

Université de Montréal

**Étude des GTPases potentiellement responsables de la fusion
du réticulum endoplasmique**

par
Geneviève Thibault

Département de pathologie et biologie cellulaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en pathologie et biologie cellulaire

Juillet, 2005

©GENEVIÈVE THIBAUT, 2005



W

4

U58

2005

V. 155

Direction des bibliothèques

AVIS

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

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

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

NOTICE

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

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

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

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé
Étude des GTPases potentiellement responsables de la fusion du
réticulum endoplasmique

présenté par
Geneviève Thibault

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Nicole Leclerc
présidente-rapporteuse

Dr Jacques Paiement
directeur de recherche

Dr Roger Lippé
membre du jury

Sommaire

Plusieurs fonctions du réticulum endoplasmique (RE), dont la fusion membranaire, se sont avérées GTP-dépendante, mais aucune GTPase n'avait encore été identifiée. Une analyse protéomique effectuée sur les différents compartiments du RE a révélée la présence de plusieurs GTPases. Nous avons donc étudié certaines de ces GTPases présentes dans les sous-fractions du RE rugueux (RM) et du RE lisse (SM), obtenues par fractionnement cellulaire de foie de rat, et ce, par immunobuvardage. De plus, des expériences *in vitro* de neutralisation par anticorps ont été menées afin de mesurer l'implication de certaines de ces GTPases dans la fusion GTP-dépendante des membranes du RE et des membranes de l'enveloppe nucléaire.

La MS a été effectuée sur les sous-compartiments du RE, révélant la présence de Rab1b, Rab2, Rab5a, Rab6, Rab35, ainsi que du SR β , partie intégrante du translocon, validée ensuite par immunobuvardage. Une analyse densitométrique, couplée à la quantité relative de peptides décelés par MS, a permis de déterminer une quantité supérieure de GTPases dans les SM en comparaison avec les RM.

De tous les anticorps utilisés en étude de reconstitution *in vitro* des membranes, l'anticorps purifié dirigé contre le SR β a montré une inhibition de la fusion des RM dépourvus de ribosomes (RM traités pour enlever les ribosomes) ainsi que de celle des SM. La morphométrie réalisée à l'aide de la microscopie électronique a confirmé l'effet spécifique de l'anti-SR β .

En conclusion, plusieurs GTPases ont été identifiées, dont une, la SR β s'est avérée impliquée dans la fusion des membranes du RE ainsi que la fusion de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire.

Mots clés : réticulum endoplasmique rugueux, réticulum endoplasmique lisse, fusion membranaire, enveloppe nucléaire, Rabs, SR β , système d'incubation *in vitro*

Summary

Several ER functions have been shown to be GTP-dependent, however the GTPase involved has not been identified. We have carried out a proteomic analysis of the ER subcompartments, namely of rough and smooth membranes and have identified numerous small GTPases associated with them.

Recently we have focused on the following small GTPases, Rab1b, Rab5a, Rab6, a new Rab protein Rab35 and SRP receptor beta (SR β). Using purified antibodies directed against these proteins we have determined by Western blot analysis the concentration of the Rabs in rough ER, smooth ER and Golgi fractions to match with results obtained by Proteomic. Results of immunofluorescence studies of several GTPases have been carried out. Finally *in vitro* membrane reconstitution studies were carried out to determine the possible involvement of small GTPases in ER membrane fusion.

Of the several purified antibodies tested anti-SR β protein antibodies were observed to inhibit fusion of rough ER membranes and nucleus envelope outer membrane.

It is our conclusion that SR β has effect on ER reconstitution *in vitro* and on the fusion of nucleus envelope outer membranes.

Key words : rough endoplasmic reticulum, smooth endoplasmic reticulum, membrane fusion, nucleus envelope, Rabs, SR β , *in vitro* incubation model

Table des matières

Sommaire	<i>i</i>
Summary	<i>iii</i>
Table des matières	<i>iv</i>
Liste des figures	<i>vii</i>
Liste des Tableaux	<i>ix</i>
Liste des abréviations	<i>x</i>
I Introduction	<i>1</i>
1. Structure du réticulum endoplasmique	<i>1</i>
1.1 Le réticulum endoplasmique rugueux (RER)	<i>3</i>
1.2 Le réticulum endoplasmique lisse (REL)	<i>3</i>
1.3 Le réticulum endoplasmique de transition (REt)	<i>4</i>
1.4 Enveloppe nucléaire	<i>4</i>
2. Fusion	<i>5</i>
2.1 Physique de la fusion	<i>5</i>
2.2 Fusion homotypique vs hétérotypique	<i>6</i>
2.3 Protéines SNARES	<i>7</i>
2.4 Étapes de la fusion	<i>10</i>
2.4.1 Le rapprochement	<i>10</i>
2.4.2 L'agrégation et la reconnaissance	<i>11</i>
2.4.3 L'arrimage	<i>11</i>
2.5 Fusion GTP-dépendante	<i>14</i>
3. Protéines Rabs	<i>15</i>
3.1 Fonction des rabs	<i>16</i>
4. Translocon	<i>19</i>
4.1 Particule de reconnaissance des signaux (SRP)	<i>19</i>
4.2 Récepteur de la particule de reconnaissance des signaux (SR)	<i>20</i>
4.3 Étapes de translocation des protéines	<i>21</i>
Objectifs	<i>24</i>
II Matériel et méthode	<i>26</i>
1. Anticorps utilisés	<i>26</i>
2. Fractionnements	<i>27</i>
2.1 Fractionnement cellulaire dérivé du RE	<i>27</i>
2.2 Fractionnement des noyaux	<i>27</i>
3. Électrophorèse et immunobuvardage	<i>28</i>

4. Densitométrie	29
5. Système de reconstitution in vitro	30
5.1 Fusion <i>in vitro</i> des microsomes et des noyaux:	30
5.2 Fusion <i>in vitro</i> des microsomes et des noyaux	30
6. Enrobage pour microscopie électronique	30
7. Morphométrie	32
7.1 Analyse de la taille des vésicules fusionnées	32
7.2 Analyse des noyaux fusionnés	33
8. Test à la protéinase K	33
9. Test de reconnaissance de la SRβ native dans les microsomes	33
10. Immunolocalisation à l'or colloïdal	34
11. Immunocytochimie	34
III Résultats	36
1. Caractérisation des microsomes	36
2. Études des rabs	37
2.1- Localisations des rabs par immunobuvardage	37
2.2- Essais des anticorps contre les rabs dans système de reconstitution in vitro	39
3. Étude de la SRβ	39
3.1- Caractérisation de l'anti-SR β #3618	39
3.1.1 Spécificité de l'anticorps	40
3.1.2 Localisation du peptide par rapport au côté de la membrane	41
3.1.3 Immunolocalisation	43
3.1.4 Reconnaissance de la protéine dans sa forme native dans les microsomes par l'anticorps	44
3.2 Essai de l'anti-SR β sur la fusion des RM et des SM	48
3.3 Essai des anti-SR β sur la fusion de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire	54
IV Discussion	61
1. Les rabs	61
2. La sous-unité bêta du récepteur de la particule de reconnaissance des signaux (SRβ)	63
3. Collaborateurs potentiels de la SRβ	66
3.1 La sous-unité alpha du récepteur (SR α)	66
3.2 Les SNAREs	67
3.2.1. Syntaxine18	67

3.2.2. Syntaxine17 _____	69
3.3 La chaîne naissante _____	69
V. Conclusion et perspectives futures _____	72
Annexes _____	74
Densitométrie _____	74
Immunolocalisation à l'or colloïdal _____	75
Séquence peptidique de la protéine SRβ chez le rat _____	77
Références _____	78
Remerciements _____	91

Liste des figures

- Figure 1: Représentation de quatre parties formant le réticulum endoplasmique.* _____ 2
- Figure 2: Schéma des différentes étapes de la fusion membranaire.* _____ 13
- Figure 3: Localisation des différentes Rabs impliquées dans la voie de biosynthèse dans la cellule eucaryote.* _____ 18
- Figure 4: Schéma représentant l'apposition du ribosome sur la membrane du RE.* _____ 23
- Figure 5: Résultats des immunobuvardages pour quelques protéines Rabs.* _____ 38
- Figure 6: Spécificité et site de localisation de l'épitope reconnu par l'anticorps l'anti-SR β .* _____ 43
- Figure 7: Site de localisation de la SR β dans les cellules HeLa.* ____ 46
- Figure 8: Reconnaissance de la SR β à la surface des microsomes in vitro.* _____ 47
- Figure 9: Modèle expliquant le test de fusion in vitro utilisé pour l'étude de l'effet de l'anticorps sur la fusion.* _____ 50
- Figure 10: Mise en évidence par microscopie électronique de l'effet de l'anti-SR β sur la fusion des membranes du RE.* _____ 51
- Figure 11: Histogramme représentant les données compilées des trois expériences de fusion.* _____ 52
- Figure 12: Représentation de la fusion de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire.* _____ 56
- Figure 13: Représentation en microscopie électronique d'une paire de noyaux fusionnés.* _____ 57
- Figure 14: Représentation en microscopie électronique d'une paire de noyaux non fusionnés.* _____ 58

Figure 15: Immunobuvardage de l'anti- SR β #3618 avec les microsomes rugueux dépourvus de ribosomes et avec les noyaux. _____ 60

Figure 16: Modèle expliquant la fusion du réticulum endoplasmique impliquant la SR β . _____ 71

Figure 17: Séquence peptidique de la protéine SR β chez le rat. __ 77

Liste des Tableaux

Tableau 1: **Anticorps utilisés dans les différents tests** _____ 26

Tableau 2: **Résumé des trois essais de fusions effectués sur deux types de microsomes; rugueux dépourvus de ribosomes (SRM) et lisses (SM)** _____ 53

Tableau 3: **Résultats des essais en fusion des membranes externes de l'enveloppe nucléaire** _____ 59

Liste des abréviations

- ARF : facteur de ribosylation ADP (*ADP-ribosylation factor*)
- ATP : adénosine triphosphate
- CN : chaîne naissante
- COPI : protéine coatomère de type I (*coatomer protein I*)
- COPII : protéine coatomère de type II (*coatomer protein II*)
- EN : enveloppe nucléaire
- GAP : protéine activatrice de GTPase (*GTPase activating protein*)
- GDP : guanosine diphosphate
- GGBP : protéines liant les nucléotides guanine (*guanine nucleotides binding proteins*)
- GTP : guanosine triphosphate
- GTPase : guanosine triphosphatase
- MS : spectrométrie de masse

- NSF : facteur sensible au N-éthylmaleimide (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*)
- ORF : cadre de lecture ouvert (*open reading frame*)
- RCN : complexe ribosomes-chaîne naissante
- RE : réticulum endoplasmique
- REL : réticulum endoplasmique lisse
- REP : protéine escorte aux Rabs (*Rab escort protein*)
- RER : réticulum endoplasmique rugueux
- REt : réticulum endoplasmique de transition
- RM : microsomes rugueux (*rough microsomes*)
- SM : microsomes lisses (*smooth microsomes*)
- SNARE : récepteur des protéines SNAP (*SNAPs receptors*)
- SNAP : protéines solubles attachant le facteur NSF aux membranes (*soluble NSF-attachment proteins*)
- SR α : sous-unité alpha du récepteur de la particule de reconnaissance des signaux

- SR β : sous-unité beta du récepteur de la particule de reconnaissance des signaux
- SRM : microsomes dépourvus de ribosomes (*stripped rough microsomes*)
- SRP : particule de reconnaissance des signaux (*signal recognition particle*)

I Introduction

1. Structure du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est une organite présente dans toutes les cellules eucaryotes. Sa découverte et sa caractérisation morphologique ont été possibles grâce aux méthodes de microscopie électroniques améliorées. C'est grâce aux travaux de Porter et Palade que la structure et même la présence de cette organelle ont été mises en lumière dans les années cinquante. Le RE compte à lui seul cinquante-et-un pourcents de la quantité totale de membrane dans une cellule de foie chez les eucaryotes comparativement à un mince quinze pourcents du volume total cellulaire (Blobel, 1980). Sa structure se définit comme un réseau semblable à un labyrinthe composé de tubules interreliés et de sacs lisses qui s'étend à l'intérieur du cytoplasme. Ces citernes et ses tubules sont étroitement connectés. Ces membranes créent une enveloppe qui renferme un espace unique et continu. Le RE peut donc se diviser en quatre parties; le RE rugueux (RER), le RE lisse (REL), le RE de transition et l'enveloppe nucléaire. La présence de ribosomes sur la membrane externe de l'enveloppe nucléaire ainsi que plusieurs propriétés biologiques et chimiques similaires entre les deux organelles (Gerace et Burke, 1988) la classe ainsi comme quatrième partie du RE. La figure 1 présente quatre de ces cinq parties. Les membranes du RE sont le siège de la biosynthèse des protéines de presque tous les organites cellulaires: le RE lui-même, le Golgi, les lysosomes, les endosomes, les vésicules sécrétoires, ainsi que la membrane plasmique.

