeuw et al., 1997; Haber-

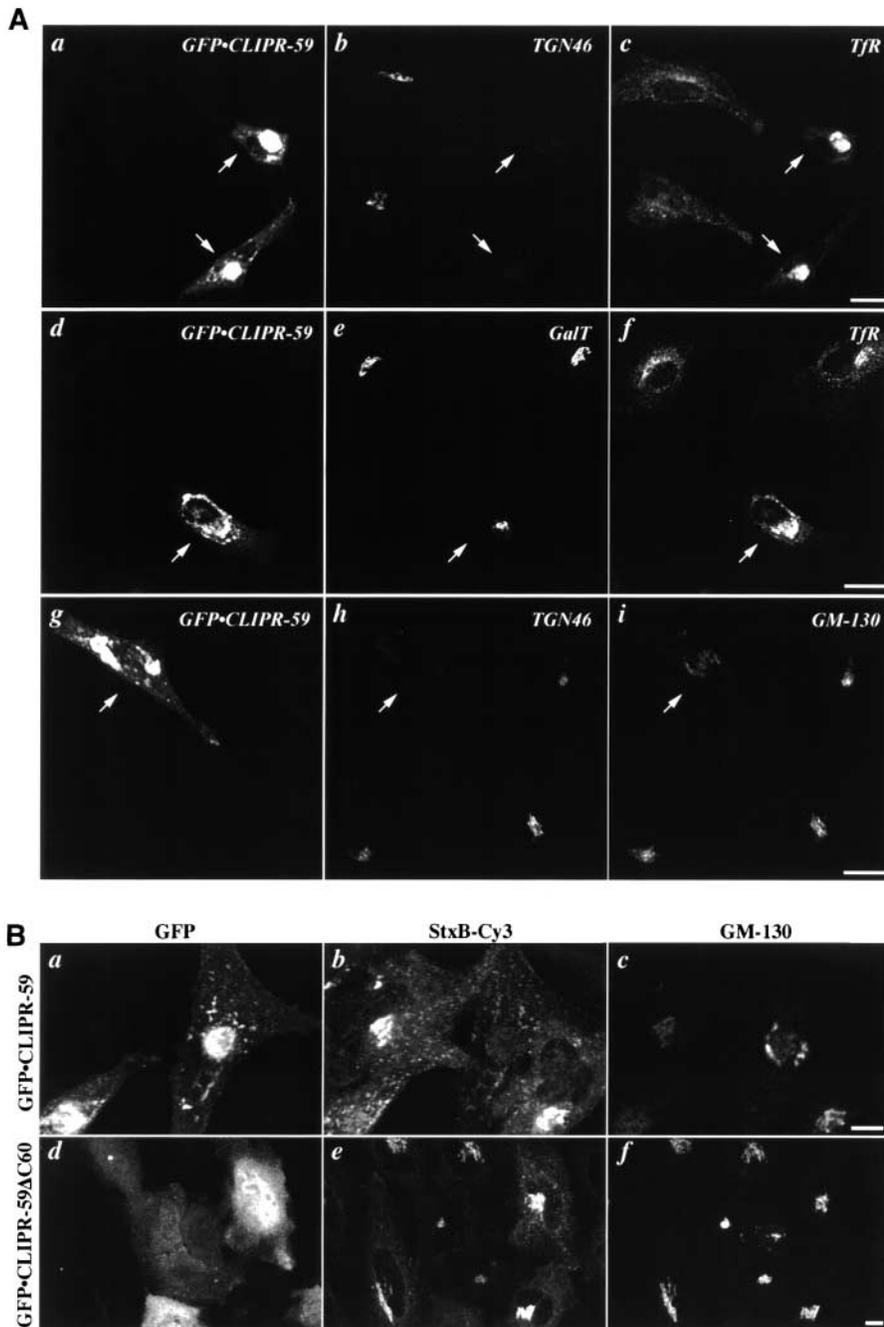


Figure 10. Overexpression of CLIPR-59 perturbs the TGN46-STxB pathway.

HeLa cells were transfected as in Fig. 8 and either fixed and processed for immunofluorescence (A) or incubated with 10 $\mu\text{g/ml}$ STxB-Cy3 (B) for 90 min at 37°C. (A) Triple staining of HeLa cells overexpressing GFP•CLIPR-59 shows that in conditions where CLIPR-59 coaccumulates with TfR-positive early endomes, the TGN46 staining is strongly reduced (a–c), whereas the Golgi complex, detected by the GalT marker, seems unaffected (d–f). Indeed, some cells lose nearly all TGN46 staining while retaining essentially normal GM-130 staining (g–i). Bars, 20 μm . (B) Strong overexpression of CLIPR-59 perturbs STxB-Cy3 transport to the Golgi complex. Both nontransfected cells and cells overexpressing CLIPR-59- ΔC60 transport STxB-Cy3 to the Golgi complex efficiently, however, cells strongly expressing GFP•CLIPR-59 retain STxB-Cy3 in the cell periphery. Note that STxB-Cy3 is not accumulated in the central CLIPR-59 aggregate, although it colocalizes to some extent with peripheral CLIPR-59 aggregates. Bars, 10 μm .

mann et al., 2001), exogenous expression of these proteins systematically leads to microtubule targeting and not to membrane association. CLIPR-59 is the first member of this linker family for which a membrane localization domain has been identified.

CLIPR-59 possesses a new GoLD and a down-regulated CLIP domain

Whereas other ankyrin repeat-containing proteins are targeted to intracellular membranes (for review see Michaely and Bennett, 1993; De Matteis and Morrow, 2000), the CLIPR-59 ankyrin repeats are not involved in targeting to the Golgi complex. We directly demonstrate that the carboxy-terminal 60 amino acids of CLIPR-59 encode the GoLD of the protein. This domain, which is both necessary and sufficient for

addressing a cytosolic protein to the Golgi complex (most likely to the trans-Golgi/TGN), does not show any strong conservation with already described GoLDs. In particular, no similarity could be detected to the GRIP domains present in certain golgins (Barr, 1999; Kjer-Nielsen et al., 1999; Munro and Nichols, 1999). The CLIPR-59 GoLD thus represents a new GoLD, and we will now mutagenize it to dissect the molecular basis of its targeting activity.

Also particular to CLIPR-59 is its apparent lack of interaction with microtubules. Neither endogenous nor transfected CLIPR-59 localized to microtubules in tissue culture cells. Moreover, overexpression of CLIPR-59 failed to obviously alter the microtubule network. This failure is in marked contrast to CLIP-170 and many other MTB proteins, which induce microtubule bundling upon overexpression.

It should be noted that we did observe cosedimentation of in vitro–translated CLIPR-59 with taxol-stabilized microtubules in vitro (unpublished data). However, this type of experiment is prone to artifacts, and sedimentation was still observed when the CLIP domain was removed.

Finally, deletion experiments demonstrated that both the amino-terminal region and the membrane-targeting domain of CLIPR-59 inhibit microtubule association. The isolated CLIP domain did indeed behave as a MTB domain, eventually bundling microtubules upon overexpression. Careful analysis of immunofluorescence data suggested that the MTB domain of CLIPR-59 differentially recognized a subset of microtubules, but more experiments are necessary to establish both the nature of this subset as well as the function of this discrimination. It would not be unexpected that the MTB domain of CLIPR-59 could recognize a subset of microtubules, because the CLIP domain seems to confer conformation- (or structure-) sensitive tubulin binding to at least some members of the family. For example, CLIP-170 interacts with growing microtubule plus ends probably through a copolymerization mechanism (Diamantopoulos et al., 1999; Perez et al., 1999), a property that may be shared by p150^{glued}. Another group of CLIPRs also seems to be sensitive to tubulin conformation, as these proteins bind tubulin in a prefolded form (Lewis et al., 1997).

CLIPR-59 plays a role in TGN–endosome membrane dynamics

The function of CLIPR-59 is still uncertain. It was proposed by Rickard and Kreis (1996) that specific CLIPs, phylogenetically related to CLIP-170 or not, play a role at the interface between membranous organelles and microtubules. Some described CLIPs are indeed members of the CLIP-170 family: CLIP-170 for endocytic carrier vesicles (Pierre et al., 1992); CLIP-115 for dendritic lamellar bodies (De Zeeuw et al., 1997); and a yet unidentified CLIPR for peroxisomes (Thiemann et al., 2000). But so far, p150^{glued}, as part of the dynactin complex, is the only CLIP-170–related protein for which clear involvement in membrane dynamics has been established (Burkhardt et al., 1997; Presley et al., 1997).

Although early observations indicated the existence of Golgi CLIPs, the nature of the proteins encoding this activity has largely remained unknown (Karecla and Kreis, 1992; Rickard and Kreis, 1996). GMAP-210 has recently been characterized as a CLIP, mediating interactions between Golgi membranes and stable microtubules (Infante et al., 1999). Hook3 appears to be a CLIP located in the cis-Golgi (Walenta et al., 2001). It is also worth mentioning that the *Drosophila* CLIP-170 homologue, CLIP-190, colocalizes with Golgi markers during cellularization of the embryo, although no direct involvement of CLIP-190 in Golgi localization has yet been obtained. In this context, CLIPR-59 may be one of the elusive Golgi CLIPs, more particularly involved in trans-Golgi/TGN interaction with microtubules.

CLIPR-59 overexpression strongly perturbs membrane dynamics in the early endosome–TGN pathway, leading to the accumulation of membranes positive for both Rab11 and TfR, hence likely to be recycling endosomes (Ullrich et al., 1996). EEA1-positive structures coaccumulate with overexpressed CLIPR-59, indicating that early endosomes

are also affected. Immunofluorescence experiments together with quantification of transferrin uptake and recycling by FACS[®] analysis showed that transferrin can be internalized by cells overexpressing CLIPR-59, although less efficiently. It will be interesting to test whether these defects are due to a general inhibition of endosome motility or a failure of aggregated endosomes to participate in transferrin recycling.

Finally, a reduction in TGN46 staining was observed in CLIPR-59–overexpressing cells. CLIPR-59 overexpression also correlated with perturbation of STxB retrograde transport, which also transits through the recycling endosome to the TGN pathway (Mallard et al., 1998; Wilcke et al., 2000). Interestingly, although most of the TfR accumulated at the center of CLIPR-59–overexpressing cells, the STxB appeared to be blocked in peripheral structures partially positive for overexpressed CLIPR-59. However, it is difficult to use overexpression experiments to precisely pinpoint the site of CLIPR-59 action. In addition, we were not able to quantify this effect because cells overexpressing CLIPR-59 represent only a minority of transfected cells. We will now try to reconstitute this effect in semi-intact cells to gather more quantitative data and identify the perturbed stage.

The central accumulation of TfR-positive early/recycling endosomes observed upon CLIPR-59 overexpression may result from either direct or indirect effects on endosome function. Indirect effects could be due to the titration of essential components necessary for function of early endosome–TGN pathways, for example components involved in sorting (receptors), budding (coats), or delivery (fusion machinery and motors). One such component could be the clathrin adaptor PACS-1 (Wan et al., 1998), because the CLIPR-59 E/P domain closely resembles the PACS-1 interaction domain present in furin and HIV-Nef (Wan et al., 1998; Piguet et al., 2000). Moreover, electron microscopy suggested that CLIPR-59 overexpression induced some accumulation of coated membranes. However immunofluorescence analysis showed no major effect on clathrin-coated membranes, or on AP-1, -2, and -3–positive membranes (unpublished data).

What model for CLIPR-59 function?

According to the proposed model for CLIP function (Rickard and Kreis, 1996; Schroer, 2000), CLIPR-59 may stably link its target membranes to microtubules until they are mature enough to be translocated by molecular motors. It could also help the mature membrane to select a particular subset of microtubules for movement. Because we observed a slight acceleration of endocytosis upon moderate expression of CLIPR-59, this step may represent a necessary checkpoint along the TGN46–STxB pathway. It will be important to determine whether specific kinesins are involved in this pathway, as was shown for the M6PR pathway (Nakagawa et al., 2000). When overexpressed, CLIPR-59 may attach membranes to microtubules too strongly, thus perturbing their motility. It is worth mentioning that CLIPR-59 mutants missing their amino-terminal domain can still efficiently perturb the endosome–TGN membrane dynamics, whereas the additional deletion of the MTB domain prevents this effect. Overexpressed CLIPR-59 would thus behave like the rotavirus protein NSP4 that stably attaches ER-derived membranes to microtubules

and inhibits secretory transport (Xu et al., 2000), thus behaving like a nonregulatable CLIP. It is, however, worth noting that the FACS[®] experiments also suggested that moderate expression of GFP•CLIPR-59, as well as expression of GFP•CLIPR-59-ΔC60, had a weak stimulatory effect on transferrin endocytosis. This may indicate that low levels of endogenous CLIPR-59 may be an activator of this pathway.

Our domain mapping experiments suggest a model where the membrane-targeting domain of CLIPR-59 is dominant over the MTB domain, and the ankyrin repeat-containing amino-terminal half of CLIPR-59 interferes with microtubule binding. We thus propose that newly synthesized CLIPR-59 is unable to bind to microtubules and first associates with membranes. This membrane association may then allow microtubule binding of CLIPR-59, possibly by displacing the ANK domain or after posttranslational modifications. According to this model, CLIPR-59 would be the first CLIP that binds microtubules only when already localized to its target membrane. In contrast to the other previously characterized CLIPs, its overexpression would thus only affect its target compartment without affecting the microtubule network. This could be of some importance because we observed that CLIPR-59 is strongly expressed in some neurons during development (Bloch-Gallego, E., and C. Sotelo, personal communication; unpublished data), and may thus be used during neuronal maturation to regulate the function of the TGN and recycling endosomes.

In conclusion, we have identified a new CLIP-170-related cytoplasmic linker protein that is involved in the early/recycling endosome-TGN transport pathway. Its unusual characteristics, including its membrane interactions and fine-tuned microtubule interactions, suggest that it plays an important role in membrane-microtubule interactions.

Materials and methods

Antibodies and reagents

Antibodies against CLIPR-59 were raised in rabbits using a GST fusion protein produced in bacteria. Extensive carboxy-terminal degradation of CLIPR-59 in bacteria resulted in the production of antibodies primarily directed against the amino-terminal domain. Sera were depleted of anti-GST antibodies before being affinity purified on GST-CLIPR-59 resin. Other polyclonal antibodies used in this study were: anti-GFP (Molecular Probes), anti-EEA1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-galactosyltransferase (provided by E.G. Berger, Institute of Physiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland), and anti-Rab11 (Wilcke et al., 2000). Monoclonal antibodies used were anti-GM-130 (Transduction Laboratories), anti-α-tubulin (Sigma-Aldrich), anti-Golgi CTR433 (provided by M. Bornens, Institut Curie, Paris, France), anti-HA, anti-LBPA (6C4; provided by J. Gruenberg, University of Geneva, Geneva, Switzerland), and anti-TfR OKT9, or H68.4 (for immunoelectron microscopy; Zymed Laboratories). Fluorescent secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories. Rhodamine- and Alexa633-labeled transferrin were from Molecular Probes.

Culture medium, sodium pyruvate, and glutamine were from GIBCO BRL, restriction enzymes and T4 DNA ligase were from New England Biolabs, Inc., and oligonucleotides were obtained from Sigma-Genosys. DNA was purified using Jetstar columns (Genomed).

Cloning of CLIPR-59, phylogenetic analysis, and plasmid construction

Phylogenetic analysis as well as cloning and tagging of CLIPR-59 are described in the online supplemental material (available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/200111003/DC1>).

Cell culture, transfection, and immunofluorescence analysis

HeLa cells were grown as previously described (Mallard et al., 1998) and transfected using the calcium phosphate precipitate method. 24 or 36 h after transfection, cells were fixed with 3% paraformaldehyde and permeabi-

lized with 0.05% saponin (ICN Biomedicals). Alternatively, when indicated, cells were prepermeabilized with 0.5% Triton X-100 as described by Kreis (1987) and fixed in methanol (4 min, -20°C). Fixed cells were incubated with antibodies for 30 min (except anti-48, which was incubated overnight). Images were then acquired using a Leica Microsystem confocal microscope (TCS4D or SP2) or, in the case of Fig. 3 (a-c), with a cooled CCD camera (CH250; Photometrics) installed on an Axiovert TV135 microscope (ZEISS). Figures were prepared using Adobe Photoshop[®] 6.0 running on a Power Macintosh (Apple Computer, Inc.).