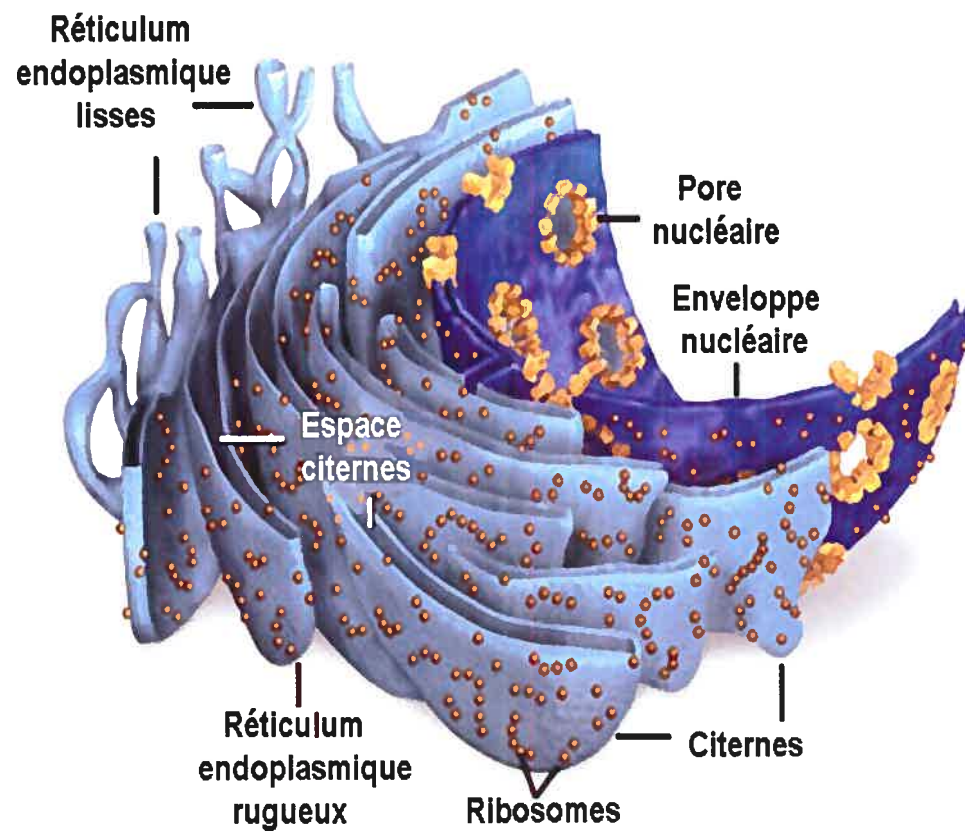


Figure1: Représentation de quatre parties formant le réticulum endoplasmique. D'abord, le réticulum endoplasmique rugueux est composé de cisternes sur lesquelles sont attachés des ribosomes. Puis, il y a le réticulum endoplasmique lisse sous forme tubulaire. Ensuite, la lumière du réticulum est représenté par l'espace entre les cisternes. Enfin, l'enveloppe nucléaire est formée d'une double membrane. Sa membrane externe est parsemée de ribosomes et est en continuité avec le réticulum endoplasmique rugueux (Tiré de Davidson, 1995).

1.1 Le réticulum endoplasmique rugueux (RER)

Le RE rugueux est principalement composé de citernes auxquelles sont attachés des ribosomes. La présence de ces petites masses granuleuses à la surface des membranes externes du RE lui confère des fonctions bien précises. La plus importante consiste en la synthèse protéique. Les ribosomes sont libres dans le cytoplasme et se lient au réticulum endoplasmique uniquement s'ils sont en train de synthétiser une protéine destinée à ce compartiment cellulaire. Donc, en général, un grand développement du RER est indicatif d'une grande activité de synthèse des protéines. Les membranes du RER sont les précurseurs des membranes du REL (Dallner et al., 1966).

1.2 Le réticulum endoplasmique lisse (REL)

Le RE lisse (REL) est tubulaire sans ribosome. Il remplit des fonctions différentes selon le type de cellules dans lequel il se trouve. Dans les cellules hépatiques, par exemple, il est spécialisé dans la production de lipoprotéines et dans la détoxification de composés solubles dans les lipides (Stein et Stein, 1967). Dans des situations particulières, par exemple après la prise de certains médicaments qui nécessitent une plus grande capacité fonctionnelle de cette structure, le réticulum endoplasmique lisse des cellules hépatiques peut doubler de surface en quelques jours, puis revenir aux dimensions d'origine. Les cellules où le réticulum endoplasmique lisse est particulièrement abondant sont, quant à elles, spécialisées dans l'élaboration des lipides et dans le métabolisme du glycogène dans le cas des cellules hépatiques et enfin, dans la réserve de calcium dans les cellules

musculaires où le nom de réticulum sacoplasmique lui est attribué (de Meil et Vianna, 1979).

1.3 Le réticulum endoplasmique de transition (REt)

Il existe également le RE de transition (REt). Cette région spécifique est composée de domaines du RE lisse et rugueux confluents. Il se définit comme étant le lieu de sorties des protéines sécrétées (Farquhar et Hauri, 1997). Les vésicules qui se dirigent vers l'appareil de Golgi bourgeonnent de ce compartiment. Les vésicules se dirigeant du RE vers le compartiment intermédiaire, situés entre le REt et le Golgi. Ce transport antérograde requière l'implication d'un complexe enveloppé; COPII (Rothman et Weiland, 1996; Schekman et Orci, 1996). Le transport rétrograde (du compartiment intermédiaire au RE) implique un autre complexe enveloppé; COPI (Letourneur et al., 1994).

1.4 Enveloppe nucléaire

Pendant l'interphase, l'enveloppe nucléaire (EN) sépare du reste de la cellule les composants structurels et fonctionnels du noyau. Elle est composée de deux membranes; la membrane externe, qui est en continuité avec le RE (Franke et al., 1981), et la membrane interne qui est supportée par les lamines, un réseau de filaments intermédiaires (Stuurman et al., 1998). L'enveloppe nucléaire est perforée de plusieurs complexes; les pores nucléaires. Ces canaux aqueux sont responsables du transport passif ou actif des macromolécules à travers l'EN (Doye et Hurt, 1997; Mattaj et Englmeier, 1998).

2. Fusion

La membrane de la cellule lui permet de maintenir son individualité par rapport à son environnement ainsi que l'intégrité de ses compartiments intracellulaires. Cela implique des échanges dynamiques entre les différentes cellules et entre les différents organites cellulaires sans qu'il y ait perte de leur perméabilité sélective. Ces échanges sont possibles grâce à la fusion membranaire, un processus fondamental de communication inter et intracellulaire. Il existe plusieurs types de fusion : homotypique, hétérotypique, cytoplasmique et extracytoplasmique. Ce phénomène complexe consiste en plusieurs étapes impliquant plusieurs molécules à chacune des ces étapes : la migration, l'arrimage, acquisition de propriétés nécessaires à la fusion membranaire, la formation d'un pore, le relâchement des molécules transportées et enfin, le recyclage des protéines accessoires et des vésicules de transport (Creutz, 1992). Ce phénomène implique plusieurs protéines SNAREs. L'implication des SNAREs dans le transport Golgien a été démontrée dans les années 80 par Rothman et son équipe. Leur rôle s'est ensuite étendu à plusieurs autres voies de transport impliquant d'autres organites : RE, Golgi, endosomes, lysosomes, vésicules de transport et de sécrétion (Guo et al., 2000; Zerial et al., 2001).

2.1 Physique de la fusion

La fusion membranaire survient quand deux bicouches lipidiques deviennent une unique et continue bicouche. Les deux membranes doivent surmonter les forces électrostatiques afin de se rapprocher suffisamment pour se fusionner. Alors, le contact entre la portion hydrophobique de la bicouche et la portion hydrophile externe du milieu doit être minimisé (Kuzmin et al., 2001). Les cellules ainsi que les virus

contournent les forces électrostatiques entre les bicouches lipidiques en utilisant une machinerie protéique complexe. Par la même occasion, cela permet à la cellule de contrôler quelles membranes peuvent fusionner, inculquant ainsi une spécificité au phénomène de fusion. Les forces hydrophobiques qui maintiennent intègre la bicouche phospholipidique peuvent être contournées par la formation d'intermédiaires de faible énergie. L'organisation et l'alignement des molécules phospholipidiques individuelles sont interrompus suffisamment pour permettre la formation d'une tige (Kuzmin et al., 2001). Cette tige est une structure dans laquelle la couche phospholipidique cis a fusionné, mais où la membrane trans est demeurée intacte (Yang and Huang, 2002). Lorsque la tige est formée, les couches lipidiques trans peuvent entrer en contact et se fusionner pour mener à la formation d'un pore de fusion (Kuzmin et al., 2001; Noguchi et Takasu, 2001; Jahn et al., 2003).

2.2 Fusion homotypique vs hétérotypique

La fusion membranaire peut être classée en diverses catégories selon la composition des deux membranes qui vont fusionner. Dans le cas de membranes de composition similaire, on parle de fusion homotypique. Ce type de fusion est observé lors de la reconstruction de certains organelles après la mitose telles que le RE (Latterich et al., 1995; Turner et al., 1997) ou de l'appareil de Golgi (Acharya et al., 1995, Rabouille et al., 1995). Ce phénomène est également observable lorsque deux endosomes ou deux lysosomes veulent se fusionner (Gruenberg et Howell, 1986; Ward et al., 1997). Dans le cas du RER, la

fusion est GTP-dépendante et ATP-dépendante pour le REL (Lavoie et al. 1996).

La fusion hétérotypique a lieu lorsque deux membranes d'organites différents se fusionnent, par exemple, une vésicule de transport provenant du RE destinée à l'appareil de Golgi. Ce type de fusion requiert la présence des SNAREs; une v-SNARE (*v=vesicular*) sur la vésicule et une t-SNARE(*t=target*) pour la membrane cible (Söllner et al., 1993).

2.3 Protéines SNARES

Les SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor [NSF] attachment protein [SNAP] receptors*) sont des protéines transmembranaires, dont la masse se situe entre 10 et 35 kDa. Il existe environ 20 SNAREs différentes chez les cellules animales, chacune étant associée avec une membrane d'un organite impliqué dans le transport. Un élément distinctif des SNAREs est une séquence conservée de 60 à 70 acides aminés appelée «motif SNARE». Dans les SNAREs typiques, ce motif est entouré d'un domaine transmembranaire C-Terminal et d'un domaine N-Terminal, tout deux composés de quelques acides aminés seulement. Les séquences du domaine N-Terminal ne sont pas conservées. Dans d'autres cas plus rares, le domaine transmembranaire est déficient, donc l'attachement à la membrane est possible grâce à une modification hydrophobique post-traductionnelle (Jahn & Südhof, 1999; Fasshauer, 2003). Certaines SNAREs comme SNAP-25, SNAP-29 et SNAP-23 contiennent deux motifs SNARE reliés par une région liante. Le complexe SNARE en tant que tel est une tresse de quatre hélices α antiparallèles : une provenant

de la synaptobrévine (située sur la vésicule), une autre de la syntaxine1 (située sur la membrane réceptrice) et les deux autres de SNAP-25 (située également sur la vésicule). Le fait que l'extrémité N-Terminal de chacune des hélices soit du même côté dans le cristal du complexe SNARE synaptique (Sutton et al., 1998) aurait pour effet de rapprocher les surfaces des vésicules et des membranes afin d'induire la fusion. Cette observation suggère que la formation du complexe SNARE libère une partie de l'énergie nécessaire pour franchir la barrière de potentiel correspondant à la fusion des bicouches lipidiques. D'ailleurs, les propriétés thermodynamiques de la formation et de la dissociation du complexe SNARE démontrent une très grande stabilité (Hayashi et al., 1994). Au centre du complexe SNARE (couche 0), les interactions entre les différentes chaînes sont dues à des liaisons hydrogènes entre l'arginine de la synaptobrévine et de trois glutamines provenant de chacune des deux autres composants du complexe; Syntaxine et SNAP-25 (Sutton et al., 1998). Cette propriété semble être commune à tous les complexes SNARE (Antonin et al., 2002). Cette propriété a permis de proposer une nouvelle nomenclature pour les SNAREs selon qu'elles aient une arginine (R-SNARE) ou une glutamine (Q-SNARE) au centre de leur motif SNARE (Jahn et Südhof, 1999). De plus, les propriétés de v-SNAREs concordent avec celles des R-SNAREs tout comme celles des t-SNAREs coïncident avec celles de Q-SNAREs.

Les SNAREs ont été isolées pour la première fois dans le cerveau, le siège de nombreux processus mettant en jeu de la fusion membranaire. Lors de la libération de neurotransmetteurs, les vésicules synaptiques fusionnent avec la membrane plasmique, faisant des neurones un modèle de choix pour l'étude des SNAREs. Les différentes connaissances acquises sur les SNAREs sont l'oeuvre de deux

approches scientifiques : l'étude des neurotoxiques clostridiales et la génétique.

D'abord, les toxines clostridiales produites par *Clostridium botulinii* et *Clostridium tatenii* sont reconnues comme de puissants inhibiteurs de la libération des neurotransmetteurs. L'intoxication des neurones amène l'hydrolyse d'une des SNARES; soit Syntaxine, SNAP-25 ou Synaptobrévine, selon le type de toxine, bloquant ainsi la libération des neurotransmetteurs (Niemaan et al., 1994; Montecucco et Schiavo, 1994). Ces expérimentations ont ensuite été tentées avec d'autres types cellulaires : cellules fibroblastiques (Galli et al., 1994) et épithéliales (Leung et al., 1998), et ce, en utilisant les chaînes légères de ces toxines.

D'autres expérimentations ont été faites dans l'étude des SNARES, mais d'un point de vue génétique. L'étude de la levure a permis de mettre en lumière des mutations dans des gènes codants pour des protéines SNAREs qui provoquaient des bouleversements dans la voie sécrétoire et d'autres voies du trafic membranaire (Ferro-Novick et Jahn, 1994). De plus, l'analyse de mutants invertébrés a permis d'étendre ces connaissances aux autres organismes (Littleton, 2000). Chez la souris, le processus inverse a été effectué. On a invalidé le gène codant pour la synaptobrévine (Schoch et al., 2001) et SNAP-25 (Washbourne et al., 2002). Dans les deux cas, la libération des neurotransmetteurs a été grandement affectée. Toutes ses études ont permis de mettre les SNAREs au coeur de la fusion membranaire.

2.4 Étapes de la fusion

La fusion est un processus biologique important et très bien régulé. Elle suit une séquence d'évènements bien précise. La figure 2 présente ces différentes étapes qui mènent à la fusion membranaire.

2.4.1 Le rapprochement

D'abord, afin que deux membranes se fusionnent, elles doivent être à proximité. Parfois, le rapprochement peut être purement fortuit. En effet, seuls les mouvements Browniens des molécules peuvent permettre le rapprochement nécessaire (Blumenthal, 1987). C'est le cas lors d'infections virales ou d'évènements d'envahissements parasitaires intracellulaires. Dans le cas de cellules eucaryotes, plusieurs protéines sont nécessaires afin de bien orienter les vésicules vers leur lieu cible. Par exemple, le transport entre le RE et l'appareil de Golgi est souvent sous le contrôle des microtubules (Mizuno et Singer 1994; Lippincott-Schwartz, 1995) et ce transport est facilité par des protéines motrices dépendantes de l'ATP (dynéine et kinésine) (Cole et Lippincott-Schwartz, 1995; Pfeffer, 1999) qui dirigent les vésicules le long des microtubules dans la direction antérograde ou rétrograde (Vale, 2003). Cependant, ce ne sont pas tous les transports vésiculaires qui nécessitent les microtubules. Dans certains cas, quand le RE et le compartiment intermédiaire sont suffisamment près l'un de l'autre, i.e. moins de $1\mu\text{m}$, une simple diffusion est suffisante pour le mouvement des vésicules entre les compartiments (Bloom et Goldstein, 1998).

2.4.2 L'agrégation et la reconnaissance

Une étape importante pour la fusion est un contact intime entre la membrane cible et la vésicule. La plupart des événements fusiogéniques biologiques nécessitent non seulement l'agrégation des membranes juxtaposées, mais également la reconnaissance spécifique des membranes entre elles. Malgré le fait que plusieurs contacts entre différentes membranes peuvent survenir dans une cellule, ces contacts ne conduisent pas tous à la fusion. En effet, la présence de récepteurs spécifiques tels les t-SNAREs sur les membranes qui seront reconnues spécifiquement par les v-SNAREs sur les vésicules, permettront à celles-ci de s'agréger et de se fusionner. Par exemple, la protéine v-SNARE impliquée dans la voie d'exocytose permet la fusion avec un complexe t-SNARE de la membrane plasmique, mais pas avec un complexe t-SNARE du RE (McNew et al., 2000). Plusieurs mécanismes d'agrégations spécifiques peuvent intervenir entre candidats compatibles, certains sont grossiers alors que d'autres sont d'une précision extrême.

2.4.3 L'arrimage

L'arrimage consiste en l'apposition de la vésicule avec sa membrane cible. Il suffit que les protéines des deux membranes soient assez près afin qu'elles adhèrent les unes aux autres (Pfeffer, 1999). Cette étape ne requiert pas spécifiquement les SNAREs. Elle implique plutôt d'autres protéines appelées facteurs d'arrimage. Par exemple, le complexe protéique appelé exocyste (Sec3p, Sec5p, Sec6p, Sec8p, Sec10, Sec15p, Exo70p, Exo84p) est impliqué dans l'accostage des vésicules d'exocytose à la membrane plasmique chez la levure (Finger et Novick, 1998). Par ailleurs, plusieurs GTPases impliquées dans le

transport membranaire interagissent avec ce complexe. Sec3p définit le site d'exocytose sur la membrane plasmique et a besoin des GTPases Rho1p et Cdc42p pour être localisée correctement (Brymora et al., 2001). D'autres complexes ont également été identifiés. Par exemple, la fusion homotypique des endosomes nécessite Rab5, son facteur d'échange Rabex5, son effecteur; la rabaptine5, une protéine des endosomes EEA1 et la syntaxine13 (Christoforidis et al., 1999). Le transport du RE vers le *cis*-Golgi est sous le contrôle de la GTPase Rab1 qui recrute le facteur d'accostage GM130, lui-même agissant dans un complexe formé de Giantine et p115 (Seemann et al., 2000).

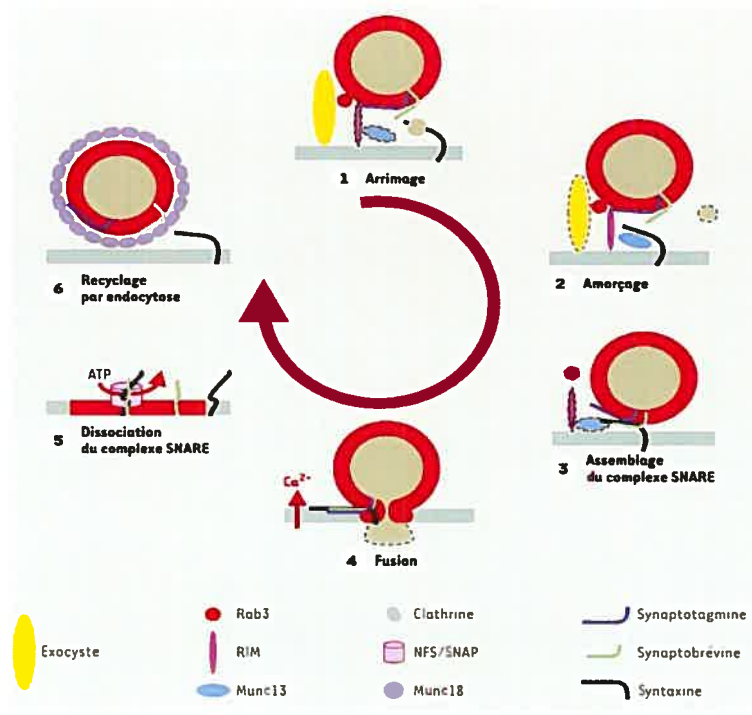


Figure 2: Schéma des différentes étapes de la fusion membranaire.

1-L'arrimage est l'étape de l'arrivée de la vésicule à la membrane réceptrice. Cette étape nécessite des facteurs d'arrimage qui permettront à la vésicule d'être maintenue en contact étroit et correctement localisé avec sa destination. 2- L'amorçage nécessite le changement conformationnel de certaines protéines afin qu'elles puissent débiter le processus de fusion. 3- Le complexe SNARE se forme. Les v-SNAREs interagissent avec les t-SNAREs afin de permettre la rencontre entre les deux membranes. 4- La fusion a lieu grâce à la formation d'un pore de fusion. Le calcium active la synaptotagmine qui s'associe au complexe SNARE, permettant la fusion. 5- L'hydrolyse de l'ATP cause la dissociation du complexe par le relâchement de NSF et SNAP qui deviennent alors disponibles. 6- Enfin, le complexe exocyste intervient afin de recycler les vésicules synaptiques ainsi que les constituants membranaires. (Tiré de Galli et al., 2002)

2.5 Fusion GTP-dépendante

Au cours des années, plusieurs recherches ont été effectuées pour connaître les composants nécessaires à la fusion membranaire des différents organites. Le GTP s'est avéré important dans les différentes étapes de la fusion du RE (Paiement et al., 1980; Dawson et al., 1987; Watkins et al., 1993). Les membranes du RE partagent avec la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (EN) plusieurs propriétés biologiques et morphologiques. Plusieurs systèmes d'incubation ont été mis au point afin d'identifier les déterminants nécessaires à la fusion. Une étape GTP-dépendante a été décrite aussi bien dans la fusion RE-EN (Paiement, 1984) que dans la fusion EN-EN (Newport et Dunphy, 1992; Boman et Kahn, 1995).

La fusion de l'enveloppe nucléaire requiert de l'énergie et des protéines cytosoliques (Vigers et Lohka, 1991; Boman et al., 1992). En effet, la fusion est inhibée lors de l'ajout d'un analogue non hydrolysable du GTP, mettant en lumière l'implication d'une GTPase dans le phénomène de fusion de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire (Boman et al., 1992; Newport et Dunphy, 1992).

Une GTPase, la protéine Ran, et les protéines régulant sa liaison au GTP et son hydrolyse jouent un rôle assez bien documenté dans le transport nucléaire (Mattaj et Englmeier, 1998; Görlich et Kutay, 1999). Plus récemment, on mettait en lumière son rôle dans la fusion de l'EN pour l'assemblage du noyau (Zhang et al., 2002). En effet, une mutation dans l'importine β , un effecteur de Ran, conduit à une diminution de l'assemblage du noyau.

3. Protéines Rabs

Le premier gène (YPT1) codant pour une protéine Rab «ras-related protein in brain» (Touchot et al., 1987) a été identifié en 1983 (Gallwitz et al., 1983) dans un cadre de lecture ouverte (ORF) du génome de *Saccharomyces cerevisiae* entre le gène codant pour la tubuline et celui codant pour l'actine. Les protéines Rabs sont de petites GTPases d'environ 20kDa. Elles forment la plus grande branche de la superfamilles des ras et se retrouvent principalement sur la face cytoplasmique des organites et des vésicules où elles agissent en tant que régulatrices des différentes étapes du trafic membranaire. La figure 3 présente la localisation des rabs dans la cellule eucaryote. Il y a plus d'une soixantaine de Rabs chez les humains et les gènes de ces protéines sont conservés de la levure à l'humain. Ces protéines sont impliquées dans plusieurs fonctions régulatrices cellulaires telles la motilité, le bourgeonnement vésiculaire et la fusion membranaire. La majeure partie des rabs sont omniprésentes chez les cellules humaines, mais quelques autres sont spécifiques à certains tissus (Pereira-Lea et Seabra, 2000). Par exemple, alors que Rab2 et Rab1 sont exprimées dans tous les types cellulaires, Rab3a est uniquement exprimée dans les neurones (Fischer von Mollard et al., 1990) Le niveau d'expression des Rabs varie d'une cellule à l'autre. Leur localisation membranaire dépend de la modification post-traductionnelle du motif cystéine de leur domaine carboxy-terminal avec un ou deux groupes geranylgeranyl hautement hydrophobiques.

3.1 Fonction des rabs

Plusieurs études biochimiques et génétiques ont démontré une implication des rabs comme protéines régulatrices spécifiques du trafic intracellulaire. Les rabs sont des catalyseurs très polyvalents; elles participent à la réception des protéines cargo durant la formation des vésicules de transport, elles permettent l'interaction entre les protéines motrices et les organites pour générer la motilité des cellules et elles interagissent avec d'autres molécules pour faciliter les étapes d'accostage et de fusion des vésicules de transport avec leurs membranes cibles (Zerial et al., 2001). La clé de leur fonction est le recrutement de molécules effectrices qui s'attachent seulement à leur forme GTP (Stenmark et Olkkonen, 2001). Les rabs possèdent souvent plusieurs molécules effectrices leur étant reliées, signifiant qu'une rab peut réguler plusieurs événements dans un lieu moléculaire restreint. Un exemple est Rabphilin. Elle interagit avec Rab3a, Rab3b, Rab3c et Rab3d aussi bien qu'avec Rab8, Rab15 et Rab27 (Fukuda et al., 2003). Il existe cependant quelques exceptions.