Immunoelectron microscopy

HeLa cells were plated on tissue culture dishes 24 h before the experiment to obtain 80% confluency at the time of infection. For transient expression, cells were then infected with the vT7 recombinant vaccinia virus (Fuerst et al., 1986) and cotransfected using DOTAP (Roche) with GFP-CLIPR-59 (subcloned in pSP72 under the T7 promoter). Cells were fixed 4 h after the transfection with 2% paraformaldehyde and 0.125% glutaraldehyde and processed for cryosectioning. The cryosections were made at -120°C using a cryo-ultramicrotome (Leica-Reichert) and retrieved with a 1:1 solution of 2.3 M sucrose and 2% methyl cellulose. Cryosections were then incubated with primary antibodies and revealed with protein A gold (purchased from J.W. Slot, Utrecht Medical School, Utrecht, Netherlands). Labeled cryosections were analyzed with a CM120 electron microscope (Philips Electronic Instrument).

Uptake of transferrin and STxB

Rh-Tf was obtained from Molecular Probes and Cy3-labeled STxB (STxB-Cy3) was provided by L. Johannes (Institut Curie, Paris, France; Mallard et al., 1998). Transfected cells were incubated with 25 μg/ml of Rh-Tf or 10 μg/ml of STxB-Cy3 in DME for 90 min at 37°C to achieve steady-state labeling of their respective target compartment. Cells were then washed in medium and fixed in 3% paraformaldehyde before being processed for immunofluorescence.

Quantification of transferrin uptake

Cells transfected by GFP•CLIPR-59 or GFP•CLIPR-59-ΔC60 for 24 h were detached in PBS-EDTA, pelleted, resuspended in endocytosis medium (DME, 10 mM Hepes, pH 7.4, 0.1% BSA, 5 μg/ml Alexa633-labeled transferrin), and incubated at 37°C. After 60 min of internalization, cells were diluted in cold PBS, pelleted, resuspended in recycling medium (DME, 10% FCS, 10 mM Hepes, pH 7.4, 100 μg/ml unlabeled transferrin), and incubated for another 60 min at 37°C. At the indicated time during the endocytosis and recycling periods, aliquots of incubated cells were taken, diluted five times in PBS and left for 10 min at 4°C in the presence of 100 μg/ml unlabeled transferrin (Sigma-Aldrich). Cells were then pelleted, resuspended in PBS-EDTA, and fixed in 1% paraformaldehyde. FACS[®] analysis was then performed using a FACScalibur[®] (Becton Dickinson), measuring GFP fluorescence in FL1 and Alexa633 in FL4. The mean Alexa633 fluorescence was then calculated in three separate windows chosen according to relative green fluorescence (control, low, and high). In separate experiments, we checked that cells from the lowest fluorescence window behaved as mock-transfected cells, and could thus be taken as an internal control. At least 7.5×10^2 and up to 10^4 cells were counted in the high window.

Online supplemental material

Additional Materials and methods concerning the cloning and phylogenetic analysis of CLIPR-59, as well as additional references related to the monoclonal antibodies used in this study are available online (available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/200111003/DC1>).

This article is dedicated to the memory of Thomas Kreis.

We thank E.G. Berger, M. Bornens, and J. Gruenberg for the gift of antibodies, L. Johannes for the gift of fluorescent STxB, A. El Marjou for the purification of the anti-CLIPR-59 antibodies, V. Braun and R. Stalder for their help with some experiments, and P. Benaroch for advice concerning FACS[®] analysis. We also thank M. Rojo and V. Lallemand for careful reading of the manuscript.

This work was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (RA00064-01) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC-5747) (F. Perez and B. Goud), the American Heart Association (H. Goodson), and the Fond National Suisse (T. Kreis).

Submitted: 1 November 2001

Revised: 10 January 2002

Accepted: 10 January 2002

References

- Barr, F.A. 1999. A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins. *Curr. Biol.* 9:381–384.
- Burkhardt, J.K. 1998. The role of microtubule-based motor proteins in maintaining the structure and function of the Golgi complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404:113–126.
- Burkhardt, J.K., C.J. Echeverri, T. Nilsson, and R.B. Vallee. 1997. Overexpression of the dynamin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J. Cell Biol.* 139:469–484.
- Cole, N.B., and J. Lippincott-Schwartz. 1995. Organization of organelles and membrane traffic by microtubules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:55–64.
- Cole, N.B., N. Sciaky, A. Marotta, J. Song, and J. Lippincott-Schwartz. 1996. Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell.* 7:631–650.
- De Matteis, M.A., and J.S. Morrow. 2000. Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway. *J. Cell Sci.* 113:2331–2343.
- De Zeeuw, C.I., C.C. Hoogenraad, E. Goedknegt, E. Hertzberg, A. Neubauer, F. Grosveld, and N. Galjart. 1997. CLIP-115, a novel brain-specific cytoplasmic linker protein, mediates the localization of dendritic lamellar bodies. *Neuron.* 19:1187–1199.
- Diamantopoulos, G.D., F. Perez, H.V. Goodson, G. Batelier, R. Melki, T.E. Kreis, and J.E. Rickard. 1999. Dynamic localization of CLIP-170 to microtubule plus ends is coupled to microtubule assembly. *J. Cell Biol.* 144:99–112.
- Fuerst, T.R., E.G. Niles, F.W. Studier, and B. Moss. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83:8122–8126.
- Goodson, H.V., C. Valetti, and T.E. Kreis. 1997. Motors and membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:18–28.
- Gorina, S., and N.P. Pavletich. 1996. Structure of the p53 tumor suppressor bound to the ankyrin and SH3 domains of 53BP2. *Science.* 274:1001–1005.
- Habermann, A., T.A. Schroer, G. Griffiths, and J.K. Burkhardt. 2001. Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynactin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *J. Cell Sci.* 114:229–240.
- Ho, W.C., V.J. Allan, G. van Meer, E.G. Berger, and T.E. Kreis. 1989. Reclustering of scattered Golgi elements occurs along microtubules. *Eur. J. Cell Biol.* 48:250–263.
- Holzbaier, E.L., J.A. Hammarback, B.M. Paschal, N.G. Kravitz, K.K. Pfister, and R.B. Vallee. 1991. Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the *Drosophila* gene Glued. *Nature.* 351:579–583.
- Infante, C., F. Ramos-Morales, C. Fedriani, M. Bornens, and R.M. Rios. 1999. GMAP-210, a cis-Golgi network-associated protein, is a minus end microtubule-binding protein. *J. Cell Biol.* 145:83–98.
- Karecla, P.I., and T.E. Kreis. 1992. Interaction of membranes of the Golgi complex with microtubules in vitro. *Eur. J. Cell Biol.* 57:139–146.
- Kjer-Nielsen, L., R.D. Teasdale, C. van Vliet, and P.A. Gleeson. 1999. A novel Golgi-localisation domain shared by a class of coiled-coil peripheral membrane proteins. *Curr. Biol.* 9:385–388.
- Klopfenstein, D.R., F. Kappeler, and H.P. Hauri. 1998. A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J.* 17:6168–6177.
- Kreis, T.E. 1987. Microtubules containing deetyrosinated tubulin are less dynamic. *EMBO J.* 6:2597–2606.
- Kreis, T.E., H.V. Goodson, F. Perez, and R. Rönholm. 1997. Golgi apparatus-cytoskeleton interactions. In *The Golgi Apparatus*. E.G. Berger and J. Roth, editors. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. 179–193.
- Lewis, S.A., G. Titan, and N.J. Cowan. 1997. The α and β -tubulin folding pathways. *Trends Cell Biol.* 7:479–485.
- Mallard, F., C. Antony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud, and L. Johannes. 1998. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B fragment transport. *J. Cell Biol.* 143:973–990.
- Michaely, P., and V. Bennett. 1992. The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition. *Trends Cell Biol.* 2:127–129.
- Michaely, P., and V. Bennett. 1993. The membrane-binding domain of ankyrin contains four independently folded subdomains, each comprised of six ankyrin repeats. *J. Biol. Chem.* 268:22703–22709.
- Munro, S., and B.J. Nichols. 1999. The GRIP domain - a novel Golgi-targeting domain found in several coiled-coil proteins. *Curr. Biol.* 9:377–380.
- Nakagawa, T., M. Setou, D. Seog, K. Ogasawara, N. Dohmae, K. Takio, and N. Hirokawa. 2000. A novel motor, KIF13A, transports mannose-6-phosphate receptor to plasma membrane through direct interaction with AP-1 complex. *Cell.* 103:569–581.
- Perez, F., G.S. Diamantopoulos, R. Stalder, and T.E. Kreis. 1999. CLIP-170 highlights growing microtubule ends in vivo. *Cell.* 96:517–527.
- Pierre, P., J. Scheel, J.E. Rickard, and T.E. Kreis. 1992. CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell.* 70:887–900.
- Pierre, P., R. Pepperkok, and T.E. Kreis. 1994. Molecular characterization of two functional domains of CLIP-170 in vivo. *J. Cell Sci.* 107:1909–1920.
- Piguet, V., L. Wan, C. Borel, A. Mangasarian, N. Demaurex, G. Thomas, and D. Trono. 2000. HIV-1 Nef protein binds to the cellular protein PACS-1 to downregulate class I major histocompatibility complexes. *Nat. Cell Biol.* 2:163–167.
- Presley, J.F., N.B. Cole, T.A. Schroer, K. Hirschberg, K.J. Zaal, and J. Lippincott-Schwartz. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature.* 389:81–85.
- Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1990. Identification of a novel nucleotide-sensitive microtubule-binding protein in HeLa cells. *J. Cell Biol.* 110:1623–1633.
- Rickard, J.E., and T.E. Kreis. 1996. CLIPs for organelle-microtubule interactions. *Trends Cell Biol.* 6:178–183.
- Schroer, T.A. 2000. Motors, clutches and brakes for membrane traffic: a commemorative review in honor of Thomas Kreis. *Traffic.* 1:3–10.
- Sisson, J.C., C. Field, R. Ventura, A. Royou, and W. Sullivan. 2000. Lava lamp, a novel peripheral Golgi protein, is required for *Drosophila melanogaster* cellularization. *J. Cell Biol.* 151:905–918.
- Swaroop, A., M. Swaroop, and A. Garen. 1987. Sequence analysis of the complete cDNA and encoded polypeptide for the Glued gene of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:6501–6505.
- Thiemann, M., M. Schrader, A. Volk, E. Baumgart, and H.D. Fahimi. 2000. Interaction of peroxisomes with microtubules. In vitro studies using a novel peroxisome-microtubule binding assay. *Eur. J. Biochem.* 267:6264–6275.
- Thyberg, J., A. Piasek, and S. Moskalewski. 1980. Effects of colchicine on the Golgi complex and GERL of cultured rat peritoneal macrophages and epiphyseal chondrocytes. *J. Cell Sci.* 45:41–58.
- Tian, G., Y. Huang, H. Rommelaere, J. Vandekerckhove, C. Ampe, and N.J. Cowan. 1996. Pathway leading to correctly folded β -tubulin. *Cell.* 86:287–296.
- Ullrich, O., S. Reinsch, S. Urbe, M. Zerial, and R. Parton. 1996. Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell Biol.* 135:913–924.
- Valetti, C., D.M. Wetzel, M. Schrader, M.J. Hasbani, S.R. Gill, T.E. Kreis, and T.A. Schroer. 1999. Role of dynactin in endocytic traffic: effects of dynamin overexpression and colocalization with CLIP-170. *Mol. Biol. Cell.* 10:4107–4120.
- Vaughan, K.T., S.H. Tynan, N.E. Faulkner, C.J. Echeverri, and R.B. Vallee. 1999. Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-170 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.* 112:1437–1447.
- Walenta, J.H., A.J. Didier, X. Liu, and H. Kramer. 2001. The Golgi-associated Hook3 protein is a member of a novel family of microtubule-binding proteins. *J. Cell Biol.* 152:923–934.
- Wan, L., S.S. Molloy, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, S.L. Rybak, and G. Thomas. 1998. PACS-1 defines a novel gene family of cytosolic sorting proteins required for trans-Golgi network localization. *Cell.* 94:205–216.
- Wilcke, M., L. Johannes, T. Galli, V. Mayau, B. Goud, and J. Salamero. 2000. Rab11 regulates the compartmentalization of early endosomes required for efficient transport from early endosomes to the trans-Golgi network. *J. Cell Biol.* 151:1207–1220.
- Xu, A., A.R. Bellamy, and J.A. Taylor. 2000. Immobilization of the early secretory pathway by a virus glycoprotein that binds to microtubules. *EMBO J.* 19:6465–6474.

```

{choisir un intervalle temporel
choisir 2 images reelles
multiplier 2 images reelles
integrer le produit
plotter <integrale> en fonction de
l'intervalle temporel
}

```

```

procedure PlotMeans(maximum :integer,
titre : string);
{Plots the mean column in the Results
table.}
var

```

```

xmin,xmax,ymin,ymax,i,xscale,yscale:r
eal;

```

```

width,height,margin,pwidth,pheight:in
teger;

```

```

y,pbottom:integer;

```

```

begin

```

```

margin:=40;

```

```

width:=500;

```

```

height:=300;

```

```

ymax:=-999999;

```

```

ymin:=999999;

```

```

for i:=1 to maximum do begin

```

```

y:=rUser1[i];

```

```

if y>ymax then ymax:=y;

```

```

if y<ymin then ymin:=y;

```

```

end;

```

```

xmin:=0;

```

```

xmax:=maximum-1;

```

```

SetNewSize(width,height);

```

```

SetForeground(255);

```

```

SetBackground(0);

```

```

MakeNewWindow(titre);

```

```

pwidth:=width-2*margin;

```

```

pheight:=height-2*margin;

```

```

pbottom:=margin+pheight;

```

```

xscale:=pwidth/(xmax-xmin);

```

```

yscale:=pheight/(ymax-ymin);

```

```

SetForeground(255);

```

```

SetBackground(0);

```

```

SetLineWidth(1);

```

```

MoveTo(margin,pbottom-(rUser1[1]-

```

```

ymin)*yscale);

```

```

for i:=2 to maximum do

```

```

LineTo(margin+(i-

```

```

1)*xscale,pbottom-(rUser1[i]-

```

```

ymin)*yscale);

```

```

MoveTo(margin,pbottom);

```

```

LineTo(margin+pwidth,pbottom);

```

```

MoveTo(margin,margin);

```

```

LineTo(margin,margin+pheight);

```

```

SetFont('Geneva');

```

```

SetFontSize(9);

```

```

SetText('Centered');

```

```

MoveTo(margin+4,margin+pheight+12);

```

```

writeln(xmin:1:2);

```

```

MoveTo(margin+pwidth,margin+pheight+1
2);

```

```

writeln(xmax:1:2);

```

```

SetText('Right Justified');

```

```

MoveTo(margin-2,margin+pheight-5);

```

```

writeln(ymin:1:2);

```

```

MoveTo(margin-2,margin);

```

```

writeln(ymax:1:2);

```

```

end;

```

```

procedure CheckForStack;

```

```

begin

```

```

if nPics=0 then begin

```

```

PutMessage('This macro requires a
stack.');
```

```

exit;

```

```

end;

```

```

if nSlices=0 then begin

```

```

PutMessage('This window is not a
stack.');
```

```

exit

```

```

end;

```

```

end;

```

```

procedure WindowsToStack;

```

```

{Unlike the menu command of the same
name, the windows do not}

```

```

{all need to be the same size.}

```

```

var

```

```

i,width,height,MinWidth,MinHeight,n,s
tack:integer;

```

```

isStack:boolean;

```

```

begin

```

```

if nPics<=1 then begin

```

```

PutMessage('At least two images
must be open.');
```

```

exit;

```

```

end;

```

```

MinWidth:=9999;

```

```

MinHeight:=9999;

```

```

isStack:=false;

```

```

for i:=1 to nPics do begin

```

```

SelectPic(i);

```

```

GetPicSize(width,height);

```

```

if width<MinWidth then

```

```

MinWidth:=width;

```

```

if height<MinHeight then

```

```

MinHeight:=height;

```

```

isStack:=isStack or (nSlices>0);

```

```

end;

```

```

if isStack then begin

```

```

PutMessage('This macro does not
work with stacks.');
```

```

exit;

```

```

end;

```

```

if odd(MinWidth) then

```

```

MinWidth:=MinWidth-1;

```

```

n:=nPics;

```

```

SaveState;

```

```

SetNewSize(MinWidth,MinHeight);

```

```

MakeNewStack('Stack');

```

```

stack:=nPics;