Les rabs pourraient agir conjointement avec d'autres GTPases dans la fusion membranaire. En effet, des traitements impliquant la ribonucléase ont permis de démontrer que la GTPase impliquée dans la fusion GTP-dépendante serait située sous le ribosome (Paiement et al., 1987). En effet, après un traitement avec la ribonucléase sur une préparation de microsomes rugueux, les ribosomes s'agrègeraient sur un côté de la membrane, laissant le côté opposé de la membrane lisse et propice à se fusionner. Cependant, ce n'est pas le cas et malgré la présence d'une surface lisse sur le microsome et toutes les composants nécessaires à la fusion, les microsomes ne fusionnent pas. Cela

démontre que la molécule qui participe à la fusion se situe sous le ribosome. De plus, des protéines du translocon, complexe important au positionnement du ribosome, se sont avérées des joueurs potentiels dans ce phénomène ubiquitaire et complexe de la cellule qu'est la fusion membranaire (Ng et Walter, 1996).

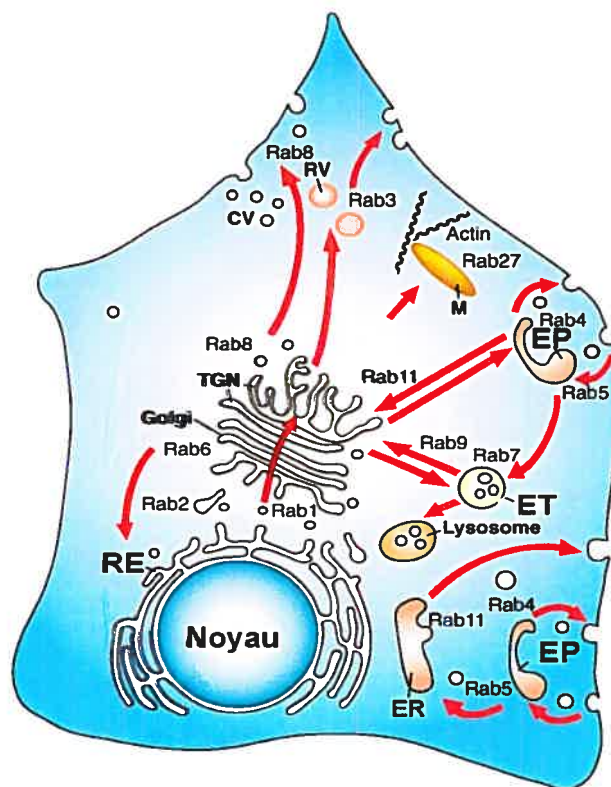


Figure 3: Localisation des différentes rabs impliquées dans la voie de biosynthèse dans la cellule eucaryote. Les vésicules partent du reticulum endoplasmique (RE) à travers le Golgi jusqu'au réseau trans-Golgien (TGN). De là, plusieurs voies sont possibles. Les vésicules peuvent être sécrétées (RV) ou devenir des vésicules constitutives sécrétoires (CV). Dans les cellules spécialisées, les mélanosomes (M) sont des compartiments apparentés aux lysosomes. D'autres vésicules peuvent être destinées aux endosomes précoces (EP) pour ensuite être recyclées par les endosomes de recyclage (ER) ou être prises en charge par les endosomes tardifs (ET). Les flèches représentent les voies de synthèse et d'endocytose. Les Rabs impliquées dans chacune des étapes sont indiquées. (Tiré de Stenmark et Olkkonen, 2001).

4. Translocon

Le translocon est un complexe de plusieurs protéines qui transperce la membrane du RE. Sa base même est composée de trois ou quatre complexes formés eux-mêmes de trois protéines Sec61(α , β et δ). Ce complexe peut également lier d'autres protéines, Sec62, Sec63, Sec71 et Sec72, pour former un complexe heptamérique qui facilite le transport protéique post-traductionnel (Panzner et al., 1995). Lors de la traduction, le ribosome se positionne sur le tunnel formé par le complexe et la chaîne naissante pénètre à l'intérieur du pore protéique. Pour que ce dernier événement se produise, plusieurs molécules entrent en jeu. L'une d'elle est le SRP (*signal recognition particle*), une ribonucléoprotéine présente chez toutes les cellules eucaryotes. Elle agit comme une sorte d'adaptateur entre la machinerie de traduction et la membrane hôte de la synthèse protéique (Ogg et Walter, 1995).

4.1 Particule de reconnaissance des signaux (SRP)

La SRP est formée de six sous-unités : SRP54, SRP19, SRP68, SRP72, SRP14 et SRP9 (Walter et Blobel, 1983). Après un traitement à l'aide d'une nucléase, la SRP se divise en deux domaines : le domaine *Alu* et le domaine S (Gundelfinger et al, 1983). Le domaine *Alu* contient le complexe hétérodimère SRP9/SRP14 qui s'associe aux extrémités 5' et 3' de l'ARN 7S et qui s'avère être responsable d retard de l'élongation polypeptidique. Le domaine S constitue le noyau de la SRP. Il est composé de SRP54 est responsable de la liaison avec le peptide signal (Krieg et al. 1986). La sous-unité SRP54 est une des mieux caractérisées. Elle consiste en trois domaines distincts : un domaine N-

terminal de quatre hélices en boucle (N), un domaine GTPase (G) et un domaine C-terminal en hélice riche en méthionine. Elle lie le GTP lorsqu'elle entre en contact avec le complexe ribosome-chaîne naissante (RCN) (Bacher et al. 1996). C'est également cette dernière qui interagit avec son récepteur (SR).

4.2 Récepteur de la particule de reconnaissance des signaux (SR)

Le SR est une GTPase hétérodimérique de deux sous-unités α et β . Avec le SRP54, ils forment la famille des GNBPs (*guanine nucleotides binding proteins*). La sous-unité α est de 70kDa, comparativement à 30kD pour la sous-unité β . Cette dernière se lie au domaine SRX de la sous-unité α , situé dans la partie N-terminal (Schwartz et Blobel, 2003). La SR β , retrouvé uniquement chez les cellules eucaryotes, consiste en un mélange de six feuillets beta entourés de cinq hélices. Sa structure rappelle celle de Sar1, membre de la famille des Arf, facteur de la ribosylation ADP (*ADP-ribosylation factor*), impliqué dans la régulation des vésicules de transport et possédant une très haute affinité pour les nucléotides (Miller et al., 1995). Elle possède un domaine transmembranaire qui sert d'ancrage membranaire à SR α (Young et al, 1995). Cependant, ce segment n'est pas indispensable à son fonctionnement (Ogg et al., 1998). La liaison de SR α et SR β se fait uniquement lorsque SR β est dans sa forme active (lié au GTP) (Scharwitz et Blobel, 2003). Quant au SR α , la structure et la fonction de son domaine GTPase est similaire à celui du SRP54. Contrairement à SR β , l'affinité de SRP54 et SR α pour les nucléotides est relativement faible et ces deux molécules sont par ailleurs très stables dans leur état

inactif (Miller et al., 1993; Bacher et al., 1996). Cependant, cette affinité augmente considérablement lorsqu'ils forment un complexe l'un avec l'autre. (Rapiejko et Guilmore, 1992; Rapiejko et Guilmore 1997).

4.3 Étapes de translocation des protéines

Toutes les cellules, aussi primitives qu'elles soient, possèdent une compartimentation pour la localisation des protéines. Un système de transport efficace assure une translocation des protéines à l'endroit où elles devront assurer leur fonction. Pour les protéines sécrétées et transmembranaires, le SRP est un des médiateurs de leur localisation (Lütcke et al., 1995; Keenan et al., 2001). D'abord, la chaîne naissante (CN) émergeant du ribosome de son domaine N-terminal est reconnue par la sous-unité SRP54, créant ainsi un arrêt provisoire de l'élongation de la chaîne et l'aposition du RNC sur la membrane du RE (Walter et Johnson, 1994; Johnson et van Waes, 1999). La sous-unité *Alu* est responsable de cet arrêt (Weichenrieder et al., 2000) en se liant à une sous-unité située sous le ribosome (Terzi et al., 2004). À la membrane, le SRP se lie à son récepteur par l'intermédiaire de SRP54 reconnaissant $SR\alpha$ qui forme un hétérodimère avec $SR\beta$ (Tajima et al., 1986), toutes les trois étant figées dans leur forme active. La présence du complexe Sec61p provoque le relâchement de la CN de SRP54 (Song et al., 2000). Cet événement provoque alors la dissociation de SRP54 et $SR\alpha$, agissant mutuellement comme GAP (protéine activatrice de GTPase, *GTPase activating protein*) (Powers et Walter, 1995). Cette interaction assure l'unidirectionnalité du processus. La présence du ribosome influence le domaine GTPase de $SR\beta$ en diminuant son affinité pour le GTP et en augmentant son activité GTPase (Bacher et al., 1999). Ainsi, la $SR\alpha$, étant dans sa forme GDP, ne peut plus se lier

à la SR β . Par conséquent, la SR α se dissocie de SRP54 qui, à son tour, délaisse la CN qui est prise en charge par le complexe Sec61p. L'élongation peptidique est donc redémarrée. La figure 4 présente un résumé de ces étapes.

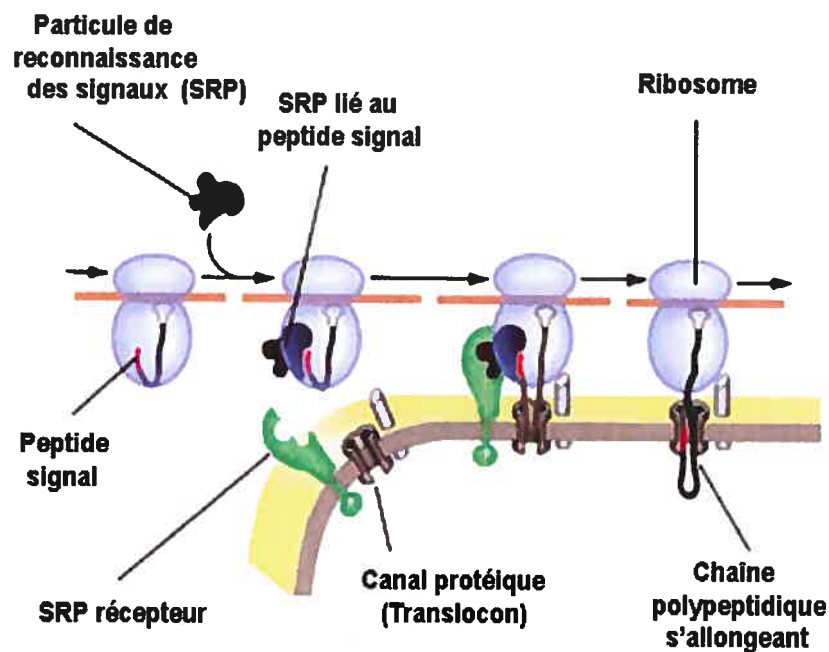


Figure 4: Schéma représentant l'apposition du ribosome sur la membrane du RE. D'abord, le SRP s'associe au peptide signal de la chaîne polypeptidique puis s'associe à son récepteur, amenant le ribosome à se positionner sur le canal protéique. Le peptide signal reconnaît un composant du translocon, à l'intérieur du canal protéique, amenant la chaîne à pénétrer ce canal. La chaîne polypeptidique s'allonge vers l'intérieur du RE. (Tiré de Angelin, 1999)

Objectifs

Depuis plusieurs années, notre laboratoire a étudié la fusion membranaire impliquant le réticulum endoplasmique. Les fractions du RE rugueux et du RE lisses ont été étudiées et caractérisées (Lavoie et al., 1996). De plus, un système de reconstitution du RE *in vitro* a été développé afin d'étudier les protéines responsable de ce phénomène ubiquitaire. Dans ce système, les microsomes sont incubés en présence de $MgCl_2$, de GTP, d'ATP et, dans le cas échéant, d'anticorps afin d'étudier certaines molécules qui pourraient être impliquées.

La fusion du RE rugueux s'est avérée GTP-dépendante (Paiement et al., 1980; Dawson et al., 1987; Watkins et al., 1993). De plus, plusieurs GTPases ont été identifiées dans les deux compartiments du RE; lisse et rugueux (Lanoix et al., 1995).

La première famille de GTPases à avoir attiré notre attention sont les rabs. Les rabs sont de petites GTPases impliquées dans le transport entre les différentes organelles de la cellule. De plus, selon de récents résultats obtenus par la spectrométrie de masse, les rabs sont présentes en grande quantité dans les différents compartiments du RE. Notre étude s'est portée davantage sur Rab1b et Rab2, car elles sont associées au RE (Tisdale et al., 1992).

La deuxième GTPase intéressante pour l'étude est la sous-unité beta de la particule de reconnaissance des signaux, la $SR\beta$. Son choix était en accord avec des études précédentes selon lesquelles la GTPase responsable de la fusion est sous le ribosome (Paiement et al.,

1987). De plus, la SR β contrôle la structure du RE chez la levure (Prinze et al., 2000).

Donc, les différents volets de ce projet étaient:

- 1- Confirmer par immunobuvardage les données recueillies du protéome concernant les rabs
- 2- Étudier l'effet sur la fusion des anticorps dirigés contre Rab1b et Rab2
- 3- Caractériser les nouveaux anti-SR β afin de déterminer le plus spécifique et le plus efficace pour les tests *in vitro*
- 4- Étudier l'effet sur la fusion d'un anticorps dirigé contre la SR β

II Matériel et méthode

1. Anticorps utilisés

Tableau 1 : Anticorps utilisés dans les différents tests

Anticorps	Animal	Polyclonal ou monoclonal	Compagnie	Adresse
Anti-Rab 1b	lapin	polyclonal	Santa Cuz biotechnology Inc	Santa Cruz, CA
Anti-Rab2	lapin	polyclonal	Laboratoire de James E. Rothman	Department of Cellular Biophysics and Biochemistry, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York
Anti-Rab 5a	lapin	polyclonal	Santa Cuz biotechnology Inc	Santa Cruz, CA
Anti-Rab 6	lapin	polyclonal	Santa Cuz biotechnology Inc	Santa Cruz, CA
Anti-Rab 7	lapin	polyclonal	Santa Cuz biotechnology Inc	Santa Cruz, CA
Anti-SR β #3618	lapin	polyclonal	Réseau de proétomique de Montréal (RPMPN)	Montréal, QC, Canada
Anti-GRP78	lapin	polyclonal	Abcam	Cambridge, MA

2. Fractionnements

2.1 Fractionnement cellulaire dérivé du RE

La méthode utilisée est celle décrite précédemment (Paiement et al., 2005). Les microsomes totaux ont été obtenus par centrifugations différentielles d'homogénat de foie de rat et ont été resuspendus dans le sucrose pour une concentration finale de 1,38M avant d'être placés sous un gradient en phases de 1,0M, 0,86M et 0,25M de sucrose pour être ensuite centrifugés avec le rotor Beckmam SW-60 à 300 000g pendant 60 minutes (Lavoie et al., 1996). La fraction des microsomes lisses (qui inclus les microsomes lisses et les microsomes rugueux de faible densité) est extraite de la partie supérieure de la phase 1,38M. Cette fraction est ensuite lavée une fois et resuspendue dans une solution 0,25M de sucrose. La fraction des microsomes rugueux est extraite du culot résiduel sous le gradient de sucrose. Ces microsomes sont ensuite traités avec 5mM de pyrophosphate, afin d'enlever les ribosomes, lavés et resuspendus dans une solution de 0,25M de sucrose. La concentration des protéines est ensuite déterminée par la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951) utilisant l'albumine de sérum bovin comme standard.

2.2 Fractionnement des noyaux

Pour le fractionnement de noyaux de foie de rat, le protocole utilisé est celui de Bloble et Potter publié en 1966. Deux rats mâles sprague daley de 225g à 250g mis au jeune depuis 18 heures sont

anesthésiés décapités et leurs foies sont prélevés. Les foies sont mélangés avec une solution de 0,25M sucrose + 50mM Tris + 25mM KCl + 5mM MgCl₂ à pH 7,5 (STKM) pour être ensuite homogénéisés au Potter à 2850rpm et l'homogénat est filtré sur membrane de nylon. Par la suite, l'homogénat recueilli est déposé sur couche de STKM 2,3M/sucrose pour une concentration de 1,66M. Les homogénats sont centrifugés dans une Beckman XL-70 à 40 000rpm pendant 40 minutes utilisant un rotor SW-40, et ce, en raison de leur densité de sédimentation qui leur permet de transpercer la couche de sucrose et de le retrouver au fond du tube. Ils sont par conséquent facilement récupérables après la centrifugation. Les culots récupérés sont resuspendus trois fois dans 0,25M de STKM avant d'être centrifugés à 1400rpm pendant 10 minutes dans la centrifugeuse Beckman J-20 XPI. Les culots sont finalement resuspendus dans le STKM.

3. Électrophorèse et immunobuvardage

Une quantité de 40µg de protéine, diluée dans un volume de tampon de dénaturation, est déposé sur gel de séparation de 15%, surmonté d'un gel d'empilement de 5%, pour une électrophorèse de 50 minutes à 50mA. Les protéines subissent un transfert sur membrane de cellulose (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA) pendant 90 minutes à 50Volts. Après, les protéines sont colorées au rouge de ponceau (le rouge de Ponceau colore en rouge les protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose, mais cette coloration peut être effacée par passage de la membrane dans une solution aqueuse légèrement acidifiée), et ce, afin de vérifier l'efficacité du transfert. Les membranes sont par la suite bloquées pendant 60 minutes dans une solution

bloquante (5% lait, 0,2% de Tween-20 dans PBS1x pH 7,4). Les protéines contenues dans le lait ont pour effet de saturer les sites potentiels de fixation non utilisés des protéines qui pourraient provoquer une liaison non spécifique avec l'anticorps, et par conséquent, un bruit de fond. Après cette étape de saturation des sites non spécifiques, les membranes sont incubées avec l'anticorps (préalablement dilué dans la solution bloquante) durant toute la nuit, à 4°C. Après 6 lavages de 10 minutes dans la solution bloquante, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire, qui est couplé à la peroxydase, pour une période de 60 minutes à température ambiante. Après plusieurs lavages dans la solution bloquante, suivi de plusieurs lavages dans le PBS 1x, afin d'enlever le Tween, les protéines sont révélées à l'aide d'une solution d'ECL :ensemble de chemiluminescence «Super signal west pico chemiluminecent» (Pierce Biotechnology, Rockfort, IL). L'anticorps est ensuite localisé sur films.

4. Densitométrie

Les films obtenus des immunobuvardages sont numérisés et analysés avec le logiciel informatique Image J (National Institutes of Health, USA). La marche à suivre pour ce logiciel est décrite en annexe.

5. Système de reconstitution *in vitro*

5.1 Fusion *in vitro* des microsomes et des noyaux:

Le milieu d'incubation est composé de 100mM de Tris-HCl pH 7.4, 5mM de MgCl₂, 0,5mM de GTP, 2mM d'ATP, 2mM de créatine phosphate, 7.3unité/mL de créatine kinase, des antiprotéases (Complete, Roche Diagnostic^{***}) et 150µg de microsomes pour un volume total de 250µL. Le volume est ensuite complété à 250µL avec une solution de sucrose-Imidazole (0,25mM Sucrose, 3mM Imidazole, pH 7,4). Les anticorps sont ajoutés en fonction de la courbe de saturation préalablement effectuée. Les microsomes subissent d'abord une préincubation de 120 minutes dans la solution de sucrose-Imidazole, les inhibiteurs de protéases, et, dans le cas échéant, les anticorps. Le temps d'incubation est de deux périodes de 90 minutes, entrecoupées par l'ajout d'une deuxième quantité de GTP (2mM) et d'ATP(2mM) au bain-marie à 37°C afin de combler l'hydrolyse des nucléotides au cours de l'incubation.

5.2 Fusion *in vitro* des microsomes et des noyaux

Les noyaux sont incubés dans des conditions similaires à l'exception de leur milieu d'incubation qui est d'un volume total de 500µL, le temps de préincubation est diminué de moitié, soit une heure, tout comme le temps d'incubation qui est réduit à 2 heures.

6. Enrobage pour microscopie électronique

Après la période d'incubation, les échantillons sont fixés à 4°C durant toute la nuit avec 2,5% de Glutaraldéhyde dans du tampon Cacodylate (100mM, pH 7.4). Elles sont ensuite récupérées sur membranes Millipores (pores de 0,45µm; Millipore, Bedford, MA) après filtration dans le tampon Cacodylate (0,15M, pH 7.4). Le filtre contenant les membranes est recouvert d'un autre filtre similaire préalablement humidifié dans le tampon cacodylate. Ce montage, retenu par un trombone, est ensuite plongé dans le tampon Cacodylate froid. Les échantillons sont ensuite transférés dans une solution d'osmium 1% et de Ferrocyanide de potassium pour une durée d'une heure, sur glace. Après trois lavages dans le tampon Maléate (0,05M, pH 6), les échantillons sont ensuite transférés dans l'Acétate d'uranyle 2,0% (pH 4.2) pour une période d'une heure, sur glace. Après trois lavages dans le tampon Maléate, les membranes subissent 5 étapes de déshydratation de 10 minutes chacune dans l'alcool (75% sur glace, 95% et 3 fois dans 100% à température ambiante). Les membranes subissent un pré-enrobage d'une heure dans l'Oxyde de Propylène (Fisher chemicals) pour se débarrasser du filtre. La pellicule est ensuite récupérée et un mélange d'épon/5,2/4,8-Oxyde de propylène est ensuite ajouté pendant une heure. Ce mélange est ensuite remplacé par un mélange d'épon 5,2/4.8 pur pour être ensuite polymérisé à l'étuve à 60°C pour une période de 12 à 24 heures. Les blocs sont ensuite taillés et coupés à l'aide du microtome. Les coupes fines sont ensuite mises sur grilles, colorées par le Citrate de plomb(2%) et Acétate d'uranyle 3% pour être examinées au microscope électronique.

7. Morphométrie

7.1 Analyse de la taille des vésicules fusionnées

Pour la quantification des vésicules, des photographies adjacentes non superposées sont prises de chacune des grilles à un grossissement de 31K. Les négatifs sont ensuite révélés manuellement. Après avoir été séchés, les négatifs sont numérisés à une résolution de 400dpi puis convertis en images positives. Les vésicules sont colorées en blanc en utilisant le logiciel Adobe Photoshop7.0 (Adobe Systems Inc., Mountain View, CA) et une tablette à écriture numérique Intuos2 (Wacom Technology Corp., Vancouver, WA). Le contraste et la brillance des autres objets de l'image sont alors ajustés afin que seules les vésicules soient blanches. L'image est ensuite transférée dans le logiciel de mesure Sigma Scan Pro5 (Aspire software International) qui calcule le diamètre de chacune des vésicules. Le nombre de vésicules soulignées en rouge est automatiquement emmagasiné dans une feuille de calcul. Pour chacune des conditions d'incubation, 1000 vésicules sont choisies et leur diamètre est mesuré à l'aide du logiciel. Le logiciel calcule le diamètre de la vésicule selon deux données; d'abord, il mesure la surface de la vésicule. Le diamètre est alors calculé théoriquement selon la surface d'un cercle théorique de même surface. Les données sont ensuite transmises dans un logiciel de calcul SPSS (version 11.0, SPSS Science) pour des calculs statistiques. Les données sont compilées et différentes données telles que la moyenne, l'écart-type, le minimum et le maximum sont déterminées. Les moyennes sont ensuite comparées par un test-t afin de déterminer si elles sont statistiquement valables.

7.2 Analyse des noyaux fusionnés

La morphométrie des noyaux est beaucoup plus simple. Les paires de noyaux agrégés sont classées selon qu'elles soient fusionnées ou non fusionnées. Le pourcentage de paires fusionnées est ensuite calculés selon le nombre total de paires de noyaux.

8. Test à la protéinase K

Une quantité de 70µg de microsomes sont diluées dans un volume de solution sucrose(0,25mM)/Imidazole(3mM). Ensuite, différentes concentrations de Protéinase K sont ajoutées à chacun des échantillons. Les échantillons sont incubés au bain-marie à 30°C pour 45 minutes, suivi d'un repos de 5 minutes sur glace après l'ajout de 125mM de MgCl₂ à chacun des échantillons, et ce, pour permettre l'agrégation des microsomes afin de faciliter leur récupération. Les échantillons sont ensuite centrifugés pendant 10 minutes à 13Krpm. Les culots sont ensuite resuspendus dans le tampon de dénaturation pour être déposés sur gel de séparation de 15%. Le reste du protocole est similaire à celui de l'immunobuvardage et d'électrophorèse décrit précédemment.

9. Test de reconnaissance de la SRβ native dans les microsomes

Une quantité de 80µg de protéine et 0,65µg d'anticorps purifiés par affinité sont ajoutés à une solution de sucrose(0,25mM) Imidazole(3mM)

à laquelle sont ajoutées des anti-protéases. Après une incubation de 2 heures à 4°C, du MgCl₂ (125mM) est ajouté pour une autre incubation de 30 minutes à 4°C, et ce, pour permettre l'agrégation des microsomes afin de faciliter leur récupération. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13Krpm pendant 20 minutes. Le surnageant est conservé alors que le culot est resuspendu dans le tampon (sucrose Imidazole + MgCl₂) pour être centrifugé à nouveau. Les culots sont resuspendus dans le tampon de dissociation concentré une fois. Une quantité de surnageant est mélangée à une quantité équivalente de tampon de dénaturation concentré 2 fois. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel de séparation de 15% à raison de 20µL par puits. L'électrophorèse et l'immunobuvardage réalisées sont similaires à celles décrites à la section précédente.

10. Immunolocalisation à l'or colloïdal

Le protocole de l'immunolocalisation à l'or colloïdal est décrit en annexe.