```

```

for i:=1 to n do begin

```

```

SelectPic(1);
MakeRoi(0,0,MinWidth,MinHeight);
copy;
Dispose;
SelectPic(nPics);
paste;
if i<>n then AddSlice;
end;
KillRoi;
RestoreState;
end;

```

```

Procedure StackToWindows;

```

```

var
  mystack,i:integer
  width,height:integer;
begin
  CheckForStack;
  GetPicSize(width,height);
  SetNewSize(width,height);
  mystack := picnumber;
  for i:=1 to nslices do begin
    SelectSlice(i);
    SelectAll;
    copy;
    KillRoi;
    MakeNewWindow(i);
    paste;
    KillRoi;
    SelectPic(myStack);
  end;
  SelectPic(myStack);
  Dispose;
end;

```

```

function max (a,b : integer) :
integer;
Begin
  If a>b then max:=a else max:=b;
End;

```

```

macro 'Arnaud s Special : 2 FF TTC';
{extrait une sous-stack d'une stack,
a l'interieur d'une ROI}
Var
x, y, i, Sizex, Sizey : integer;
Begin
  CheckForStack;
  GetRoi(x, y, Sizex, Sizey);
  StackToWindows;
  WindowsToStack;
  SetNewSize(Sizex, Sizey);
  MakeNewStack('Et voilà !!!');
  SelectWindow('stack');
  ChooseSlice(1);
  MakeRoi(x, y, Sizex, Sizey);
  Copy;
  KillRoi;
  SelectWindow('Et voilà !!!');
  Paste;
  KillRoi;
  SelectWindow('stack');

```

```

For i:=2 to nSlices Do
begin
  SelectWindow('stack');
  ChooseSlice(i);
  MakeRoi(x, y, Sizex,
Sizey);
  Copy;
  KillRoi;
  SelectWindow('Et voilà
!!!');
  AddSlice;
  Paste;
  KillRoi;
end;
End;

```

```

procedure TwoImages(Sizex, Sizey, n,
borne : integer);
{pour la macro de recentrage, cherche
la translation optimale entre 2
images successives}

```

```

Var
  i, j, k, l, n1, n2, bestx, besty :
integer;
  x, y, product, mean, bestmean
:real;
Begin
  bestmean:=0;
  bestx:=0;
  besty:=0;
  for x:=-borne to borne do
  begin
    for y:=-borne to borne do
    begin
      begin
        i:=x;
        k:=Sizex;
      end
    else
      begin
        i:=0;
        k:=Sizex+x;
      end;
    if y>=0 then
      begin
        j:=y;
        l:=Sizey;
      end
    else
      begin
        j:=0;
        l:=Sizey+y;
      end;
    ChooseSlice(n+1);
    MakeRoi(i,j,(k-i),(l-j));
    Copy;
    KillRoi;
    SetNewSize(Sizex-abs(x),
Sizey-abs(y));
    MakeNewWindow('im1');
    n1:=PicNumber;
    Paste;

```

```

KillRoi;
SelectWindow('stack');
if x>=0 then
  begin
    i:=0;
    k:=SizeX-x;
  end
else
  begin
    i:=-x;
    k:=SizeX;
  end;
if y>=0 then
  begin
    j:=0;
    l:=SizeY-y;
  end
else
  begin
    j:=-y;
    l:=SizeY;
  end;
ChooseSlice(n);
MakeRoi(i,j,(k-i),(l-j));
Copy;
KillRoi;
SetNewSize(SizeX-abs(x), SizeY-
abs(y));
MakeNewWindow('im2');
n2:=Picnumber;
Paste;
ImageMath('mul
real',n1,n2,1,0,'produit');
Measure;
mean := rMean[rCount];
Dispose;
if (mean>bestmean) then
  begin
    bestx:=x;
    besty:=y;
    bestmean := mean;
  end;
SelectWindow('im1');
Dispose;
SelectWindow('im2');
Dispose;
end;

if n=1 then
  begin
    rUser1[1] := bestx;
    rUser1[2] := besty;
    ruser2[1] := bestmean;
  end
else
  begin
    rUser1[2*n-1] :=rUser1[2*(n-
1)-1] + bestx;
    rUser1[2*n] := rUser1[2*(n-
1)] + besty;
    ruser2[n] := bestmean;
  end;

```

```

End;

procedure StackRecentrage(borne :
integer);
{pour la macro de recentrage, calcule
la stack recentree, erodee a cause
des derives}
Var
  i, SizeX, SizeY, xplus, yplus,
xmoins, ymoins, r, s, t, u : integer;
Begin

  xplus := 0;
  xmoins := 0;
  ymoins := 0;
  yplus := 0;
  SelectWindow('stack');
  GetPicSize(SizeX,SizeY);
  For i:=1 to (nSlices-1) do
  begin
    ResetCounter;
    SelectWindow('stack');
    TwoImages(SizeX, SizeY, i, borne);

    if rUser1[2*i-1]>=0 then xplus :=
max(xplus, abs(rUser1[2*i-1])) else
xmoins := max(xmoins,
abs(rUser1[2*i-1]));
    if rUser1[2*i]>=0 then yplus :=
max(yplus, abs(rUser1[2*i])) else
ymoins := max(ymoins,
abs(rUser1[2*i]));
    end;
    SetNewSize((SizeX-
(xplus+xmoins)),(SizeY-
(yplus+ymoins)));
    MakeNewStack('stack recentree');
    SelectWindow('stack');
    ChooseSlice(1);
    MakeRoi((xmoins), (ymoins), (SizeX-
(xplus+xmoins)), (SizeY-
(yplus+ymoins)));
    Copy;
    KillRoi;
    SelectWindow('stack recentree');
    Paste;
    KillRoi;
    SelectWindow('stack');
    For i:=1 to (nSlices-1) do
    begin
      r := xmoins + rUser1[2*i-1];
      t := SizeX - xplus +
rUser1[2*i-1];
      s := ymoins + rUser1[2*i];
      u := SizeY - yplus +
rUser1[2*i];
      SelectWindow('stack');
      ChooseSlice(i+1);
      MakeRoi(r,s,(t-r),(u-s));
    Copy;
    KillRoi;
    SelectWindow('stack recentree');
    AddSlice;

```

```

    Paste;
    KillRoi;
    end;
End;

macro 'recentrage';
{recentre une stack en xy en
maximisant les correlations a courte
portee temporelle}
Var
str : string;
borne : integer;
Begin
SetCounter(0);
CheckForStack;
StackToWindows;
WindowsToStack;
SetUser1Label('best');
SetUser2Label('bestmean');
str := GetString('translation max
?', '2');
borne := StringToNum(str);
StackRecentrage(borne);
End;

procedure grow(seuil : real; x, y,
SizeX, SizeY : integer);
{pour la macro Golgi, agrandit d'un
pixel dans les 4 directions le
rectangle-sonde et selectionne parmi
les points du nouveau bord les points
golgiens}
var
i, j : integer;
begin
SelectWindow('cadre');
MakeRoi((x-1),(y-
1),(SizeX+2),(SizeY+2));
AddConstant(1);
KillRoi;
MakeRoi(x, y, SizeX, SizeY);
AddConstant(-1);
KillRoi;
ImageMath('mul', n1, n3, 1, 0,
n3);
SetThreshold(round(0.8*seuil));
MakeBinary;
MultiplyByConstant(1/255);
ImageMath('add', n2, n3, 1, 0,
n2);
SelectWindow('cadre');
SelectAll;
Clear;
end;

procedure reconnaissance(width,
height, n1, n2, x, y, SizeX, SizeY :
integer);
{calcule le seuil golgien dynamique}
var
n3, nombre : integer;
seuil, produit : real;

```

```

begin
    nombre:=0;
    SetNewSize(width, height);
    MakeNewWindow('cadre');
    n3:= Pidnumber;
    SelectWindow('masque');
    SelectAll;
    Clear;
    MakeRoi(x, y, SizeX, SizeY);
    AddConstant(1);
    KillRoi;
    Repeat
        ImageMath('mul', n1, n2,
1,0, 'produit');
        Measure;
        seuil := rMean[ rCount];
        Dispose;
        SelectWindow('masque');
        GetHistogram(0,0,width,
height);
seuil:=seuil*width*height/histogram[1
];
        Grow(seuil, x, y, SizeX,
SizeY);
        x:=x-1;
        y:=y-1;
        SizeX:=SizeX+2;
        SizeY:=SizeY+2;
        nombre:=nombre+1;
    Until
        (x=0) or (y=0) or (x+SizeX =
width) or (y+SizeY = height) or
button or (nombre=rUser2[1]);
        If rUser2[1]=0 then rUser2[1]
:= nombre;
        SelectWindow('cadre');
        Dispose;
        SelectWindow('masque');
        Erode;
        Dilate;
end;

procedure NonReconnaissance(x, y,
SizeX, SizeY : integer);
{ne calcule pas le seuil golgien
dynamique}
begin
    SelectWindow('masque');
    SelectAll;
    Clear;
    MakeRoi(x, y, SizeX, SizeY);
    AddConstant(1);
    KillRoi;
end;

Macro 'Golgi, où est-tu ?';
{reconnait le Golgi sur la stack, et
calcule son intensite moyenne au
cours du temps}
Var

```

```

i, j, n1, n2, width, height, norme,
x, y, Sizex, Sizey, nbimages :
integer;
mean :real;
str : string;
Begin
str := GetString('Recognition
(y,n)?','n');
rUser2[1]:=0;
CheckForstack;
nbimages := nSlices;
GetRoi(x, y, Sizex, Sizey);
KillRoi;
StackToWindows;
WindowsToStack;
SetUser1Label('concentration');
i:=nbimages;
SetCounter(0);
ChooseSlice(nbimages);
n1 := Pidnumber;
GetPicSize(width, height);
SetNewSize(width, height);
MakeNewStack('golgi');
MakeNewWindow('masque');
n2 := PidNumber;
NewTextWindow('data.txt');
NewTextWindow('datacorrel.txt');
if str='y' then Reconnaissance(width,
height, n1, n2, x, y, Sizex, Sizey)
else NonReconnaissance(x, y, Sizex,
Sizey);
SelectWindow('masque');
GetHistogram(0,0,width, height);
norme:= histogram[1];
ImageMath('mul', n1, n2, 1, 0, n2);
Measure;

{calcul de l'intensite moyenne du
Golgi. Il faut mesurer la moyenne de
l'image de la stack et diviser par
elle le nombre suivant pour avoir le
pourcentage de B au Golgi}

rUser1[nbimages] :=
rMean[rCount]*width*height/norme;
SetThreshold(1);
MakeBinary;
SelectAll;
Copy;
KillRoi;
SelectWindow('golgi');
Paste;
KillRoi;
SelectWindow('masque');
MultiplyByConstant(1/255);
SelectWindow('stack');
Repeat
ResetCounter;
i:=i-1;
SelectWindow('stack');
ChooseSlice(i);
n1:=PidNumber;

```

```

if str='y' then Reconnaissance(width,
height, n1, n2, x, y, Sizex, Sizey)
else NonReconnaissance(x, y, Sizex,
Sizey);
SelectWindow('masque');
GetHistogram(0,0,width, height);
norme:= histogram[1];
ImageMath('mul', n1, n2, 1, 0, n2);
Measure;
rUser1[i] := rMean[rCount
]*Width*Height/norme;
SetThreshold(1);
MakeBinary;
SelectAll;
Copy;
KillRoi;
SelectWindow('golgi');
AddSlice;
Paste;
KillRoi;
SelectWindow('masque');
MultiplyByConstant(1/255);
SelectWindow('stack');
ChooseSlice(i);
Measure;
mean := rMean[rCount];
Until
(rUser1[i]<=2*mean) or (i=1);
For j:= 1 To (i-1) Do rUser1[j]
:=rUser1[i];
SelectWindow('stack');
For j:= 1 To nbimages Do
Begin
SelectWindow('stack');
ChooseSlice(j);
Measure;
{rUser1[j] := rUser1[j] /
(rMean[rCount]*width*height);}
SelectWindow('data.txt');
Writeln(rUser1[j]);
End;
Save;
PlotMeans(nbimages,'B-Cy3 internalisé
au Golgi');

{calcul de la fonction d'auto-
correlation temporelle de l'intensite
moyenne du Golgi}
SelectWindow('stack');
For i:=1 To (nSlices-1) Do
Begin
Begin
For j:=1 to (nSlices-i) Do
Begin
rUser2 [i] := rUser2[i]
+ (j-1)* (rUser1[j] * rUser1[j+i]
)/j;
End;
End;
End;
norme := rUser2[1];
For i:=1 to (nSlices-1) Do
Begin
rUser1[i] :=
rUser2[i] / norme;

```

```

SelectWindow('datacorrel.txt');
      Writeln(rUser1[i]);
      End;
      Save;
      SelectWindow('stack');
      PlotMeans(nSlices-
1,'Corrélations temporelles');
End;

macro 'Temporal Correlations';
{calculé la fonction de corrélation
temporelle d'un pixel puis moyenne
sur tous les pixels, en normalisant
l'intensité moyenne au cours du
temps}
Var
i, j, Sizex, Sizey, n1, n2 : integer;
produit, mean, mean1, mean2, norme,
oldnorme : real;
Begin
  SetCounter(0);
  SetUser1Label('correl');
  CheckForStack;
  StackToWindows;
  WindowsToStack;

NewTextWindow('data.txt',100,100);
  GetPicSize(Sizex, Sizey);
  SetNewSize(Sizex, Sizey);
  For i:=1 to (nSlices-1) Do
  Begin
    ResetCounter;
    For j:=1 to (nSlices-i)
Do
  Begin
    SelectWindow('stack');
    ChooseSlice(j);
    Measure;
    mean1:= rMean[ rCount];
    SelectAll;
    Copy;
    KillRoi;
    MakeNewWindow('im1');
    n1:=PicNumber;
    Paste;
    KillRoi;
    SelectWindow('stack');
    ChooseSlice(i+j);
    Measure;
    mean2:= rMean[ rCount];
    SelectAll;
    Copy;
    KillRoi;
    MakeNewWindow('im2');
    n2:=Picnumber;
    Paste;
    KillRoi;
    ImageMath('mul real', n1,
n2, 1, 0, 'produit');
    Measure;
    mean:= rMean[ rCount];
    Dispose;

```

```

      norme := mean1 * mean2;
      If j=1 then rUser1[i] :=
(mean / norme) else rUser1[i] :=(
(oldnorme*rUser1[i] * (j-1)) + mean
)/(j*norme);
      oldnorme:=norme;
      SelectWindow('im1');
      Dispose;
      SelectWindow('im2');
      Dispose;
      End;
      SelectWindow('data.txt');
      Writeln(rUser1[i]);
      End;
      Save;
      SelectWindow('stack');
      PlotMeans(nSlices-
1,'Corrélations temporelles');
End;

macro 'Intensity Temporal
Correlations';
{comme avant, sans rendre l'intensité
moyenne constante}
Var
i, j, Sizex, Sizey, n1, n2 : integer;
produit, mean, norme : real;
Begin
  SetCounter(0);
  SetUser1Label('correl');
  CheckForStack;
  StackToWindows;
  WindowsToStack;

NewTextWindow('data.txt',100,100);
  GetPicSize(Sizex, Sizey);
  SetNewSize(Sizex, Sizey);
  For i:=1 to (nSlices-1) Do
  Begin
    ResetCounter;
    For j:=1 to (nSlices-i)
Do
  Begin
    SelectWindow('stack');
    ChooseSlice(j);
    SelectAll;
    Copy;
    KillRoi;
    MakeNewWindow('im1');
    n1:=PicNumber;
    Paste;
    KillRoi;
    SelectWindow('stack');
    ChooseSlice(i+j);
    SelectAll;
    Copy;
    KillRoi;
    MakeNewWindow('im2');
    n2:=Picnumber;
    Paste;
    KillRoi;
    ImageMath('mul real', n1,
n2, 1, 0, 'produit');

```

```

        Measure;
        mean:= rMean[ rCount];
        Dispose;
        If j=1 then rUser1[i] :=
mean else rUser1[i] :=( rUser1[i] *
(j-1) + mean )/j;
        SelectWindow('im1');
        Dispose;
        SelectWindow('im2');
        Dispose;
        End;
        End;
        SelectWindow('stack');
        norme := rUser1[1];
        For i:=1 to (nSlices-1) Do
            Begin
                rUser1[i] :=
rUser1[i] / norme;
        SelectWindow('data.txt');
                Writeln(rUser1[i]);
                End;
        Save;
        SelectWindow('stack');
        PlotMeans(nSlices-
1,'Corrélations temporelles');

End;

macro 'decoupage';
{met a 0 les pixels de la stack a
l'interieur de la ROI}
Var
i : integer;
Begin
    CheckForStack;
    For i:=1 To nSlices Do
        Begin
            ChooseSlice(i);
            Clear;
            End;
        KillRoi;
    End;
End;