11. Immunocytochimie

Les lamelles sur lesquelles sont fixées les cellules sont rincées dans le PBS 1x réchauffé. Les cellules sont ensuite fixées à l'aide de la paraformaldéhyde 4% préalablement réchauffée. Après un passage de 20 minutes à 37°C, les lamelles subissent trois lavages de 5 minutes dans du PBS 1x à température ambiante. Les cellules sont par la suite perméabilisées par passage dans une solution de 0,2% Triton-X100-PBS 1X pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite lavées trois fois pendant 5 minutes dans le PBS 1X pour ensuite être entreposées à 4°C. Les lamelles sont placées dans un endroit humide et à l'abri de la

lumière. Elles sont ensuite bloquées pendant 30 minutes dans une solution de BSA 5%/PBS 1X . Elles sont incubées avec l'anticorps primaire pendant la nuit à 4°C. Elles subissent par la suite 3 lavages de 5 minutes dans du PBS 1X. L'anticorps secondaire est ensuite ajouté pour une incubation durant toute la nuit à 4°C. Elles subissent ensuite 3 lavages de 5 minutes dans du PBS 1X. Les lamelles sont ensuite montées avec du Moviol (Calbiochem, San Diego, CA) préalablement chauffé à 37°C. Les cellules sont par la suite analysées au microscope à fluorescence. Les photos sont prises à 100X et traitées avec le logiciel Northern Eclipse (Empix Imaging, Mississauga, Ontario, Canada).

III Résultats

1. Caractérisation des microsomes

D'abord, avant d'effectuer les différents tests, une caractérisation des préparations de microsomes lisses a été faite afin de confirmer les résultats préalablement obtenus pour ces préparations (Lavoie et al., 1996), puisqu'elles seront utilisées pour les tests de reconstitution du RE *in vitro*. Malgré qu'une préparation de microsomes lisses ait été employée, il a été démontré que plusieurs contaminations provenant de différentes membranes pouvaient se trouver dans la préparation. De plus, elle contient des microsomes présentant quelques ribosomes à la surface de leurs membranes (Lavoie et al., 1996). Ce sont d'ailleurs ces microsomes qui fusionnent pour donner de grandes vésicules. Ces microsomes sont appelés microsomes rugueux de faible densité (*low-density rough microsomes*) et sont plus grands que les microsomes lisses ($0,12 \pm 0,01\mu\text{m}$ comparativement à $0,08 \pm 0,01\mu\text{m}$ pour les SM). Il représente 40% de la population totale de vésicules présentes dans les préparations de microsomes lisses. Le 60% restant est composé de microsomes lisses, dépourvus de ribosomes (Lavoie et al., 1996). Afin de confirmer ces résultats, les mêmes analyses morphométriques ont été effectuées. La taille moyenne des vésicules est de $0,07\mu\text{m}$ alors que celle des vésicules rugueuses s'élève à $0,10\mu\text{m}$. Par contre, cette analyse n'a été effectuée qu'une seule fois, donc aucun écart-type n'a pu être mesuré. Les résultats obtenus confirment ceux publiés précédemment.

2. Études des rabs

2.1- Localisations des rabs par immunobuvardage

Les rabs sont des GTPases présentes en grande quantité dans les différents compartiments du RE (Lanoix et al., 1995), et cela est appuyé par les données recueillies du protéome (Paiement et al, non publié). Les rabs sont reconnues pour être des partenaires des SNAREs, ces dernières étant nécessaires à la fusion (Rothman et Orly, 1992 ; Söllner et al., 1993). Les rabs étaient donc des candidates de choix pour être impliquées dans la fusion. Afin de confirmer les données du protéome, les rabs ont été localisées à l'aide d'une analyse par immunobuvardage. La figure 5 présente ces résultats. Les premières Rabs étudiées ont été Rab1b et Rab2, compte tenu de leur implication dans le transport entre le RE et l'appareil de Golgi. La présence des ces deux protéines est plus élevée dans le REL. Il y en a également dans le cytosol et dans le RER, mais en quantité moindre. Ces protéines ont également été étudiées dans le Golgi où elles se retrouvent en grande quantité, car elles participent au transport entre cet organelle et le RE. La même analyse a été effectuée sur Rab35, une nouvelle rab qui n'avait jamais été étudiée. Sa présence est plus importante dans le REL et est complètement absente du cytosol. L'analyse a été complétée à l'aide de contrôles. En effet, Rab5, Rab7 et Rab6 sont reconnues pour agir en des lieux différents du RE. Rab5 est surtout impliquée au niveau des endosomes, Rab7 au niveau des lysosomes et Rab6 se retrouve associée au Golgi. Leur présence dans les fractions du RE peuvent s'expliquer par le fait d'elles sont synthétisées dans le RE. Cela explique sa présence en grande quantité dans la fraction golgienne. Selon ces données, les rabs semblent prédominantes dans le RE lisse.

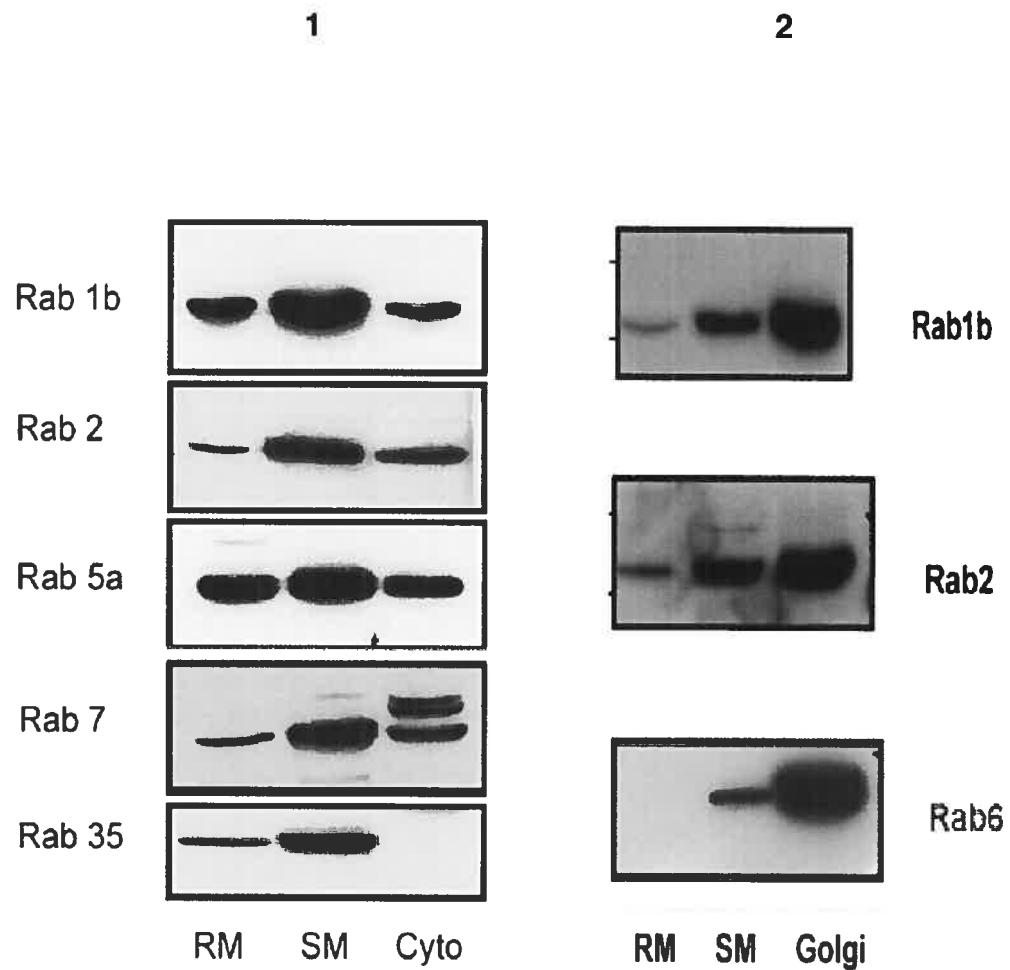


Figure 5: Résultats des immunobuvardages pour quelques protéines rabs. Certains anticorps dirigés contre des rabs ont été testés sur différentes préparations d'organelles; microsomes rugueux (RM), microsomes lisses (SM) et cytosol (Cyto). 2- Autres anticorps dirigés contre des protéines Rabs testés sur différentes préparations d'organelles; microsomes rugueux (RM), microsomes lisses (SM) et Golgi (Golgi).

2.2- Essais des anticorps contre les rabs dans système de reconstitution *in vitro*

Certains anti-Rabs ont été testés dans le système de reconstitution *in vitro* des membranes lisses, et ce, à trois reprises. Cependant, aucune réduction visible de la taille des vésicules n'a été observée, donc aucune étude statistique n'a été effectuée.

3. Étude de la SR β

Compte tenu des résultats négatifs des rabs, une autre GTPase a été étudiée afin de connaître son implication dans la fusion du RE. Le choix de cette protéine est basé sur deux faits. D'abord, selon une expérience impliquant la ribonucléase, la GTPase responsable de la fusion se situerait sous le ribosome (Paiement et al., 1987). De plus, selon les travaux de Rapoport, la SR β contrôlerait la structure du RE dans la levure (Prinz et al., 2000). Ces découvertes laissaient entrevoir la possible implication de la SR β dans la fusion du RE.

3.1- Caractérisation de l'anti-SR β #3618

Pour les différents tests de l'étude, un anticorps spécifique et donnant une réponse claire était nécessaire. Plusieurs anti-SR β ont été essayés. Certains étaient des sérums alors que d'autres étaient des anticorps purifiés sur colonne d'affinité. Des peptides différents ont été utilisés pour générer ces anticorps. L'anti-SR β #3618 provenait de la partie cytosolique de la protéine. L'autre était dirigé contre un peptide de la portion C-terminal, ce situant dans la lumière du RE. Pour chacun de ces peptides, deux lapins ont été immunisés. En tout, six anti-SR β ont

été générés puis testés afin de le caractériser. De ces six, seul l'anti-SR β #3618 a donné une réponse claire en immunobuvardage et en immunofluorescence. C'est donc ce dernier qui a été utilisé dans les essais de fusion *in vitro*.

3.1.1 Spécificité de l'anticorps

Dans le but de caractériser l'anti-SR β #3618, plusieurs manipulations ont été effectuées. D'abord, la spécificité de l'anticorps a été vérifiée. Ensuite, le site de liaison dans les cellules a été déterminé par microscopie à fluorescence et enfin, le site de liaison à l'épitope de l'anticorps par rapport au côté de la membrane du micrososome rugueux a été localisé. De plus, les conditions optimales pour étudier l'interaction entre l'anti-SR β #3618 et les microsomes ont été déterminées par titrage, et ce, à l'aide de concentrations croissantes d'anticorps.

L'interaction de l'anti-SR β #3618 a été vérifiée sur trois types de microsomes (rugueux (RM), rugueux, mais dépourvus de ribosomes (SRM) et lisses (SM)), et ce, par immunobuvardage sur gel de séparation de 15%. Le poids moléculaire de la protéine de la SR β se situe aux environs de 30kDa (Tajima et al., 1986). La figure 6 présente les résultats obtenus de cet immunobuvardage. Une bande au poids moléculaire espéré, 30kDa, est présente. L'anticorps semble spécifique, puisqu'il montre aucune autre bande à l'exception de celle démontrant la protéine recherchée. De plus, la plus grande quantité se trouve dans les SRM, ce qui est plausible, car la SR β est nécessaire au positionnement du ribosome sur la membrane. La diminution de la protéine dans les RM s'explique par le fait que la SR β est diluée parmi

les nombreuses protéines ribosomales. En effet, le traitement au pyrophosphate de sodium subi par les microsomes rugueux pour les départir de leurs ribosomes (SRM) occasionne une perte de 50,8% de protéines associées aux ribosomes (Paiement et Bergeron, 1983). Enfin, la petite quantité retrouvée dans les SM s'explique par le fait que la population de microsomes contenus dans la préparation de dérivé de REL comporte également des microsomes rugueux de faible densité ; contenant quelques ribosomes à leur surface, impliquant la présence de la SR β , car elle est nécessaire au positionnement du ribosome à la surface membranaire. De plus, les protéines du translocon peuvent se déplacer entre le RE lisse et le RE rugueux (Nikonov et al., 2002; Black et al., 2002).