```

V. Bibliographie

- Abler, L. L. et M. D. Sheets (2003). "Expression of scfv antibodies in xenopus embryos to disrupt protein function: Implications for large-scale evaluation of the embryonic proteome." *Genesis* **35**(2): 107-13.
- Abrieu, A., L. Magnaghi-Jaulin, J. A. Kahana, M. Peter, A. Castro, S. Vigneron, T. Lorca, D. W. Cleveland et J. C. Labbe (2001). "Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint." *Cell* **106**(1): 83-93.
- Acharya, U., R. Jacobs, J. M. Peters, N. Watson, M. G. Farquhar et V. Malhotra (1995). "The formation of Golgi stacks from vesiculated Golgi membranes requires two distinct fusion events." *Cell* **82**(6): 895-904.
- Acharya, U., A. Mallabiabarrena, J. K. Acharya et V. Malhotra (1998). "Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis." *Cell* **92**(2): 183-92.
- Acharya, U., J. M. McCaffery, R. Jacobs et V. Malhotra (1995). "Reconstitution of vesiculated Golgi membranes into stacks of cisternae: requirement of NSF in stack formation." *J Cell Biol* **129**(3): 577-89.
- Allan, B. B. et W. E. Balch (1999). "Protein sorting by directed maturation of Golgi compartments." *Science* **285**(5424): 63-6.
- Allan, B. B., B. D. Moyer et W. E. Balch (2000). "Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion." *Science* **289**(5478): 444-8.
- Allan, V. J. et T. E. Kreis (1986). "A microtubule-binding protein associated with membranes of the Golgi apparatus." *J. Cell Biol.* **103**: 2229-2239.
- Allan, V. J. et T. A. Schroer (1999). "Membrane motors." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 476-82.
- Alvarez, C., H. Fujita, A. Hubbard et E. Sztul (1999). "ER to Golgi transport: Requirement for p115 at a pre-Golgi VTC stage." *J Cell Biol* **147**(6): 1205-22.
- Alvarez, C., R. Garcia-Mata, H. P. Hauri et E. Sztul (2001). "The p115-interactive proteins GM130 and giantin participate in endoplasmic reticulum-Golgi traffic." *J Biol Chem* **276**(4): 2693-700.
- Andag, U., T. Neumann et H. D. Schmitt (2001). "The coatamer-interacting protein Dsl1p is required for Golgi-to-endoplasmic reticulum retrieval in yeast." *J Biol Chem* **276**(42): 39150-60.
- Antonny, B., D. Madden, S. Hamamoto, L. Orci et R. Schekman (2001). "Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues." *Nat Cell Biol* **3**(6): 531-7.
- Aridor, M., K. N. Fish, S. Bannykh, J. Weissman, T. H. Roberts, J. Lippincott-Schwartz et W. E. Balch (2001). "The Sar1 GTPase Coordinates Biosynthetic Cargo Selection with Endoplasmic Reticulum Export Site Assembly." *J. Cell Biol.* **152**(1): 213-230.
- Arnaud, L., J. Pines et E. A. Nigg (1998). "GFP tagging reveals human Polo-like kinase 1 at the kinetochore/centromere region of mitotic chromosomes." *Chromosoma* **107**(6-7): 424-9.
- Ayala, J. (1994). "Transport and internal organization of membranes:

- vesicles, membrane network and GTP-binding proteins." J. Cell Sci. **107**: 753-763.
- Azemar, M., M. Schmidt, F. Arlt, P. Kennel, B. Brandt, A. Papadimitriou, B. Groner et W. Wels (2000). "Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo." Int J Cancer **86**(2): 269-75.
- Bach, H., Y. Mazor, S. Shaky, A. Shoham-Lev, Y. Berdichevsky, D. L. Gutnick et I. Benhar (2001). "Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies." J Mol Biol **312**(1): 79-93.
- Bailly, E., M. McCaffrey, N. Touchot, A. Zahraoui, B. Goud et M. Bornens (1991). "Phosphorylation of two small GTP-binding proteins of the Rab family by p34^{cdc2}." Nature **350**: 715-718.
- Balch, W. E., W. G. Dunphy, W. A. Braell et J. E. Rothman (1984). "Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine." Cell **39**: 405-416.
- Baldauf, S. L. (2003). "The deep roots of eukaryotes." Science **300**(5626): 1703-6.
- Bardin, A. J. et A. Amon (2001). "Men and sin: what's the difference?" Nat Rev Mol Cell Biol **2**(11): 815-26.
- Barlowe, C. (1997). "Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins." J Cell Biol **139**(5): 1097-108.
- Barr, F. A. (1999). "A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins." Curr Biol **9**(7): 381-4.
- Barr, F. A., N. Nakamura et G. Warren (1998). "Mapping the interaction between GRASP65 and GM130, components of a protein complex involved in the stacking of Golgi cisternae." Embo J **17**(12): 3258-68.
- Barr, F. A., C. Preisinger, R. Kopajtich et R. Korner (2001). "Golgi matrix proteins interact with p24 cargo receptors and aid their efficient retention in the Golgi apparatus." J. Cell Biol. **155**(6): 885-892.
- Barr, F. A., M. Puype, J. Vandekerckhove et G. Warren (1997). "GRASP65, a protein involved in the stacking of Golgi cisternae." Cell **91**(2): 253-62.
- Barrowman, J., M. Sacher et S. Ferro-Novick (2000). "TRAPP stably associates with the Golgi and is required for vesicle docking." EMBO J. **19**(5): 862-869.
- Bascom, R. A., S. Srinivasan et R. L. Nussbaum (1999). "Identification and Characterization of Golgin-84, a Novel Golgi Integral Membrane Protein with a Cytoplasmic Coiled-coil Domain." J Biol Chem **274**(5): 2953-2962.
- Beckers, C. J. M., M. R. Block, B. S. Glick, J. E. Rothman et W. E. Balch (1989). "Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive factor." Nature **339**: 397-400.
- Bednarek, S. Y. et T. G. Falbel (2002). "Membrane trafficking during plant cytokinesis." Traffic **3**(9): 621-9.
- Beites, C. L., H. Xie, R. Bowser et W. S. Trimble (1999). "The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis." Nat Neurosci **2**(5): 434-9.
- Bell, A. W., M. A. Ward, W. P. Blackstock, H. N. Freeman, J. S. Choudhary, A. P. Lewis, D. Chotai,

- A. Fazel, J. N. Gushue, J. Paiement, S. Palcy, E. Chevet, M. Lafreniere-Roula, R. Solari, D. Y. Thomas, A. Rowley et J. J. Bergeron (2001). "Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins." J Biol Chem **276**(7): 5152-65.
- Bennett, M. K. et R. H. Scheller (1993). "The molecular machinery is conserved from yeast to neurons." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 2559-2563.
- Biocca, S. et A. Cattaneo (1995). "Intracellular immunization: antibody targetting to subcellular compartments." Trends Cell Biol. **5**: 59-63.
- Biocca, S., P. Pierandrei-Amaldi, N. Campioni et A. Cattaneo (1994). "Intracellular immunization with cytosolic recombinant antibodies." Biotechnology (N Y) **12**(4): 396-9.
- Block, M. R., B. S. Glick, C. A. Wilcox, F. T. Wieland et J. E. Rothman (1988). "Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 7852-7856.
- Bonfanti, L., A. A. Mironov, Jr., J. A. Martinez-Menarguez, O. Martella, A. Fusella, M. Baldassarre, R. Buccione, H. J. Geuze, A. A. Mironov et A. Luini (1998). "Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation [see comments]." Cell **95**(7): 993-1003.
- Bonifacino, J. S. et J. Lippincott-Schwartz (2003). "Opinion: Coat proteins: shaping membrane transport." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 409-14.
- Bosshart, H., P. Straehl, B. Berger et E. G. Berger (1991). "Brefeldin A induces endoplasmic reticulum-associated O-glycosylation of galactosyltransferase." J Cell Physiol **147**(1): 149-56.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders et F. McCormick (1990). "The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell function." Nature **348**: 125-132.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders et F. McCormick (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism." Nature **349**: 117-127.
- Brennecke, J., D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell et S. M. Cohen (2003). "bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila." Cell **113**(1): 25-36.
- Burgess, R. W., D. L. Deitcher et T. L. Schwarz (1997). "The synaptic protein syntaxin1 is required for cellularization of Drosophila embryos." J Cell Biol **138**(4): 861-75.
- Burke, B., G. Griffiths, H. Reggio, D. Louvard et G. Warren (1982). "A monoclonal antibody against a 135-K Golgi membrane protein." Embo J **1**(12): 1621-8.
- Burkhardt, J. K., C. J. Echeverri, T. Nilsson et R. B. Vallee (1997). "Overexpression of the dynamitin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution." J. Cell Biol. **139**(2): 469-484.
- Caloca, M. J., J. L. Zugaza et X. R. Bustelo (2003). "Exchange factors of the RasGRP family mediate Ras activation in the Golgi." J Biol Chem.
- Cao, X., N. Ballew et C. Barlowe (1998). "Initial docking of ER-derived vesicles requires Usa1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins." Embo J **17**(8): 2156-65.
- Caplen, N. J., J. Fleenor, A. Fire et R. A. Morgan (2000). "dsRNA-mediated gene silencing in cultured

- Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference." *Gene* **252**(1-2): 95-105.
- Cardinale, A., I. Filesi et S. Biocca (2001). "Aggresome formation by anti-Ras intracellular scFv fragments: The fate of the antigen-antibody complex." *Eur J Biochem* **268**(2): 268-277.
- Caron de Fromentel, C., N. Gruel, C. Venot, L. Debussche, E. Conseiller, C. Dureuil, J. L. Teillaud, B. Tocque et L. Bracco (1999). "Restoration of transcriptional activity of p53 mutants in human tumour cells by intracellular expression of anti-p53 single chain Fv fragments." *Oncogene* **18**(2): 551-7.
- Chabin-Brion, K., J. Marceiller, F. Perez, C. Settegrana, A. Drechou, G. Durand et C. Pous (2001). "The golgi complex is a microtubule-organizing organelle." *Mol Biol Cell* **12**(7): 2047-60.
- Chan, E. K. L. et M. J. Fritzler (1998). "Golgins: coiled-coil-rich proteins associated with the Golgi Complex." *EJB Electronic Journal of Biotechnology* **1**(2): <http://www.ejb.org/content/vol1/issue2/full/1/1.pdf>.
- Chardin, P. et F. McCormick (1999). "Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive." *Cell* **97**(2): 153-5.
- Chavrier, P. et B. Goud (1999). "The role of ARF and rab GTPases in membrane transport." *Curr Opin Cell Biol* **11**(4): 466-75.
- Chiu, R., L. Novikov, S. Mukherjee et D. Shields (2002). "A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis." *J. Cell Biol.* **159**(4): 637-648.
- Chiu, V. K., T. Bivona, A. Hach, J. B. Sajous, J. Silletti, H. Wiener, R. L. Johnson, 2nd, A. D. Cox et M. R. Philips (2002). "Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi." *Nat Cell Biol* **4**(5): 343-50.
- Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths et G. Winter (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." *Nature* **352**(6336): 624-8.
- Clary, D. O., I. C. Griff et J. E. Rothman (1990). "SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast." *Cell* **61**: 709-721.
- Cluett, E. B. et W. J. Brown (1992). "Adhesion of Golgi cisternae by proteinaceous interactions: intercisternal bridges as putative adhesive structures." *J Cell Sci* **103** (Pt 3): 773-84.
- Cochet, O., M. Kenigsberg, I. Delumeau, A. Virone-Oddos, M. C. Multon, W. H. Fridman, F. Schweighoffer, J. L. Teillaud et B. Tocque (1998). "Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression." *Cancer Res* **58**(6): 1170-6.
- Cohen, P. A. (2002). "Intrabodies. Targeting scFv expression to eukaryotic intracellular compartments." *Methods Mol Biol* **178**: 367-78.
- Cohen, P. A., J. C. Mani et D. P. Lane (1998). "Characterization of a new intrabody directed against the N-terminal region of human p53." *Oncogene* **17**(19): 2445-56.
- Colanzi, A., T. J. Deerinck, M. H. Ellisman et V. Malhotra (2000). "A specific activation of the mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis." *J Cell Biol* **149**(2): 331-9.
- Colanzi, A., C. Sutterlin et V. Malhotra (2003). "RAF1-activated MEK1 is found on the Golgi apparatus in late prophase and is required for Golgi

- complex fragmentation in mitosis." *J Cell Biol* **161**(1): 27-32.
- Cole, N. B., N. Sciaky, A. Marotta, J. Song et J. Lippincott-Schwartz (1996). "Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites." *Mol. Biol. Cell* **7**(4): 631-50.
- Colley, K. J. (1997). "Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers." *Glycobiology* **7**(1): 1-13.
- Conibear, E. et T. H. Stevens (1998). "Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast." *Biochim Biophys Acta* **1404**(1-2): 211-30.
- Conner, S. D. et G. M. Wessel (1999). "Syntaxin is required for cell division." *Mol Biol Cell* **10**(8): 2735-43.
- Cosson, O. et F. Letourneur (1994). "Coatomer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs." *Science* **263**: 1629-1631.
- Cosson, P., M. Amherdt, J. E. Rothman et L. Orci (2002). "A resident Golgi protein is excluded from peri-Golgi vesicles in NRK cells." *PNAS*: 192460999.
- Cuif, M.-H., F. Possmayer, H. Zander, N. Bordes, F. Jollivet, A. Couedel-Courteille, I. Janoueix-Lerosey, G. Langsley, M. Bornens et B. Goud (1999). "Characterization of GAPCenA, a GTPase activating protein for Rab6, part of which associates with the centrosome." *EMBO J.* **18**(7): 1772-1782.
- Dasso, M. (2002). "The Ran GTPase: theme and variations." *Curr Biol* **12**(14): R502-8.
- De Matteis, M. A. et J. S. Morrow (2000). "Spectrin tethers and mesh in the biosynthetic pathway." *J. Cell Sci.* **113**(Pt 13): 2331-43.
- de Renzis, S., B. Sonnichsen et M. Zerial (2002). "Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes." *Nat Cell Biol* **4**(2): 124-33.
- Deacon, S. W., A. S. Serpinskaya, P. S. Vaughan, M. Lopez Fanarraga, I. Vernos, K. T. Vaughan et V. I. Gelfand (2003). "Dynactin is required for bidirectional organelle transport." *J Cell Biol* **160**(3): 297-301.
- Deitz, S. B., A. Rambourg, F. Kepes et A. Franzusoff (2000). "Sec7p directs the transitions required for yeast Golgi biogenesis." *Traffic* **1**(2): 172-83.
- Deme' , B., M. Dubois, T. Gulik-Krzywicki et T. Thomas Zemb (2002). "Giant Collective Fluctuations of Charged Membranes at the Lamellar-to-Vesicle Unbinding Transition. 1. Characterization of a New Lipid Morphology by SANS, SAXS, and Electron Microscopy." *Langmuir* **18**: 997-1004.
- der Maur, A. A., C. Zahnd, F. Fischer, S. Spinelli, A. Honegger, C. Cambillau, D. Escher, A. Pluckthun et A. Barberis (2002). "Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework." *J Biol Chem* **277**(47): 45075-85.
- Desiderio, A., R. Franconi, M. Lopez, M. E. Villani, F. Viti, R. Chiaraluce, V. Consalvi, D. Neri et E. Benvenuto (2001). "A semi-synthetic repertoire of intrinsically stable antibody fragments derived from a single-framework scaffold." *J Mol Biol* **310**(3): 603-15.
- Di Girolamo, M., M. G. Silletta, M. A. De Matteis, A. Braca, A. Colanzi, D. Pawlak, M. M. Rasenick, A. Luini et D. Corda (1995). "Evidence that the 50-kDa substrate of brefeldin A-dependent ADP-ribosylation binds GTP and is modulated by the