3.1.2 Localisation du peptide par rapport au côté de la membrane

Il fallait par la suite vérifier si l'anti-SR β interagit avec son épitope situé dans la portion cytosolique de la membrane des microsomes rugueux. La séquence de la protéine SR β ainsi que le peptide contre lequel est dirigé l'anticorps sont présentés en annexe. Afin de procéder à cette analyse, un traitement à la protéinase K a été effectué. La protéinase K dégrade les protéines qui sont à sa portée. Autrement dit, tous les domaines des protéines qui ne sont pas entourés de membranes pour les protéger sont en proie à la dégradation par la protéinase K. Ce test consiste à mettre différentes concentrations de protéinase K afin d'observer l'évolution de la dégradation de la partie cytosolique de la protéine SR β . Selon la séquence en acides aminés de cette protéine transmembranaire (ce domaine est en bleu sur la figure 17), la majeure partie de la protéine se trouve face au cytosol (Tajima et

al., 1986). C'est d'ailleurs dans cette partie que se trouve le peptide contre lequel est dirigé l'anticorps (représenté en rouge sur la figure). Donc, la protéine devrait être facilement atteignable par la protéase. Pour comparer l'évolution de la dégradation, le test a été fait simultanément sur une autre protéine du RE, mais se trouvant du côté luminal de la membrane. Il s'agit de la protéine GRP78 ou BIP, petite chaperonne du RE d'environ 78kDa (Haas, 1991 ; Brodsky et al., 1993). Comme elle se trouve du côté luminal de la membrane, elle devrait être protégée de la dégradation par la protéase compte tenu de son inaccessibilité.

Après avoir été en contact avec la protéinase K à différentes concentrations, les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de 12%. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, cette dernière est mise en contact avec l'anticorps. Pour chacun des anticorps, un contrôle négatif (ne contenant pas de Protéinase K) a été effectué. De plus, les deux anticorps ont été testés sur la même membrane afin d'obtenir une comparaison valable. La figure 6 présente les résultats obtenus pour l'anti-SR β et l'anti-BIP. La dégradation de SR β est facilement observable. Dès le premier ajout de Protéinase K, la quantité de protéine diminue significativement. La protéine est entièrement dégradée après l'ajout de 0,1 μ g/ μ L de protéase. Dans le cas de la protéine BIP, sa quantité demeure constante jusqu'à l'ajout de 0,1 μ g/ μ L de protéase. Cela est explicable par le fait qu'après l'ajout d'une certaine quantité de protéase, cette dernière s'attaque à l'intégrité de la membrane qui finit par se dégrader, permettant l'accès aux protéines luminales.

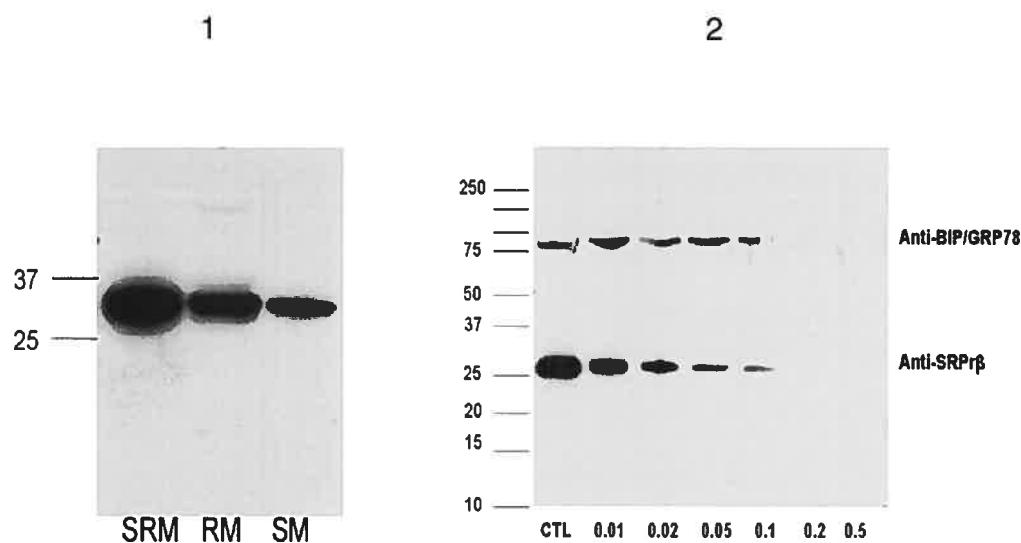


Figure 6: Spécificité et site de localisation de l'épitope reconnu par l'anticorps l'anti-SR β . 1- Résultat de l'immunobuvardage démontrant l'interaction de l'anti-SR β avec la SR β (bande unique à environ 30kDa, près du poids moléculaire de la SR β) dans les microsomes rugueux dépourvus de ribosomes (SRM), dans les microsomes rugueux (RM) et les microsomes lisses (SM). Chaque piste contient 40 μ g de membrane. 2- Résultat du test à la protéinase K. Après une sédimentation par centrifugation, les culots ont été analysés par immunobuvardage pour vérifier l'effet de l'enzyme sur l'anti-SR β ainsi que sur une protéine contrôle; la BIP/GRP78, protéine connue comme étant à l'intérieur des microsomes, par conséquent, à l'abri d'une digestion enzymatique.

3.1.3 Immunolocalisation

Une immunolocalisation par fluorescence a été tentée dans des cellules HeLa afin de vérifier que la localisation de l'anticorps représentait bien le patron du réticulum endoplasmique. La figure 7 présente les résultats de cette localisation par immunofluorescence. Une prédominance de marquage est observé près du noyau ainsi que le long de tubules qui se projettent dans les prolongements cellulaires.

3.1.4 Reconnaissance de la protéine dans sa forme native dans les microsomes par l'anticorps

Afin de vérifier que l'anticorps reconnaît bien la forme native de la SR β dans les microsomes utilisés dans les différentes analyses, un test de reconnaissance par l'anticorps a été effectué. Ce test consiste à mettre en contact l'anticorps avec les membranes durant une certaine période et d'observer si la majeure partie des anticorps se retrouve dans le culot, en complexe avec les membranes ou dans le surnageant, signifiant que les anticorps ne forment pas de complexe avec leur antigène, la SR β . Afin de bien s'assurer que la centrifugation n'était pas responsable du décrochage des anticorps, un deuxième lavage a été effectué. De plus, avec cette technique, il est possible de déterminer la quantité d'anticorps nécessaire à la saturation des sites reconnus par l'anticorps. Le principe est le même à l'exception que plusieurs quantités différentes d'anticorps sont ajoutées. Ainsi, lorsqu'une énorme quantité d'anticorps est retrouvée dans le surnageant, il est alors probable que les sites de reconnaissance de l'anticorps soient tous comblés. La figure 8 présente les résultats obtenus pour les tests de reconnaissance par l'anticorps sur les microsomes lisses et les microsomes rugueux dépourvus de ribosomes. La quantité d'anticorps ajoutée aux

membranes a été déterminée selon la quantité d'anticorps habituellement utilisée dans les tests de fusion *in vitro*. Ainsi, dans les tests de reconstitution du RE, 2,6 μ g d'anticorps est utilisé pour 160 μ g de membrane. Donc, en gardant ce rapport, une quantité de 1,3 μ g d'anticorps a été utilisée pour le test de reconnaissance sachant que 80 μ g de membrane a été utilisé. Pour les deux types de membranes, le deuxième lavage est exempt d'anticorps, laissant croire que la centrifugation n'est pas la cause du détachement de l'anticorps. De plus, la très grande majorité des protéines est détectée dans le culot, et ce, pour les deux types de membranes. Cela signifie que l'anticorps utilisé reconnaît et forme un complexe visiblement solide avec les SR β présentes dans les microsomes.

Le test a été répété avec trois autres quantités d'anticorps ; 0,91 μ g ; 1,56 μ g et 1,95 μ g. Pour la première, il n'y avait aucune trace d'anticorps dans le surnageant, laissant prétendre qu'il pouvait y avoir quelques sites de liaison disponibles. Pour les deux autres, il y avait une quantité non négligeable d'anticorps dans le surnageant, permettant de conclure que les sites de liaisons de l'anticorps étaient saturés.

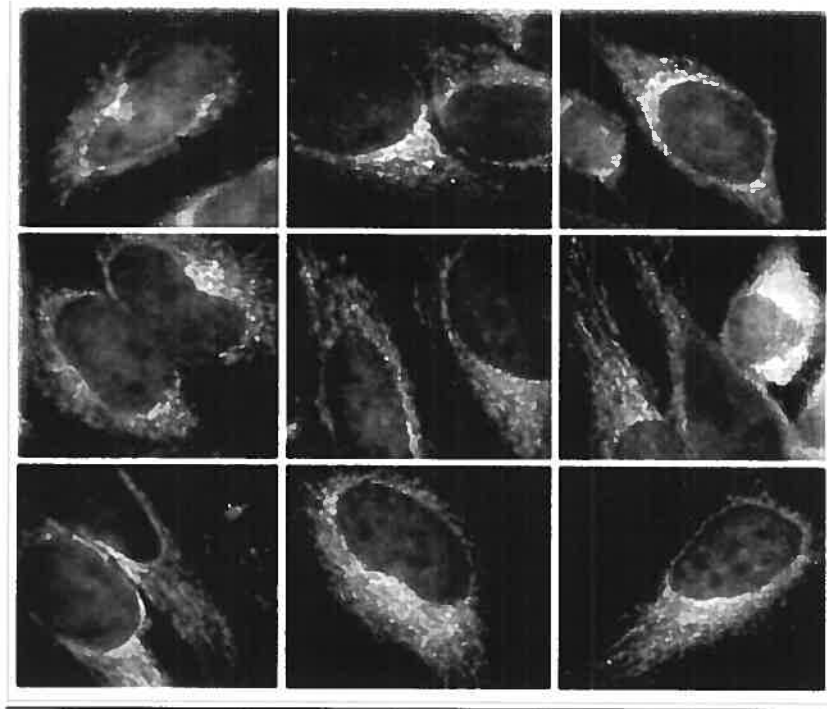


Figure 7: Site de localisation de la SR β dans les cellules HeLa. Après une fixation avec la formaldéhyde, les cellules ont été d'abord mises en contact avec l'anti-SR β #3618 et par la suite un anti-IgG de lapin couplé à la fluorescine. Le montage présente divers exemples de cellules fluorescentes. La fluorescence se retrouve principalement autour du noyau et dans les prolongements cellulaires, définissant le patron habituel du réticulum endoplasmique.

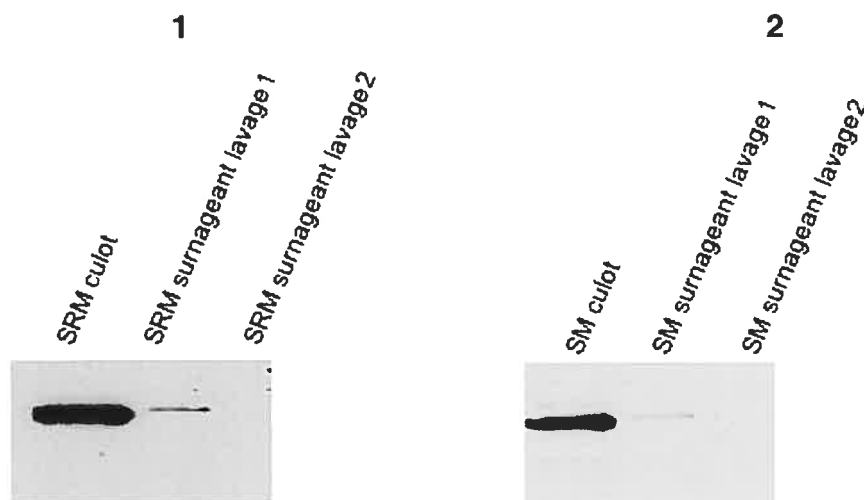


Figure 8: Reconnaissance de la SR β à la surface des microsomes *in vitro*. Les microsomes ont été incubés en présence d'une concentration saturante d'anti-SR β #3618. Après avoir été sédimentés par centrifugation, les culots ainsi que les surnageants provenant des deux lavages consécutifs ont été analysés par immunobuvardage. 1- Résultat obtenu après l'essai de l'anticorps sur une préparation de microsomes rugueux dépourvus de ribosomes (SRM). 2- Résultat obtenu après essai de l'anticorps sur une préparation de microsomes lisses (SM).

3.2 Essai de l'anti-SR β sur la fusion des RM et des SM

Dans le système de fusion *in vitro*, l'ajout de l'anticorps peut avoir deux résultats possibles. La figure 9 résume ces différents résultats. D'abord, l'ajout de MgCl₂ permet le rapprochement entre les différentes vésicules, première étape importante pour la fusion. L'ajout de GTP dans le milieu est indispensable à la fusion pour les deux types de microsomes (Paiement et al., 1980). L'ATP peut également être inclus dans le milieu d'incubation pour permettre la formation de réseaux de citernes lisses (Lavoie et al., 1996). L'ajout de l'anticorps peut diminuer considérablement la taille des vésicules fusionnées allant jusqu'à inhiber complètement la fusion dans certains cas. L'incubation des SRM ainsi que des SM amène à la formation de grandes vésicules. Ces vésicules peuvent être quantifiées de façon statistique afin d'être comparées entre elles. Les vésicules sont des structures définies par une membrane et sont habituellement de forme circulaire entourant un lumen dépourvu de composantes. Le contrôle est la mesure de base pour déterminer s'il y a effet ou non de l'anticorps. Parfois, une seule analyse à l'œil permet de confirmer qu'il n'y a pas de réduction significative de la fusion. Dans les autres cas où la diminution de la taille des vésicules est plus flagrante comme dans la figure 10, l'analyse statistique devient intéressante pour confirmer l'effet de l'anticorps.