- G-protein beta gamma subunit complex." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 7065-9.
- Diao, A., D. Rahman, D. J. C. Pappin, J. Lucocq et M. Lowe (2003). "The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation." J. Cell Biol. **160**(2): 201-212.
- Dirac-Svejstrup, A. B., J. Shorter, M. G. Waters et G. Warren (2000). "Phosphorylation of the vesicle-tethering protein p115 by a casein kinase II-like enzyme is required for Golgi reassembly from isolated mitotic fragments." J Cell Biol **150**(3): 475-88.
- Do Heo, W. et T. Meyer (2003). "Switch-of-Function Mutants Based on Morphology Classification of Ras Superfamily Small GTPases." Cell **113**(3): 315-28.
- Dominguez, M., K. Dejgaard, J. Fullekrug, S. Dahan, A. Fazel, J. P. Paccaud, D. Y. Thomas, J. J. Bergeron et T. Nilsson (1998). "gp25L/emp24/p24 protein family members of the cis-Golgi network bind both COP I and II coatomer." J Cell Biol **140**(4): 751-65.
- Dornan, S., A. P. Jackson et N. J. Gay (1997). "Alpha-adaptin, a marker for endocytosis, is expressed in complex patterns during *Drosophila* development." Mol Biol Cell **8**(8): 1391-403.
- Draviam, V. M., S. Orrechia, M. Lowe, R. Pardi et J. Pines (2001). "The Localization of Human Cyclins B1 and B2 Determines CDK1 Substrate Specificity and Neither Enzyme Requires MEK to Disassemble the Golgi Apparatus." J. Cell Biol. **152**(5): 945-958.
- Dubel, S., F. Breitling, R. Kontermann, T. Schmidt, A. Skerra et M. Little (1995). "Bifunctional and multimeric complexes of streptavidin fused to single chain antibodies (scFv)." J Immunol Methods **178**(2): 201-9.
- Duclos, S., R. Corsini et M. Desjardins (2003). "Remodeling of endosomes during lysosome biogenesis involves 'kiss and run' fusion events regulated by rab5." J Cell Sci **116**(Pt 5): 907-18.
- Dumas, J. J., E. Merithew, E. Sudharshan, D. Rajamani, S. Hayes, D. Lawe, S. Corvera et D. G. Lambright (2001). "Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1." Mol Cell **8**(5): 947-58.
- Dunne, J. C., V. Kondylis et C. Rabouille (2002). "Ecdysone triggers the expression of Golgi genes in *Drosophila* imaginal discs via broad-complex." Dev Biol **245**(1): 172-86.
- Dwyer, N. et G. Blobel (1976). "A modified procedure for the isolation of a pore complex-lamina fraction from rat liver nuclei." J Cell Biol **70**(3): 581-91.
- Echard, A., F. Jollivet, O. Martinez, J. J. Lacapere, A. Rousselet, I. Janoueix-Lerosey et B. Goud (1998). "Interaction of a Golgi-associated kinesin-like protein with Rab6." Science **279**(5350): 580-5.
- Echard, A., F. J. Opdam, H. J. de Leeuw, F. Jollivet, P. Savelkoul, W. Hendriks, J. Voorberg, B. Goud et J. A. Fransen (2000). "Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms." Mol Biol Cell **11**(11): 3819-33.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber et T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." Nature **411**(6836): 494-8.
- Elbashir, S. M., W. Lendeckel et T. Tuschl (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev **15**(2): 188-200.

- Etienne-Manneville, S. et A. Hall (2002). "Rho GTPases in cell biology." *Nature* **420**(6916): 629-35.
- Falguières, T., F. Mallard, C. Baron, D. Hanau, C. Lingwood, B. Goud, J. Salamero et L. Johannes (2001). "Targeting of shiga toxin b-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes." *Mol Biol Cell* **12**(8): 2453-68.
- Farmaki, T., S. Ponnambalam, A. R. Prescott, H. Clausen, B. L. Tang, W. Hong et J. M. Lucocq (1999). "Forward and retrograde trafficking in mitotic animal cells. ER-Golgi transport arrest restricts protein export from the ER into COPII-coated structures." *J Cell Sci* **112**(Pt 5): 589-600.
- Farquhar, M. G. et G. E. Palade (1981). "The Golgi apparatus (complex) - (1954-1981) - from artifact to center stage." *J. Cell Biol.* **91**: 77s-103s.
- Farsad, K., N. Ringstad, K. Takei, S. R. Floyd, K. Rose et P. De Camilli (2001). "Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions." *J. Cell Biol.* **155**(2): 193-200.
- Feldhaus, M. J., R. W. Siegel, L. K. Opresko, J. R. Coleman, J. M. Feldhaus, Y. A. Yeung, J. R. Cochran, P. Heinzelman, D. Colby, J. Swers, C. Graff, H. S. Wiley et K. D. Wittrup (2003). "Flow-cytometric isolation of human antibodies from a nonimmune *Saccharomyces cerevisiae* surface display library." *Nat Biotechnol.*
- Feng, Y., S. Yu, T. K. Lasell, A. P. Jadhav, E. Macia, P. Chardin, P. Melancon, M. Roth, T. Mitchison et T. Kirchhausen (2003). "Exo1: A new chemical inhibitor of the exocytic pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Finger, F. P. et J. G. White (2002). "Fusion and fission: membrane trafficking in animal cytokinesis." *Cell* **108**(6): 727-30.
- Fire, A. (1999). "RNA-triggered gene silencing." *Trends Genet* **15**(9): 358-63.
- Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver et C. C. Mello (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-11.
- Fontijn, R. D., B. Goud, A. Echard, F. Jollivet, J. van Marle, H. Pannekoek et A. J. Horrevoets (2001). "The human kinesin-like protein RB6K is under tight cell cycle control and is essential for cytokinesis." *Mol Cell Biol* **21**(8): 2944-55.
- Gaidarov, I., F. Santini, R. A. Warren et J. H. Keen (1999). "Spatial control of coated-pit dynamics in living cells." *Nat Cell Biol* **1**(1): 1-7.
- Galjart, N. et F. Perez (2003). "A plus-end raft to control microtubule dynamics and function." *Curr Opin Cell Biol* **15**(1): 48-53.
- Gao, C., S. Mao, G. Kaufmann, P. Wirsching, R. A. Lerner et K. D. Janda (2002). "A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display." *PNAS*: 192467999.
- Gaynor, E. C. et S. D. Emr (1997). "COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants." *J Cell Biol* **136**(4): 789-802.
- Gillingham, A. K., A. C. Pfeifer et S. Munro (2002). "CASP, the Alternatively Spliced Product of the Gene Encoding the CCAAT-Displacement Protein Transcription Factor, Is a Golgi Membrane Protein Related to Giantin." *Mol. Biol. Cell* **13**(11): 3761-3774.
- Girod, A., B. Storrie, J. C. Simpson, L. Johannes, B. Goud, L. M. Roberts,

- J. M. Lord, T. Nilsson et R. Pepperkok (1999). "Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum." Nat Cell Biol **1**(7): 423-30.
- Glaser, P. E., X. Han et R. W. Gross (2002). "Tubulin is the endogenous inhibitor of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoform that catalyzes membrane fusion: Implications for the coordinated regulation of glycolysis and membrane fusion." PNAS **99**(22): 14104-14109.
- Glick, B. S. (2002). "Can the Golgi form de novo?" Nat Rev Mol Cell Biol **3**(8): 615-9.
- Godi, A., P. Pertile, R. Meyers, P. Marra, G. Di Tullio, C. Iurisci, A. Luini, D. Corda et M. A. De Matteis (1999). "ARF mediates recruitment of PtdIns-4-OH kinase-beta and stimulates synthesis of PtdIns(4,5)P2 on the Golgi complex." Nat Cell Biol **1**(5): 280-7.
- Godi, A., I. Santone, P. Pertile, P. Devarajan, P. R. Stabach, J. S. Morrow, G. Di Tullio, R. Polishchuk, T. C. Petrucci, A. Luini et M. A. De Matteis (1998). "ADP ribosylation factor regulates spectrin binding to the Golgi complex." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(15): 8607-12.
- Goldberg, J. (1999). "Structural and functional analysis of the ARF1-ARFGAP complex reveals a role for coatamer in GTP hydrolysis." Cell **96**(6): 893-902.
- Gomez, M., S. J. Scales, T. E. Kreis et F. Perez (2000). "Membrane Recruitment of Coatamer and Binding to Dilysine Signals Are Separate Events." J. Biol. Chem. **275**(37): 29162-29169.
- Griffiths, A. D., M. Malmqvist, J. D. Marks, J. M. Bye, M. J. Embleton, J. McCafferty, M. Baier, K. P. Holliger, B. D. Gorick, N. C. Hughes-Jones et et al. (1993). "Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries." Embo J. **12**(2): 725-34.
- Griffiths, A. D., S. C. Williams, O. Hartley, I. M. Tomlinson, P. Waterhouse, W. L. Crosby, R. E. Kontermann, P. T. Jones, N. M. Low, T. J. Allison et et al. (1994). "Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires." Embo J **13**(14): 3245-60.
- Gruneberg, U. et E. A. Nigg (2003). "Regulation of cell division: stop the SIN!" Trends Cell Biol **13**(4): 159-62.
- Guo, W., D. Roth, C. Walch-Solimena et P. Novick (1999). "The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis." Embo J **18**(4): 1071-80.
- Hanes, J., L. Jermutus, S. Weber-Bornhauser, H. R. Bosshard et A. Plückthun (1998). "Ribosome display efficiently selects and evolves high-affinity antibodies in vitro from immune libraries." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14130-14135.
- Hanes, J. et A. Pluckthun (1997). "In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 4937-42.
- Hanes, J., C. Schaffitzel, A. Knappik et A. Pluckthun (2000). "Picomolar affinity antibodies from a fully synthetic naive library selected and evolved by ribosome display." Nat Biotechnol **18**(12): 1287-92.
- Happe, S. et P. Weidman (1998). "Cell-free transport to distinct Golgi cisternae is compartment specific and ARF independent." J Cell Biol **140**(3): 511-23.
- Hassanzadeh Gh, G., N. Devoogdt, A. Ghysen, P. De Baetselier, S.

- Muyldermans et C. Dambly-Chaudiere (1998). "The regulated expression of an intrabody produces a mutant phenotype in *Drosophila*." *FEBS Lett* **437**(1-2): 81-6.
- Hieda, M., T. Tachibana, F. Yokoya, S. Kose, N. Imamoto et Y. Yoneda (1999). "A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells." *J Cell Biol* **144**(4): 645-55.
- Hill, E., M. Clarke et F. A. Barr (2000). "The Rab6-binding kinesin, Rab6-KIFL, is required for cytokinesis." *Embo J* **19**(21): 5711-9.
- Hinshaw, J. E. et S. L. Schmid (1995). "Dynamain self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding." *Nature* **374**: 190-192.
- Hirschberg, K., C. M. Miller, J. Ellenberg, J. F. Presley, E. D. Siggia, R. D. Phair et J. Lippincott-Schwartz (1998). "Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells." *J Cell Biol* **143**(6): 1485-503.
- Holleran, E. A., L. A. Ligon, M. Tokito, M. C. Stankewich, J. S. Morrow et E. L. Holzbaur (2001). "beta III spectrin binds to the Arp1 subunit of dynactin." *J Biol Chem* **276**(39): 36598-605.
- Hoogenboom, H. R. (1997). "Designing and optimizing library selection strategies for generating high-affinity antibodies." *Trends Biotechnol* **15**(2): 62-70.
- Hoogenboom, H. R. et G. Winter (1992). "By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro." *J Mol Biol* **227**(2): 381-8.
- Hoogenraad, C. C., A. Akhmanova, S. A. Howell, B. R. Dortland, C. I. De Zeeuw, R. Willemsen, P. Visser, F. Grosveld et N. Galjart (2001). "Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes." *Embo J* **20**(15): 4041-54.
- Hu, F. et S. J. Elledge (2002). "Bub2 is a cell cycle regulated phospho-protein controlled by multiple checkpoints." *Cell Cycle* **1**(5): 351-5.
- Hu, F., Y. Wang, D. Liu, Y. Li, J. Qin et S. J. Elledge (2001). "Regulation of the Bub2/Bfa1 GAP complex by Cdc5 and cell cycle checkpoints." *Cell* **107**(5): 655-65.
- Hudson, P. J. (1999). "Recombinant antibody constructs in cancer therapy." *Curr Opin Immunol* **11**(5): 548-57.
- Ivessa, N. E., C. De Lemos-Chiarandini, Y. S. Tsao, A. Takatsuki, M. Adesnik, D. D. Sabatini et G. Kreibich (1992). "O-glycosylation of intact and truncated ribophorins in brefeldin A-treated cells: newly synthesized intact ribophorins are only transiently accessible to the relocated glycosyltransferases." *J Cell Biol* **117**(5): 949-58.
- Jackman, M., M. Firth et J. Pines (1995). "Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus." *Embo J* **14**(8): 1646-54.
- Jackson, M. R., T. Nilsson et P. A. Peterson (1990). "Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum." *Embo J* **9**(10): 3153-62.
- Jackson, M. R., T. Nilsson et P. A. Peterson (1993). "Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* **121**(2): 317-33.

- Jantsch-Plunger, V. et M. Glotzer (1999). "Depletion of syntaxins in the early *Caenorhabditis elegans* embryo reveals a role for membrane fusion events in cytokinesis." Curr Biol **9**(14): 738-45.
- Jesch, S. A., T. S. Lewis, N. G. Ahn et A. D. Linstedt (2001). "Mitotic phosphorylation of Golgi reassembly stacking protein 55 by mitogen-activated protein kinase ERK2." Mol Biol Cell **12**(6): 1811-7.
- Jesch, S. A. et A. D. Linstedt (1998). "The Golgi and endoplasmic reticulum remain independent during mitosis in HeLa cells." Mol Biol Cell **9**(3): 623-35.
- Jesch, S. A., A. J. Mehta, M. Velliste, R. F. Murphy et A. D. Linstedt (2001). "Mitotic Golgi is in a dynamic equilibrium between clustered and free vesicles independent of the ER." Traffic **2**(12): 873-84.
- Joiner, K. A. et D. S. Roos (2002). "Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more." J Cell Biol **157**(4): 557-63.
- Jokitalo, E., N. Cabrera-Poch, G. Warren et D. T. Shima (2001). "Golgi clusters and vesicles mediate mitotic inheritance independently of the endoplasmic reticulum." J. Cell Biol. **154**(2): 317-330.
- Julicher, F. et R. Lipowsky (1993). "Domain-induced budding of vesicles." Physical Review Letters **70**(19): 2964-2967.
- Kalab, P., K. Weis et R. Heald (2002). "Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts." Science **295**(5564): 2452-6.
- Kano, F., K. Takenaka, A. Yamamoto, K. Nagayama, E. Nishida et M. Murata (2000). "MEK and Cdc2 Kinase Are Sequentially Required for Golgi Disassembly in MDCK Cells by the Mitotic *Xenopus* Extracts." J. Cell Biol. **149**(2): 357-368.
- Kay, B. K., J. Winter et J. McCafferty (1996). Phage Display of Peptides and Proteins: a Laboratory Manual. San Diego, USA, Academic Press.
- Keller, P., D. Toomre, E. Diaz, J. White et K. Simons (2001). "Multicolour imaging of post-Golgi sorting and trafficking in live cells." Nat Cell Biol **3**(2): 140-9.
- King, S. J. et T. A. Schroer (2000). "Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor." Nat Cell Biol **2**(1): 20-4.
- Kinoshita, K., I. Arnal, A. Desai, D. N. Drechsel et A. A. Hyman (2001). "Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components." Science **294**(5545): 1340-3.
- Kjer-Nielsen, L., R. D. Teasdale, C. van Vliet et P. A. Gleeson (1999). "A novel Golgi-localisation domain shared by a class of coiled-coil peripheral membrane proteins." Curr Biol **9**(7): 385-8.
- Kondylis, V., S. E. Goulding, J. C. Dunne et C. Rabouille (2001). "Biogenesis of Golgi stacks in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*." Mol Biol Cell **12**(8): 2308-27.
- Kondylis, V. et C. Rabouille (2003). "A novel role for dp115 in the organization of tER sites in *Drosophila*." J Cell Biol **162**(2): 185-98.
- Kornfeld, S. (1992). "Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors." Annu Rev Biochem **61**: 307-30.
- Kraynov, V. S., C. Chamberlain, G. M. Bokoch, M. A. Schwartz, S. Slabaugh et K. M. Hahn (2000). "Localized Rac Activation Dynamics Visualized in Living Cells." Science **290**(5490): 333-337.

- Kreis, T. E., H. V. Goodson, F. Perez et R. Rönholm (1997). Golgi apparatus-cytoskeleton interactions. The Golgi apparatus. E. G. Berger et J. Roth. Basel (Switzerland), Birkhäuser Verlag: 179-193.
- Lafont, F., S. Lecat, P. Verkade et K. Simons (1998). "Annexin XIIIb associates with lipid microdomains to function in apical delivery." J Cell Biol **142**(6): 1413-27.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel et T. Tuschl (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science **294**(5543): 853-8.
- Lane, J. D., J. Lucocq, J. Pryde, F. A. Barr, P. G. Woodman, V. J. Allan et M. Lowe (2002). "Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis." J. Cell Biol. **0**(2002): 200110007-b-15.
- Lanoix, J., J. Ouwendijk, A. Stark, E. Szafer, D. Cassel, K. Dejgaard, M. Weiss et T. Nilsson (2001). "Sorting of Golgi resident proteins into different subpopulations of COPI vesicles: a role for ArfGAP1." J Cell Biol **155**(7): 1199-212.
- Le Borgne, R. et B. Hoflack (1998). "Protein transport from the secretory to the endocytic pathway in mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1404**(1-2): 195-209.
- Lecerf, J.-M., T. L. Shirley, Q. Zhu, A. Kazantsev, P. Amersdorfer, D. E. Housman, A. Messer et J. S. Huston (2001). "Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**(8): 4764-4769.
- Lecuit, T. et E. Wieschaus (2000). "Polarized insertion of new membrane from a cytoplasmic reservoir during cleavage of the *Drosophila* embryo." J Cell Biol **150**(4): 849-60.
- Lee, S., T. Furuya, T. Kiyota, N. Takami, K. Murata, Y. Niidome, D. E. Bredesen, H. M. Ellerby et G. Sugihara (2001). "De novo designed peptide transforms Golgi-specific lipids into Golgi-like nanotubules." J Biol Chem.
- Lee, T. H. et A. D. Linstedt (1999). "Osmotically induced cell volume changes alter anterograde and retrograde transport, Golgi structure, and COPI dissociation." Molecular Biology of the Cell **10**(5): 1445-62.
- Lee, T. H. et A. D. Linstedt (2000). "Potential role for protein kinases in regulation of bidirectional endoplasmic reticulum-to-golgi transport revealed by protein kinase inhibitor H89." Mol Biol Cell **11**(8): 2577-90.
- Lesca, G. M., J. Seemann, J. Shorter, J. Vandekerckhove et G. Warren (2000). "The amino-terminal domain of the golgi protein giantin interacts directly with the vesicle-tethering protein p115." J Biol Chem **275**(4): 2831-6.
- Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Démollière, R. Duden, S. Emr, H. Riezman et P. Cosson (1994). "Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum." Cell **79**: 1199-1207.
- Levine, T. P., C. Rabouille, R. H. Kieckbusch et G. Warren (1996). "Binding of the vesicle docking protein p115 to Golgi membranes is inhibited under mitotic conditions." J Biol Chem **271**(29): 17304-11.
- Li, Z., C. D. Aizenman et H. T. Cline (2002). "Regulation of rho GTPases by crosstalk and neuronal activity in vivo." Neuron **33**(5): 741-50.

- Liang, M., S. Dubel, D. Li, I. Queitsch, W. Li et E. K. Bautz (2001). "Baculovirus expression cassette vectors for rapid production of complete human IgG from phage display selected antibody fragments." J Immunol Methods **247**(1-2): 119-130.
- Lin, C. Y., M. L. Madsen, F. R. Yarm, Y. J. Jang, X. Liu et R. L. Erikson (2000). "Peripheral Golgi protein GRASP65 is a target of mitotic polo-like kinase (Plk) and Cdc2." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(23): 12589-94.
- Linstedt, A. D., M. Foguet, M. Renz, H. P. Seelig, B. S. Glick et H.-P. Hauri (1995). "A C-terminally-anchored Golgi protein is inserted into the endoplasmic reticulum and then transported to the Golgi apparatus." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 5102-5105.
- Linstedt, A. D. et H. P. Hauri (1993). "Giantin, a novel conserved Golgi membrane protein containing a cytoplasmic domain of at least 350 kDa." Mol Biol Cell **4**(7): 679-93.
- Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp et A. Kenworthy (2001). "Studying protein dynamics in living cells." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(6): 444-56.
- Liu, B., L. Huang, C. Sihlbom, A. Burlingame et J. D. Marks (2002). "Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display." J Mol Biol **315**(5): 1063-73.
- Liu, B. et J. D. Marks (2000). "Applying Phage Antibodies to Proteomics: Selecting Single Chain Fv Antibodies to Antigens Blotted on Nitrocellulose." Analytical Biochem. **286**: 119-128.
- Louvard, D., H. Reggio et G. Warren (1982). "Antibodies to the Golgi complex and the rough endoplasmic reticulum." J Cell Biol **92**(1): 92-107.
- Lowe, M. (2002). "Golgi Complex: Biogenesis de novo?" Curr Biol **12**(5): R166-7.
- Lowe, M., N. K. Gonatas et G. Warren (2000). "The mitotic phosphorylation cycle of the cis-Golgi matrix protein GM130." J Cell Biol **149**(2): 341-56.
- Lowe, M., N. Nakamura et G. Warren (1998). "Golgi division and membrane traffic." Trends Cell Biol **8**(1): 40-4.
- Lowe, M., C. Rabouille, N. Nakamura, R. Watson, M. Jackman, E. Jamsa, D. Rahman, D. J. Pappin et G. Warren (1998). "Cdc2 kinase directly phosphorylates the cis-Golgi matrix protein GM130 and is required for Golgi fragmentation in mitosis." Cell **94**(6): 783-93.
- Lu, J. et S. R. Sloan (1999). "An alternating selection strategy for cloning phage display antibodies." J Immunol Methods **228**(1-2): 109-19.
- Lucocq, J. M., E. G. Berger et G. Warren (1989). "Mitotic Golgi fragments in HeLa cells and their role in the reassembly pathway." J Cell Biol **109**(2): 463-74.
- Lucocq, J. M., J. G. Pryde, E. G. Berger et G. Warren (1987). "A mitotic form of the Golgi apparatus in HeLa cells." J Cell Biol **104**(4): 865-74.
- Lucocq, J. M. et G. Warren (1987). "Fragmentation and partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in HeLa cells." Embo J **6**(11): 3239-46.
- Luo, Z. et D. Gallwitz (2003). "Biochemical and genetic evidence for the involvement of yeast Ypt6-GTPase in protein retrieval to different Golgi compartments." J Biol Chem **278**(2): 791-9.
- Machamer, C. E. (2003). "Golgi disassembly in apoptosis: cause or effect?" Trends Cell Biol **13**(6): 279-81.

- Malhotra, V., L. Orci, B. S. Glick, M. R. Block et J. E. Rothman (1988). "Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack." Cell **54**: 221-227.
- Malhotra, V., T. Serafini, L. Orci, J. C. Shepherd et J. E. Rothman (1989). "Purification of a novel class of coated vesicles mediating biosynthetic protein transport through the Golgi stack." Cell **58**: 329-338.
- Mallard, F., C. Antony, D. Tenza, J. Salamero, B. Goud et L. Johannes (1998). "Direct Pathway from Early/Recycling Endosomes to the Golgi Apparatus Revealed through the Study of Shiga Toxin B-fragment Transport." J. Cell Biol. **143**(4): 973-990.
- Mallard, F., B. L. Tang, T. Galli, D. Tenza, A. Saint-Pol, X. Yue, C. Antony, W. Hong, B. Goud et L. Johannes (2002). "Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform." J Cell Biol **156**(4): 653-64.
- Mancini, M., C. E. Machamer, S. Roy, D. W. Nicholson, N. A. Thornberry, L. A. Casciola-Rosen et A. Rosen (2000). "Caspase-2 Is Localized at the Golgi Complex and Cleaves Golgin-160 during Apoptosis." J. Cell Biol. **149**(3): 603-612.
- Marra, P., T. Maffucci, T. Daniele, G. D. Tullio, Y. Ikehara, E. K. Chan, A. Luini, G. Beznoussenko, A. Mironov et M. A. De Matteis (2001). "The GM130 and GRASP65 Golgi proteins cycle through and define a subdomain of the intermediate compartment." Nat Cell Biol **3**(12): 1101-13.
- Marsh, B. J., D. N. Mastronarde, K. F. Buttle, K. E. Howell et J. R. McIntosh (2001). "Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2399-406.
- Marti, M., Y. Li, E. M. Schraner, P. Wild, P. Kohler et A. B. Hehl (2003). "The Secretory Apparatus of an Ancient Eukaryote: Protein Sorting to Separate Export Pathways Occurs Before Formation of Transient Golgi-like Compartments." Mol Biol Cell **14**(4): 1433-47.
- Marti, M., A. Regos, Y. Li, E. M. Schraner, P. Wild, N. Muller, L. G. Knopf et A. B. Hehl (2003). "An ancestral secretory apparatus in the protozoan parasite giardia intestinalis." J Biol Chem.
- Martin-Lluesma, S., V. M. Stucke et E. A. Nigg (2002). "Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2." Science **297**(5590): 2267-70.
- Martinez, O., C. Antony, G. Pehau-Arnaudet, E. G. Berger, J. Salamero et B. Goud (1997). "GTP-bound forms of rab6 induce the redistribution of Golgi proteins into the endoplasmic reticulum." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1828-33.
- Martinez, O., A. Schmidt, J. Salaméro, B. Hoflack, M. Roa et B. Goud (1994). "The small GTP-binding protein rab6 functions in intra-Golgi transport." J. Cell Biol. **127**: 1575-1588.
- Martinez-Menarguez, J. A., H. J. Geuze, J. W. Slot et J. Klumperman (1999). "Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles." Cell **98**(1): 81-90.
- Martinez-Menarguez, J. A., R. Prekeris, V. M. Oorschot, R. Scheller, J. W. Slot, H. J. Geuze et J. Klumperman (2001). "Peri-Golgi vesicles

- contain retrograde but not anterograde proteins consistent with the cisternal progression model of intra-Golgi transport." *J Cell Biol* **155**(7): 1213-24.
- Matanis, T., A. Akhmanova, P. Wulf, E. Del Nery, T. Weide, T. Stepanova, N. Galjart, F. Grosveld, B. Goud, C. I. De Zeeuw, A. Barnekow et C. C. Hoogenraad (2002). "Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex." *Nat Cell Biol* **4**(12): 986-92.
- Mayr, P. S., V. J. Allan et P. G. Woodman (1999). "Phosphorylation of p97(VCP) and p47 in vitro by p34cdc2 kinase." *Eur J Cell Biol* **78**(4): 224-32.
- McBride, H. M., V. Rybin, C. Murphy, A. Giner, R. Teasdale et M. Zerial (1999). "Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13." *Cell* **98**(3): 377-86.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter et D. J. Chiswell (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." *Nature* **348**(6301): 552-4.
- McNew, J. A., F. Parlati, R. Fukuda, R. J. Johnston, K. Paz, F. Paumet, T. H. Sollner et J. E. Rothman (2000). "Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins." *Nature* **407**(6801): 153-9.
- Miles, S., H. McManus, K. E. Forsten et B. Storrie (2001). "Evidence that the entire Golgi apparatus cycles in interphase HeLa cells: sensitivity of Golgi matrix proteins to an ER exit block." *J. Cell Biol.* **155**(4): 543-556.
- Mironov, A., A. Colanzi, M. G. Silletta, G. Fiucci, S. Flati, A. Fusella, R. Polishchuk, A. Mironov, Jr., G. Di Tullio, R. Weigert, V. Malhotra, D. Corda, M. A. De Matteis et A. Luini (1997). "Role of NAD⁺ and ADP-ribosylation in the maintenance of the Golgi structure." *J Cell Biol* **139**(5): 1109-18.
- Mironov, A. A., G. V. Beznoussenko, P. Nicoziani, O. Martella, A. Trucco, H. S. Kweon, D. Di Giandomenico, R. S. Polishchuk, A. Fusella, P. Lupetti, E. G. Berger, W. J. Geerts, A. J. Koster, K. N. Burger et A. Luini (2001). "Small cargo proteins and large aggregates can traverse the Golgi by a common mechanism without leaving the lumen of cisternae." *J Cell Biol* **155**(7): 1225-38.
- Misteli, T. et G. Warren (1994). "COP-coated vesicles are involved in the mitotic fragmentation of Golgi stacks in a cell-free system." *J Cell Biol* **125**(2): 269-82.
- Misteli, T. et G. Warren (1995). "A role for tubular networks and a COP I-independent pathway in the mitotic fragmentation of Golgi stacks in a cell-free system." *J Cell Biol* **130**(5): 1027-39.
- Misumi, Y., M. Sohda, A. Tashiro, H. Sato et Y. Ikehara (2001). "An Essential Cytoplasmic Domain for the Golgi Localization of Coiled-coil Proteins with a COOH-terminal Membrane Anchor." *J. Biol. Chem.* **276**(9): 6867-6873.
- Morsomme, P. et H. Riezman (2002). "The Rab GTPase Ypt1p and tethering factors couple protein sorting at the ER to vesicle targeting to the Golgi apparatus." *Dev Cell* **2**(3): 307-17.
- Moyer, B. D., B. B. Allan et W. E. Balch (2001). "Rab1 Interaction with a GM130 Effector Complex Regulates COPII Vesicle cis-Golgi Tethering." *Traffic* **2**(4): 268-276.
- Muller, J., C. Rabouille, R. Newman, J. Shorter, P. Freemont, G. Schiavo, G. Warren et D. T. Shima (1999).

- "An NSF function distinct from ATPase-dependent SNARE disassembly is essential for Golgi membrane fusion." Nat Cell Biol **1**(6): 335-340.
- Muller, J. M., J. Shorter, R. Newman, K. Deinhardt, Y. Sagiv, Z. Elazar, G. Warren et D. T. Shima (2002). "Sequential SNARE disassembly and GATE-16-GOS-28 complex assembly mediated by distinct NSF activities drives Golgi membrane fusion." J Cell Biol **157**(7): 1161-73.
- Munro, S. et B. J. Nichols (1999). "The GRIP domain - a novel Golgi-targeting domain found in several coiled-coil proteins." Curr. Biol. **9**(7): 377-80.
- Munro, S. et H. R. Pelham (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." Cell **48**(5): 899-907.
- Muresan, V., M. C. Stankewich, W. Steffen, J. S. Morrow, E. L. Holzbaur et B. J. Schnapp (2001). "Dynactin-dependent, dynein-driven vesicle transport in the absence of membrane proteins: a role for spectrin and acidic phospholipids." Mol Cell **7**(1): 173-83.
- Nakamura, N., M. Lowe, T. P. Levine, C. Rabouille et G. Warren (1997). "The vesicle docking protein p115 binds GM130, a cis-Golgi matrix protein, in a mitotically regulated manner." Cell **89**(3): 445-455.
- Nakamura, N., C. Rabouille, R. Watson, T. Nilsson, N. Hui, P. Slusarewicz, T. E. Kreis et G. Warren (1995). "Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130." J. Cell Biol. **131**(6 Pt 2): 1715-1726.
- Nedelec, F. (2002). "Computer simulations reveal motor properties generating stable antiparallel microtubule interactions." J Cell Biol **158**(6): 1005-15.
- Nedelec, F., T. Surrey et E. Karsenti (2003). "Self-organisation and forces in the microtubule cytoskeleton." Curr Opin Cell Biol **15**(1): 118-24.
- Nedelec, F. J., T. Surrey, A. C. Maggs et S. Leibler (1997). "Self-organization of microtubules and motors." Nature **389**(6648): 305-8.
- Nelson, D., T. Piran et S. Weinberg (1987). Statistical Mechanics of Membranes and Surfaces. Jerusalem Winter School for Theoretical Physics, Jerusalem, Israel.
- Nichols, B. J., A. K. Kenworthy, R. S. Polishchuk, R. Lodge, T. H. Roberts, K. Hirschberg, R. D. Phair et J. Lippincott-Schwartz (2001). "Rapid Cycling of Lipid Raft Markers between the Cell Surface and Golgi Complex." J. Cell Biol. **153**(3): 529-542.
- Nilsson, J., K. Weis et J. Kjems (2002). "The C-terminal extension of the small GTPase Ran is essential for defining the GDP-bound form." J Mol Biol **318**(2): 583-93.
- Nilsson, T., M. H. Hoe, P. Slusarewicz, C. Rabouille, R. Watson, F. Hunte, G. Watzele, E. G. Berger et G. Warren (1994). "Kin recognition between medial Golgi enzymes in HeLa cells." EMBO J. **13**: 562-574.
- Nilsson, T., C. Rabouille, N. Hui, R. Watson et G. Warren (1996). "The role of the membrane-spanning domain and stalk region of N-acetylglucosaminyltransferase I in retention, kin recognition and structural maintenance of the Golgi apparatus in HeLa cells." J Cell Sci **109** (Pt 7): 1975-89.
- Nishimura, N. et W. E. Balch (1997). "A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum." Science **277**(5325): 556-8.
- Nishimura, N., S. Bannykh, S. Slabough, J. Matteson, Y. Altschuler, K. Hahn

- et W. E. Balch (1999). "A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **274**(22): 15937-46.
- Nishimura, N., H. Plutner, K. Hahn et W. E. Balch (2002). "The delta subunit of AP-3 is required for efficient transport of VSV-G from the trans-Golgi network to the cell surface." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(10): 6755-60.
- Niswonger, M. L. et T. J. O'Halloran (1997). "A novel role for clathrin in cytokinesis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(16): 8575-8.
- Nizak, C., S. Monier, E. del Nery, S. Moutel, B. Goud et F. Perez (2003). "Recombinant antibodies to the small GTPase Rab6 as conformation sensors." Science **300**(5621): 984-7.
- Norman, T. C., D. L. Smith, P. K. Sorger, B. L. Drees, S. M. O'Rourke, T. R. Hughes, C. J. Roberts, S. H. Friend, S. Fields et A. W. Murray (1999). "Genetic selection of peptide inhibitors of biological pathways." Science **285**(5427): 591-5.
- Novick, P., S. Ferro et R. Schekman (1981). "Order of events in the yeast secretory pathway." Cell **25**: 461-469.
- Novick, P., C. Field et R. Schekman (1980). "Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway." Cell **21**: 205-215.
- O'Halloran, T. J. (2000). "Membrane traffic and cytokinesis." Traffic **1**(12): 921-6.
- Oprins, A., C. Rabouille, G. Posthuma, J. Klumperman, H. J. Geuze et J. W. Slot (2001). "The ER to Golgi interface is the major concentration site of secretory proteins in the exocrine pancreatic cell." Traffic **2**(11): 831-8.
- Orci, L., M. Amherdt, M. Ravazzola, A. Perrelet et J. E. Rothman (2000). "Exclusion of golgi residents from transport vesicles budding from Golgi cisternae in intact cells." J Cell Biol **150**(6): 1263-70.
- Orci, L., B. S. Glick et J. E. Rothman (1986). "A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack." Cell **46**: 171-184.
- Orci, L., A. Perrelet et J. E. Rothman (1998). "Vesicles on strings: morphological evidence for processive transport within the Golgi stack." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2279-83.
- Orci, L., M. Starnes, M. Ravazzola, M. Amherdt, A. Perrelet, T. H. Sollner et J. E. Rothman (1997). "Bidirectional transport by distinct populations of COPI-coated vesicles." Cell **90**(2): 335-49.
- Ortiz, D., M. Medkova, C. Walch-Solimena et P. Novick (2002). "Ypt32 recruits the Sec4p guanine nucleotide exchange factor, Sec2p, to secretory vesicles; evidence for a Rab cascade in yeast." J. Cell Biol. **157**(6): 1005-1016.
- Osborn, J. K., E. J. Derbyshire, T. J. Vaughan, A. W. Field et K. S. Johnson (1998). "Pathfinder selection: in situ isolation of novel antibodies." Immunotechnology **3**(4): 293-302.
- Patterson, G. H. et J. Lippincott-Schwartz (2002). "A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells." Science **297**(5588): 1873-1877.
- Pelletier, L., E. Jokitalo et G. Warren (2000). "The effect of Golgi depletion on exocytic transport." Nat Cell Biol **2**(11): 840-846.
- Pelletier, L., C. A. Stern, M. Pypaert, D. Sheff, H. M. Ngo, N. Roper, C. Y. He, K. Hu, D. Toomre, I. Coppens, D. S. Roos, K. A. Joiner et G.

- Warren (2002). "Golgi biogenesis in *Toxoplasma gondii*." Nature **418**(6897): 548-52.
- Pepperkok, R., J. A. Whitney, M. Gomez et T. E. Kreis (2000). "COPI vesicles accumulating in the presence of a GTP restricted arf1 mutant are depleted of anterograde and retrograde cargo." J Cell Sci **113** (Pt 1): 135-44.
- Perez, F., K. Pernet-Gallay, C. Nizak, H. V. Goodson, T. E. Kreis et B. Goud (2002). "CLIPR-59, a new trans-Golgi/TGN cytoplasmic linker protein belonging to the CLIP-170 family." J. Cell Biol. **156**(4): 631-642.
- Peters, C., M. J. Bayer, S. Buhler, J. S. Andersen, M. Mann et A. Mayer (2001). "Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion." Nature **409**(6820): 581-8.
- Peyroche, A., B. Antony, S. Robineau, J. Acker, J. Cherfils et C. L. Jackson (1999). "Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain." Mol Cell **3**(3): 275-85.
- Pfeffer, S. R. (1999). "Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs." Nat Cell Biol **1**(1): E17-22.
- Piel, M., J. Nordberg, U. Euteneuer et M. Bornens (2001). "Centrosome-dependent exit of cytokinesis in animal cells." Science **291**(5508): 1550-3.
- Polishchuk, R. S., E. V. Polishchuk, P. Marra, S. Alberti, R. Buccione, A. Luini et A. A. Mironov (2000). "Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane." J Cell Biol **148**(1): 45-58.
- Portner-Taliana, A., M. Russell, K. J. Froning, P. R. Budworth, J. D. Comiskey et J. P. Hoeffler (2000). "In vivo selection of single-chain antibodies using a yeast two-hybrid system." J Immunol Methods **238**(1-2): 161-72.
- Prescott, A. R., T. Farmaki, C. Thomson, J. James, J. P. Paccaud, B. L. Tang, W. Hong, M. Quinn, S. Ponnambalam et J. Lucocq (2001). "Evidence for Prebudding Arrest of ER Export in Animal Cell Mitosis and its Role in Generating Golgi Partitioning Intermediates." Traffic **2**(5): 321-335.
- Presley, J. F., N. B. Cole, T. A. Schroer, K. Hirschberg, K. J. Zaal et J. Lippincott-Schwartz (1997). "ER-to-Golgi transport visualized in living cells." Nature **389**(6646): 81-5.
- Presley, J. F., T. H. Ward, A. C. Pfeifer, E. D. Siggia, R. D. Phair et J. Lippincott-Schwartz (2002). "Dissection of COPI and Arf1 dynamics in vivo and role in Golgi membrane transport." Nature **417**(6885): 187-93.
- Rabouille, C., N. Hui, F. Hunte, R. Kieckbusch, E. G. Berger, G. Warren et T. Nilsson (1995). "Mapping the distribution of Golgi enzymes involved in the construction of complex oligosaccharides." J Cell Sci **108** (Pt 4): 1617-27.
- Rabouille, C., H. Kondo, R. Newman, N. Hui, P. Freemont et G. Warren (1998). "Syntaxin 5 is a common component of the NSF- and p97-mediated reassembly pathways of Golgi cisternae from mitotic Golgi fragments in vitro." Cell **92**(5): 603-10.
- Rabouille, C., T. P. Levine, J. M. Peters et G. Warren (1995). "An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments." Cell **82**(6): 905-14.

- Rabouille, C., T. Misteli, R. Watson et G. Warren (1995). "Reassembly of Golgi stacks from mitotic Golgi fragments in a cell-free system." J Cell Biol **129**(3): 605-18.
- Ramaswamy, S., J. Toner et J. Prost (2000). "Nonequilibrium fluctuations, traveling waves, and instabilities in active membranes." Phys Rev Lett **84**(15): 3494-7.
- Rambourg, A. et Y. Clermont (1997). Three dimensional structure of the Golgi apparatus in mammalian cells. The Golgi apparatus. E. G. a. R. Berger, J. Basel, Switzerland, Birkhäuser: 37-61.
- Raymond, C. K., I. Howald-Stevenson, C. A. Vater et T. H. Stevens (1992). "Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants." Mol Biol Cell **3**(12): 1389-402.
- Reilly, B. A., B. A. Kraynack, S. M. VanRheenen et M. G. Waters (2001). "Golgi-to-endoplasmic reticulum (ER) retrograde traffic in yeast requires Dsl1p, a component of the ER target site that interacts with a COPI coat subunit." Mol Biol Cell **12**(12): 3783-96.
- Richards, S. A., K. M. Lounsbury et I. G. Macara (1995). "The C Terminus of the Nuclear RAN/TC4 GTPase Stabilizes the GDP-bound State and Mediates Interactions with RCC1, RAN-GAP, and HTF9A/RANBP1." J. Biol. Chem. **270**(24): 14405-14411.
- Roghi, C. et V. J. Allan (1999). "Dynamic association of cytoplasmic dynein heavy chain 1a with the Golgi apparatus and intermediate compartment." J Cell Sci **112**(Pt 24): 4673-85.
- Rossanese, O. W. et B. S. Glick (2001). "Deconstructing golgi inheritance." Traffic **2**(9): 589-96.
- Rossanese, O. W., C. A. Reinke, B. J. Bevis, A. T. Hammond, I. B. Sears, J. O'Connor et B. S. Glick (2001). "A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **153**(1): 47-62.
- Rossanese, O. W., J. Soderholm, B. J. Bevis, I. B. Sears, J. O'Connor, E. K. Williamson et B. S. Glick (1999). "Golgi structure correlates with transitional endoplasmic reticulum organization in *Pichia pastoris* and *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **145**(1): 69-81.
- Roth, M. G. (1999). "Inheriting the Golgi." Cell **99**: 559-562.
- Rothman, J. E. et G. Warren (1994). "Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics." Curr Biol **4**(3): 220-33.
- Roux, A., G. Cappello, J. Cartaud, J. Prost, B. Goud et P. Bassereau (2002). "A minimal system allowing tubulation with molecular motors pulling on giant liposomes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(8): 5394-9.
- Rybin, V., O. Ullrich, M. Rubino, K. Alexandrov, I. Simon, M. C. Seabra, R. Goody et M. Zerial (1996). "GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion." Nature **383**(6597): 266-9.
- Sacher, M., J. Barrowman, W. Wang, J. Horecka, Y. Zhang, M. Pypaert et S. Ferro-Novick (2001). "TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport." Mol Cell **7**(2): 433-42.
- Sapperstein, S. K., D. M. Walter, A. R. Grosvenor, J. E. Heuser et M. G. Waters (1995). "p115 is a general vesicular transport factor related to yeast endoplasmic reticulum to Golgi transport factor Uso1p."

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA **92**: 522-526.
- Saraste, J., G. E. Palade et M. G. Farquhar (1987). "Antibodies to rat pancreas Golgi subfractions: identification of a 58-kD cis-Golgi protein." J Cell Biol **105**(5): 2021-9.
- Satoh, A., Y. Wang, J. Malsam, M. B. Beard et G. Warren (2003). "Golgin-84 is a rab1 Binding Partner Involved in Golgi Structure." Traffic **4**(3): 153-61.
- Scales, S. J., R. Pepperkok et T. E. Kreis (1997). "Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI." Cell **90**(6): 1137-1148.
- Schaffitzel, C., J. Hanes, L. Jermutus et A. Pluckthun (1999). "Ribosome display: an in vitro method for selection and evolution of antibodies from libraries." Journal of Immunological Methods **231**(1-2): 119-35.
- Scheel, J., R. Pepperkok, M. Lowe, G. Griffiths et T. E. Kreis (1997). "Dissociation of coatamer from membranes is required for brefeldin A- induced transfer of Golgi enzymes to the endoplasmic reticulum." J. Cell Biol. **137**(2): 319-333.
- Schiavo, G., F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. Polverino de Laureto, B. R. DasGupta et C. Montecucco (1992). "Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin." Nature **359**(6398): 832-5.
- Schulze, K. L., K. Broadie, M. S. Perin et H. J. Bellen (1995). "Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission." Cell **80**: 311-320.
- Sciaky, N., J. Presley, C. Smith, K. J. Zaal, N. Cole, J. E. Moreira, M. Terasaki, E. Siggia et J. Lippincott-Schwartz (1997). "Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells." J Cell Biol **139**(5): 1137-55.
- Scott, J. K. et G. P. Smith (1990). "Searching for peptide ligands with an epitope library." Science **249**(4967): 386-90.
- Seemann, J., E. Jokitalo, M. Pypaert et G. Warren (2000). "Matrix proteins can generate the higher order architecture of the Golgi apparatus." Nature **407**(6807): 1022-6.
- Seemann, J., E. J. Jokitalo et G. Warren (2000). "The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo." Mol Biol Cell **11**(2): 635-45.
- Seemann, J., M. Pypaert, T. Taguchi, J. Malsam et G. Warren (2002). "Partitioning of the Matrix Fraction of the Golgi Apparatus During Mitosis in Animal Cells." Science **295**(5556): 848-851.
- Seong, Y. S., K. Kamijo, J. S. Lee, E. Fernandez, R. Kuriyama, T. Miki et K. S. Lee (2002). "A spindle checkpoint arrest and a cytokinesis failure by the dominant-negative polo-box domain of Plk1 in U-2 OS cells." J Biol Chem **277**(35): 32282-93.
- Sheff, D., L. Pelletier, C. B. O'Connell, G. Warren et I. Mellman (2002). "Transferrin receptor recycling in the absence of perinuclear recycling endosomes." J. Cell Biol. **156**(5): 797-804.
- Sheff, D. R., E. A. Daro, M. Hull et I. Mellman (1999). "The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions." J Cell Biol **145**(1): 123-39.
- Shi, X., T. Karkut, M. Chamankhah, M. Altling-Mees, S. M. Hemmingsen et

- D. Hegedus (2003). "Optimal conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris*." *Protein Expr Purif* **28**(2): 321-30.
- Shima, D. T., N. Cabrera-Poch, R. Pepperkok et G. Warren (1998). "An ordered inheritance strategy for the Golgi apparatus: visualization of mitotic disassembly reveals a role for the mitotic spindle." *J Cell Biol* **141**(4): 955-66.
- Shima, D. T., K. Haldar, R. Pepperkok, R. Watson et G. Warren (1997). "Partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in living HeLa cells." *J. Cell Biol.* **137**(6): 1211-1228.
- Shima, D. T., S. J. Scales, T. E. Kreis et R. Pepperkok (1999). "Segregation of COPI-rich and anterograde-cargo-rich domains in endoplasmic-reticulum-to-Golgi transport complexes." *Curr Biol* **9**(15): 821-4.
- Shinotsuka, C., Y. Yoshida, K. Kawamoto, H. Takatsu et K. Nakayama (2002). "Overexpression of an ADP-ribosylation factor-guanine nucleotide exchange factor, BIG2, uncouples brefeldin A-induced adaptor protein-1 coat dissociation and membrane tubulation." *J Biol Chem* **277**(11): 9468-73.
- Short, B., C. Preisinger, R. Korner, R. Kopajtich, O. Byron et F. A. Barr (2001). "A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic." *J. Cell Biol.* **155**(6): 877-884.
- Short, B., C. Preisinger, J. Schaletzky, R. Kopajtich et F. A. Barr (2002). "The Rab6 GTPase Regulates Recruitment of the Dynactin Complex to Golgi Membranes." *Curr Biol* **12**(20): 1792-5.
- Shorter, J., M. B. Beard, J. Seemann, A. B. Dirac-Svejstrup et G. Warren (2002). "Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115." *J. Cell Biol.* **157**(1): 45-62.
- Shorter, J. et G. Warren (1999). "A role for the vesicle tethering protein, p115, in the post-mitotic stacking of reassembling Golgi cisternae in a cell-free system." *J Cell Biol* **146**(1): 57-70.
- Shorter, J. et G. Warren (2002). "Golgi architecture and inheritance." *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 379-420.
- Shorter, J., R. Watson, M. E. Giannakou, M. Clarke, G. Warren et F. A. Barr (1999). "GRASP55, a second mammalian GRASP protein involved in the stacking of Golgi cisternae in a cell-free system." *Embo J* **18**(18): 4949-60.
- Siggia, E. D., J. Lippincott-Schwartz et S. Bekiranov (2000). "Diffusion in inhomogeneous media: theory and simulations applied to whole cell photobleach recovery." *Biophys J* **79**(4): 1761-70.
- Siniooglou, S., S. Y. Peak-Chew et H. R. Pelham (2000). "Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p." *Embo J* **19**(18): 4885-94.
- Siniooglou, S. et H. R. Pelham (2002). "Vps51p links the VFT complex to the SNARE Tlg1p." *J Biol Chem* **277**(50): 48318-24.
- Siniooglou, S. et H. R. B. Pelham (2001). "An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes." *EMBO J.* **20**(21): 5991-5998.
- Sisson, J. C., C. Field, R. Ventura, A. Royou et W. Sullivan (2000). "Lava Lamp, a Novel Peripheral Golgi Protein, Is Required for *Drosophila melanogaster* Cellularization." *J. Cell Biol.* **151**(4): 905-918.

- Skop, A. R., D. Bergmann, W. A. Mohler et J. G. White (2001). "Completion of cytokinesis in *C. elegans* requires a brefeldin A- sensitive membrane accumulation at the cleavage furrow apex." Curr Biol **11**(10): 735-46.
- Slusarewicz, P., N. Hui et G. Warren (1994). Purification of rat liver Golgi stacks. Cell biology: a laboratory Handbook. C. J. E. San Diego-CA, Academic Press. **1**: 509-516.
- Slusarewicz, P., T. Nilsson, N. Hui, R. Watson et G. Warren (1994). "Isolation of a matrix that binds medial Golgi enzymes." J. cell Biol. **124**: 405-413.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." Science **228**(4705): 1315-7.
- Smothers, J. F., S. Henikoff et P. Carter (2002). "PHAGE DISPLAY: Affinity Selection from Biological Libraries." Science **298**(5593): 621-622.
- Sohda, M., Y. Misumi, A. Yano, N. Takami et Y. Ikehara (1998). "Phosphorylation of the vesicle docking protein p115 regulates its association with the Golgi membrane." J Biol Chem **273**(9): 5385-8.
- Söllner, T., S. W. Whiteheart, M. Brunner, H. Erdjument-bromage, S. Geromanos, P. Tempst et J. E. Rothman (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." Nature **362**: 318-324.
- Sonnichsen, B., S. De Renzis, E. Nielsen, J. Rietdorf et M. Zerial (2000). "Distinct Membrane Domains on Endosomes in the Recycling Pathway Visualized by Multicolor Imaging of Rab4, Rab5, and Rab11." J. Cell Biol. **149**(4): 901-914.
- Sonnichsen, B., M. Lowe, T. Levine, E. Jamsa, B. Dirac-Svejstrup et G. Warren (1998). "A role for giantin in docking COPI vesicles to Golgi membranes." J Cell Biol **140**(5): 1013-21.
- Souter, E., M. Pypaert et G. Warren (1993). "The Golgi stack reassembles during telophase before arrival of proteins transported from the endoplasmic reticulum." J Cell Biol **122**(3): 533-40.
- Spano, S., M. G. Silletta, A. Colanzi, S. Alberti, G. Fiucci, C. Valente, A. Fusella, M. Salmona, A. Mironov, A. Luini, D. Corda et S. Spanfo (1999). "Molecular cloning and functional characterization of brefeldin A-ADP- ribosylated substrate. A novel protein involved in the maintenance of the Golgi structure." J Biol Chem **274**(25): 17705-10.
- Sprong, H., P. van der Sluijs et G. van Meer (2001). "How proteins move lipids and lipids move proteins." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(7): 504-13.
- Stahl, B., G. Fischer von Mollard, C. Walch-Solimena et R. Jahn (1994). "GTP cleavage by the small GTP-binding protein Rab3A is associated with exocytosis of synaptic vesicles induced by α -latrotoxin." J. Biol. Chem. **269**: 24770-24776.
- Stedman, T. T., A. R. Sussmann et K. A. Joiner (2003). "Toxoplasma gondii Rab6 mediates a retrograde pathway for sorting of constitutively secreted proteins to the Golgi complex." J Biol Chem **278**(7): 5433-43.
- Storrie, B., R. Pepperkok et T. Nilsson (2000). "Breaking the COPI monopoly on Golgi recycling." Trends Cell Biol **10**: 385-390.
- Storrie, B., J. White, S. Rottger, E. H. Stelzer, T. Suganuma et T. Nilsson

- (1998). "Recycling of golgi-resident glycosyltransferases through the ER reveals a novel pathway and provides an explanation for nocodazole-induced Golgi scattering." *J Cell Biol* **143**(6): 1505-21.
- Subtil, A., A. Hemar et A. Dautry-Varsat (1994). "Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited." *J Cell Sci* **107** (Pt 12): 3461-8.
- Surrey, T., M. B. Elowitz, P. E. Wolf, F. Yang, F. Nedelec, K. Shokat et S. Leibler (1998). "Chromophore-assisted light inactivation and self-organization of microtubules and motors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(8): 4293-8.
- Surrey, T., F. Nedelec, S. Leibler et E. Karsenti (2001). "Physical properties determining self-organization of motors and microtubules." *Science* **292**(5519): 1167-71.
- Sutterlin, C., P. Hsu, A. Mallabiabarrena et V. Malhotra (2002). "Fragmentation and dispersal of the pericentriolar Golgi complex is required for entry into mitosis in Mammalian cells." *Cell* **109**(3): 359-69.
- Sutterlin, C., C. Y. Lin, Y. Feng, D. K. Ferris, R. L. Erikson et V. Malhotra (2001). "Polo-like kinase is required for the fragmentation of pericentriolar Golgi stacks during mitosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(16): 9128-32.
- Suvorova, E. S., R. Duden et V. V. Lupashin (2002). "The Sec34/Sec35p complex, a Ypt1p effector required for retrograde intra-Golgi trafficking, interacts with Golgi SNAREs and COPI vesicle coat proteins." *J Cell Biol* **157**(4): 631-43.
- Suvorova, E. S., R. C. Kurten et V. V. Lupashin (2001). "Identification of a human orthologue of Sec34p as a component of the cis-Golgi vesicle tethering machinery." *J Biol Chem* **276**(25): 22810-8.
- Taylor, R. S., C. C. Wu, L. G. Hays, J. K. Eng, J. R. Yates, 3rd et K. E. Howell (2000). "Proteomics of rat liver Golgi complex: minor proteins are identified through sequential fractionation." *Electrophoresis* **21**(16): 3441-59.
- Tisdale, E. J. (2000). "Rab2 requires PKC iota/lambda to recruit beta-COP for vesicle formation." *Traffic* **1**(9): 702-12.
- Tisdale, E. J. (2001). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway." *J Biol Chem* **276**(4): 2480-6.
- Tisdale, E. J. (2002). "Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated by protein kinase Ciota /lambda and plays a role in microtubule dynamics in the early secretory pathway." *J Biol Chem* **277**(5): 3334-41.
- Tse, E., M. N. Lobato, A. Forster, T. Tanaka, G. T. Chung et T. H. Rabbitts (2002). "Intracellular Antibody Capture Technology: Application to Selection of Intracellular Antibodies Recognising the BCR-ABL Oncogenic Protein." *J Mol Biol* **317**(1): 85-94.
- Uchiyama, K., E. Jokitalo, F. Kano, M. Murata, X. Zhang, B. Canas, R. Newman, C. Rabouille, D. Pappin, P. Freemont et H. Kondo (2002). "VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo." *J Cell Biol* **159**(5): 855-66.
- Uchiyama, K., E. Jokitalo, M. Lindman, M. Jackman, F. Kano, M. Murata, X. Zhang et H. Kondo (2003). "The localization and phosphorylation of p47 are important for Golgi

- disassembly-assembly during the cell cycle." J Cell Biol **161**(6): 1067-79.
- Ungar, D., T. Oka, E. E. Brittle, E. Vasile, V. V. Lupashin, J. E. Chatterton, J. E. Heuser, M. Krieger et M. G. Waters (2002). "Characterization of a mammalian Golgi-localized protein complex, COG, that is required for normal Golgi morphology and function." J Cell Biol **157**(3): 405-15.
- Valencia, A., P. Chardin, A. Wittinghofer et C. Sander (1991). "The *ras* protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids." Biochemistry **30**: 4637-4648.
- Valsdottir, R., H. Hashimoto, K. Ashman, T. Koda, B. Storrie et T. Nilsson (2001). "Identification of rabaptin-5, rabex-5, and GM130 as putative effectors of rab33b, a regulator of retrograde traffic between the Golgi apparatus and ER." FEBS Lett **508**(2): 201-9.
- VanRheenen, S. M., X. Cao, S. K. Sapperstein, E. C. Chiang, V. V. Lupashin, C. Barlowe et M. G. Waters (1999). "Sec34p, a protein required for vesicle tethering to the yeast Golgi apparatus, is in a complex with Sec35p." J Cell Biol **147**(4): 729-42.
- Vanrheenen, S. M., B. A. Reilly, S. J. Chamberlain et M. G. Waters (2001). "Dsl1p, an essential protein required for membrane traffic at the endoplasmic reticulum/Golgi interface in yeast." Traffic **2**(3): 212-31.
- Varki, A. (1998). "Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus." Trends Cell Biol **8**(1): 34-40.
- Vasile, E., T. Perez, N. Nakamura et M. Krieger (2003). "Structural Integrity of the Golgi is Temperature Sensitive in Conditional-Lethal Mutants with No Detectable GM130." Traffic **4**(4): 254-72.
- Vaughan, T. J., A. J. Williams, K. Pritchard, J. K. Osbourn, A. R. Pope, J. C. Earnshaw, J. McCafferty, R. A. Hodits, J. Wilton et K. S. Johnson (1996). "Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library." Nat Biotechnol **14**(3): 309-14.
- Vega, I. E. et S. C. Hsu (2003). "The septin protein Nedd5 associates with both the exocyst complex and microtubules and disruption of its GTPase activity promotes aberrant neurite sprouting in PC12 cells." Neuroreport **14**(1): 31-7.
- Visintin, M., E. Tse, H. Axelson, T. H. Rabbitts et A. Cattaneo (1999). "Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11723-8.
- Volchuk, A., M. Amherdt, M. Ravazzola, B. Brugger, V. M. Rivera, T. Clackson, A. Perrelet, T. H. Sollner, J. E. Rothman et L. Orci (2000). "Megavesicles implicated in the rapid transport of intracisternal aggregates across the Golgi stack." Cell **102**(3): 335-48.
- Wang, H., X. Tang, J. Liu, S. Trautmann, D. Balasundaram, D. McCollum et M. K. Balasubramanian (2002). "The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*." Mol Biol Cell **13**(2): 515-29.
- Wang, W. et S. Ferro-Novick (2002). "A Ypt32p Exchange Factor Is a Putative Effector of Ypt1p." Mol. Biol. Cell **13**(9): 3336-3343.
- Wang, W., M. Sacher et S. Ferro-Novick (2000). "TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p." J Cell Biol **151**(2): 289-96.
- Wang, Y., J. Seemann, M. Pypaert, J. Shorter et G. Warren (2003). "A direct role for GRASP65 as a

- mitotically regulated Golgi stacking factor." *Embo J* **22**(13): 3279-3290.
- Ward, T. H., R. S. Polishchuk, S. Caplan, K. Hirschberg et J. Lippincott-Schwartz (2001). "Maintenance of Golgi structure and function depends on the integrity of ER export." *J. Cell Biol.* **155**(4): 557-570.
- Warren, G. (1989). "Cell biology: mitosis and membranes." *Nature* **342**(6252): 857-8.
- Warren, G. et V. Malhotra (1998). "The organisation of the Golgi apparatus." *Curr Opin Cell Biol* **10**(4): 493-8.
- Warren, G. et I. Mellman (1999). "Bulk flow redux?" *Cell* **98**(2): 125-7.
- Warren, G. et W. Wickner (1996). "Organelle inheritance." *Cell* **84**(3): 395-400.
- Weidman, P., R. Roth et J. Heuser (1993). "Golgi membrane dynamics imaged by freeze-etch electron microscopy: views of different membrane coatings involved in tubulation versus vesiculation." *Cell* **75**(1): 123-33.
- Weigert, R., M. G. Silletta, S. Spano, G. Turacchio, C. Cericola, A. Colanzi, S. Senatore, R. Mancini, E. V. Polishchuk, M. Salmona, F. Facchiano, K. N. Burger, A. Mironov, A. Luini et D. Corda (1999). "CtBP/BARS induces fission of Golgi membranes by acylating lysophosphatidic acid." *Nature* **402**(6760): 429-33.
- Weiss, M., H. Hashimoto et T. Nilsson (2003). "Anomalous protein diffusion in living cells as seen by fluorescence correlation spectroscopy." *Biophys J* **84**(6): 4043-52.
- Weiss, M. et T. Nilsson (2003). "A Kinetic Proof-reading Mechanism for Protein Sorting." *Traffic* **4**(2): 65-73.
- Weissman, J. T., H. Plutner et W. E. Balch (2001). "The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec12 is essential for activation of the Sar1 GTPase directing endoplasmic reticulum export." *Traffic* **2**(7): 465-75.
- White, J., L. Johannes, F. Mallard, A. Girod, S. Grill, S. Reinsch, P. Keller, B. Tzschaschel, A. Echard, B. Goud et E. H. Stelzer (1999). "Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells." *J Cell Biol* **147**(4): 743-60.
- Whyte, J. R. et S. Munro (2001). "The Sec34/35 Golgi transport complex is related to the exocyst, defining a family of complexes involved in multiple steps of membrane traffic." *Dev Cell* **1**(4): 527-37.
- Whyte, J. R. et S. Munro (2002). "Vesicle tethering complexes in membrane traffic." *J Cell Sci* **115**(Pt 13): 2627-37.
- Wiedman, P. J., P. Melançon, M. R. Block et J. E. Rothman (1989). "Binding of an *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein to Golgi membranes requires both a soluble protein(s) and an integral membrane receptor." *J. Cell Biol.* **108**: 1589-1596.
- Wienke, D. C., M. L. Knetsch, E. M. Neuhaus, M. C. Reedy et D. J. Manstein (1999). "Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*." *Mol Biol Cell* **10**(1): 225-43.
- Wu, C. C., M. J. MacCoss, K. E. Howell et J. R. Yates (2003). "A method for the comprehensive proteomic analysis of membrane proteins." *Nat Biotechnol* **21**(5): 532-8.
- Wu, C. C., R. S. Taylor, D. R. Lane, M. S. Ladinsky, J. A. Weisz et K. E. Howell (2000). "GMx33: a novel family of trans-Golgi proteins

- identified by proteomics." Traffic **1**(12): 963-75.
- Wu, C. C., J. R. Yates, 3rd, M. C. Neville et K. E. Howell (2000). "Proteomic analysis of two functional states of the Golgi complex in mammary epithelial cells." Traffic **1**(10): 769-82.
- Xu, H., J. A. Brill, J. Hsien, R. McBride, G. L. Boulianne et W. S. Trimble (2002). "Syntaxin 5 is required for cytokinesis and spermatid differentiation in *Drosophila*." Dev Biol **251**(2): 294-306.
- Xu, Y., S. Takeda, T. Nakata, Y. Noda, Y. Tanaka et N. Hirokawa (2002). "Role of KIFC3 motor protein in Golgi positioning and integration." J. Cell Biol. **158**(2): 293-303.
- Yang, J.-S., S. Y. Lee, M. Gao, S. Bourgoïn, P. A. Randazzo, R. T. Premont et V. W. Hsu (2002). "ARFGAP1 promotes the formation of COPI vesicles, suggesting function as a component of the coat." J. Cell Biol. **159**(1): 69-78.
- Yoshimura, S.-i., N. Nakamura, F. A. Barr, Y. Misumi, Y. Ikehara, H. Ohno, M. Sakaguchi et K. Mihara (2001). "Direct targeting of cis-Golgi matrix proteins to the Golgi apparatus." J Cell Sci **114**(22): 4105-4115.
- Zaal, K. J., C. L. Smith, R. S. Polishchuk, N. Altan, N. B. Cole, J. Ellenberg, K. Hirschberg, J. F. Presley, T. H. Roberts, E. Siggia, R. D. Phair et J. Lippincott-Schwartz (1999). "Golgi membranes are absorbed into and reemerge from the ER during mitosis." Cell **99**(6): 589-601.
- Zerial, M. et H. McBride (2001). "Rab proteins as membrane organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 107-17.
- Zhang, C. J., A. G. Rosenwald, M. C. Willingham, S. Skuntz, J. Clark et R. A. Kahn (1994). "Expression of a dominant allele of human ARF1 inhibits membrane traffic in vivo." J Cell Biol **124**(3): 289-300.