Le tableau 2 présente un résumé des trois expériences d'essai de fusion avec l'anti-SR β #3618. Pour chacun des deux types de membranes ; SM et SRM, le diamètre moyen des vésicules, l'écart-type, le diamètre minimum ainsi que le diamètre maximum observés pour chacune des conditions ont été calculés. La figure 11 représente un

histogramme résumant le diamètre moyen des vésicules pour chacune des conditions étudiées. Les deux données portant sur le SM ne présentent pas d'écart-type, puisqu'elles n'ont été répétées que deux fois. Afin de vérifier que la différence entre la taille moyenne du contrôle et la taille moyenne des vésicules soumises à l'anti-SR β ont été soumise à un test-t. Selon la méthode statistique, un test-t est considéré significatif lorsque $p < 0,05$. Donc, pour chacun des paires de données (contrôle et avec anticorps), un «p» a été calculé (dernière ligne dans le tableau 2). Dans les trois essais, une différence statistiquement valable a été observée pour les microsomes rugueux (un $p < 0,01$ pour les trois essais). Un résultat similaire a été obtenu pour les deux essais avec les microsomes lisses (un $p < 0,01$ pour les deux essais).

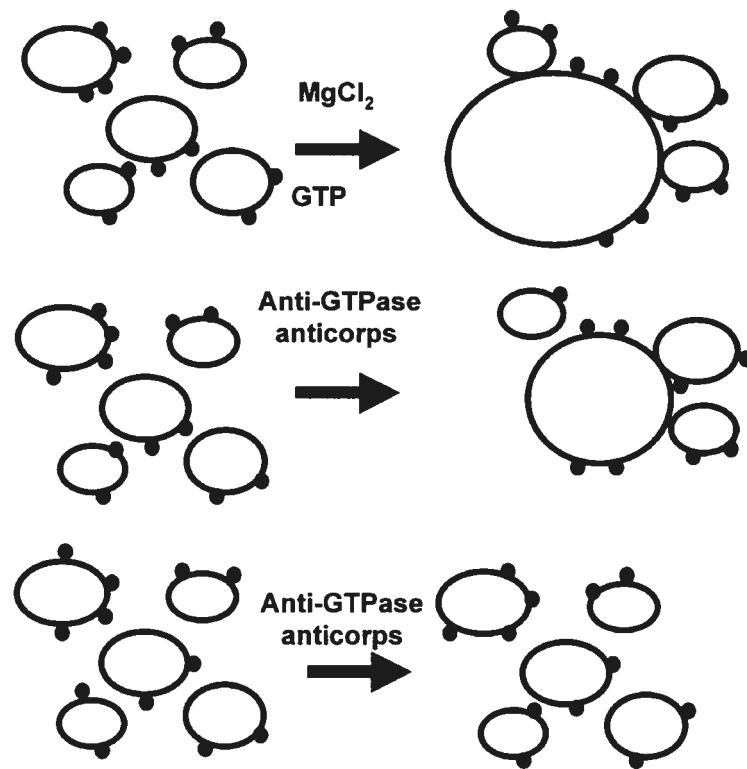


Figure 9: Modèle expliquant le test de fusion *in vitro* utilisé pour l'étude de l'effet de l'anticorps sur la fusion. Lorsque les microsomes sont en présence de $MgCl_2$ et de GTP, ils s'agrègent et se fusionnent, permettant la formation de grandes vésicules (panneau supérieur). Lors de l'ajout de l'anticorps, deux résultats sont possibles; une réduction significative du diamètre des vésicules fusionnées (panneau central) ou une inhibition complète de la fusion (panneau inférieur).

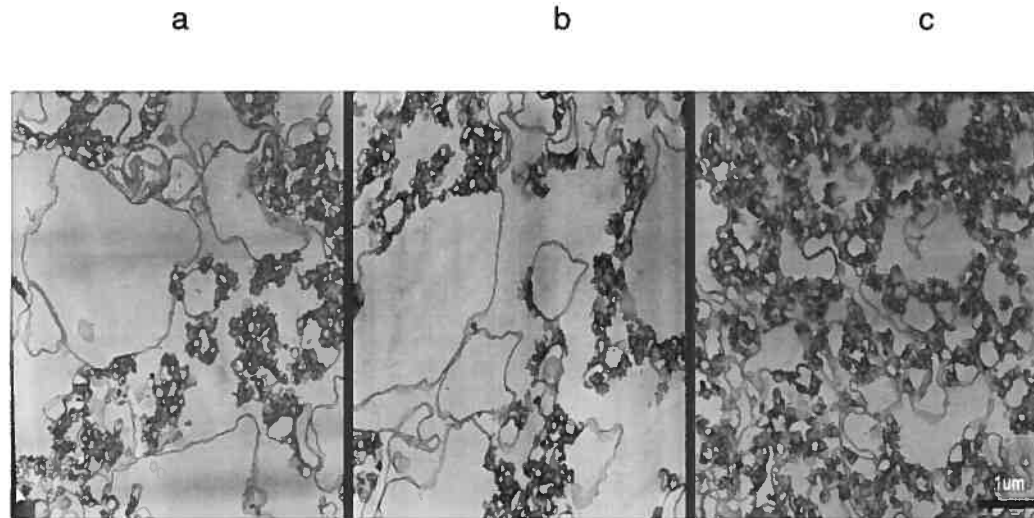


Figure 10: Mise en évidence par microscopie électronique de l'effet de l'anti-SR β sur la fusion des membranes du RE. Une population de SRM a été utilisée. a- La population contrôle a été incubée dans les conditions normales, sans anticorps. Il y a formation de grandes vésicules et il y a quelques vésicules non fusionnées en amas, en périphérie des grandes vésicules. b- Le milieu d'incubation a reçu une quantité de préimmun¹. Il y a également présence de grandes vésicules et une quantité négligeable de vésicules non fusionnées. L'incubation impliquant le préimmun est un deuxième contrôle positif afin de confirmer que ce n'est pas un élément présent dans le sérum qui pourrait être responsable de l'effet sur la fusion. c- Résultat de l'incubation en présence de l'anti-SR β . La fusion est visiblement diminuée et cela est observable par deux faits; le diamètre des vésicules est de beaucoup diminué et il y a un grand nombre de vésicules non fusionnées.

¹ Préimmun : sérum recueilli de l'animal avant qu'il entre en contact avec l'antigène contre lequel on veut produire des anticorps.

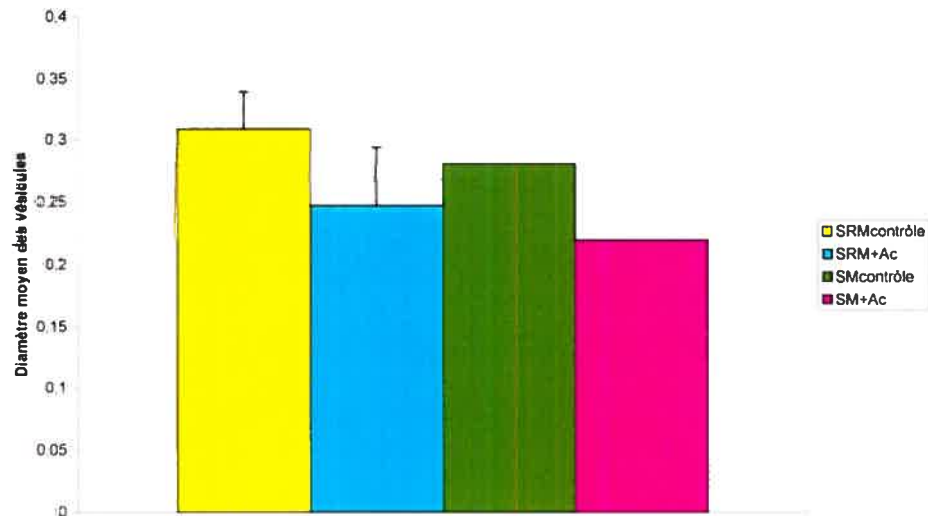


Figure 11: Histogramme représentant les données compilées des trois expériences de fusion. Le diamètre moyen des vésicules pour chacune des expériences a été compilé. Les deux données représentant la population contrôle de vésicules lisses (bâtonnet vert) ainsi que celles de la population de vésicules lisses avec l'anti-SR β #3618 (bâtonnet rose) ne présentent pas d'écart-type, car elles n'ont été répétées que deux fois. **SRM contrôle**, microsomes rugueux dépourvus de ribosomes incubés sans anticorps; **SRM+Ac**, microsomes rugueux dépourvus de ribosomes incubés en présence de l'anti-SR β ; **SM contrôle**, microsomes lisses incubés sans anticorps; **SM+Ac**, microsomes lisses incubés en présence de l'anti-SR β .

Tableau 2: Résumé des trois essais de fusions effectués sur deux types de microsomes; rugueux dépourvus de ribosomes (SRM) et lisses (SM).

Toutes les données statistiques sont réunies dans chacun des tableaux représentant chacun une expérience. **+Ac**, les microsomes ont été incubés en présence de l'anticorps. **N/A**, les résultats n'ont pu être analysés. Par conséquent, les résultats relatifs à cette analyse ne sont pas disponibles.

	Exp 36 (n=1)			
	SRM		SM	
	contrôle	+Ac	contrôle	+Ac
Nbre vésicules	1013	993	620	620
Moyenne (μm)	0,331	0,281	0,337	0,249
Écart-type	0,353	0,238	0,316	0,203
Minimum	0,1	0,1	0,1	0,1
Maximum	3,14	1,92	3,2	1,32
Test-t	p <0,001		p <0,001	

	Exp 37 (n=2)			
	SRM		SM	
	contrôle	+Ac	contrôle	+Ac
Nbre vésicules	1302	1302	1119	1119
Moyenne (μm)	0,288	0,215	0,224	0,191
Écart-type	0,317	0,214	0,185	0,13
Minimum	0,1	0,1	0,1	0,1
Maximum	2,76	1,98	1,19	0,88
Test-t	p <0,001		p <0,001	

	Exp 43 (n=3)			
	SRM		SM	
	contrôle	+Ac	contrôle	+Ac
Nbre vésicules	969	969	N/A	N/A
Moyenne (μm)	0,307	0,246	N/A	N/A
Écart-type	0,116	0,008	N/A	N/A
Test-t	p <0,001		N/A	

3.3 Essai des anti-SR β sur la fusion de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire

Afin de confirmer l'implication de la SR β , un essai de fusion *in vitro* a été tenté sur des préparations nucléaires, et ce, pour trois raisons. D'abord, la membrane externe de l'enveloppe nucléaire a les mêmes compositions physiques que le RE, car elle est un prolongement de ce dernier (Gerace et Burke, 1988). De plus, les incubations devaient être tentées sur des membranes fraîches, donc, qui n'ont pas été congelées auparavant. Enfin, l'hypothèse de départ est de démontrer que non seulement la SR β est impliquée dans la translocation des protéines, mais également dans la reconstitution de la membrane nucléaire des cellules post-mitotiques.

L'étude de la fusion de l'enveloppe nucléaire est beaucoup moins exigeante que celle des microsomes du RE. Pour les noyaux, il suffit de dénombrer les paires de noyaux et les classer selon qu'ils soient fusionnés ou non. La figure 12 présente les trois critères selon lesquels l'étude de la fusion y sont inscrits. La figure 13 montre un exemple de paires de noyaux fusionnés. Un exemple de paires de noyaux non fusionnés est présenté à la figure 14. Le pourcentage de fusion est calculé par rapport au nombre total de paires de noyaux. Le tableau 3 présente les résultats d'une expérience de ce type présentant quatre conditions ; avec ou sans anticorps, ici la SR β #3618, et avec ou sans préincubation. En absence de préincubation, l'anti-SR β a diminué la fusion de 58% à 45%. Cependant, la préincubation de l'anticorps avec les noyaux a permis d'obtenir une réduction de fusion des paires de noyaux de 71% à 32%. Donc, une préincubation de l'anticorps avec les noyaux permet d'observer une réduction de fusion beaucoup plus marquante. L'agrégation des noyaux entre eux semble plus rapide que

la reconnaissance des sites antigéniques par l'anticorps. Donc, la préincubation permet de contourner cette caractéristique physique.

Compte tenu des résultats obtenus, il était intéressant de confirmer que la protéine SR β était bel et bien présente sur la membrane externe de l'enveloppe des noyaux utilisés dans cette étude. Pour cette vérification, un immunobuvardage a été pratiqué sur une préparation de noyaux. La figure 15 présente le résultat obtenu. Il y a bel et bien une bande présente aux environs de 30kDa.

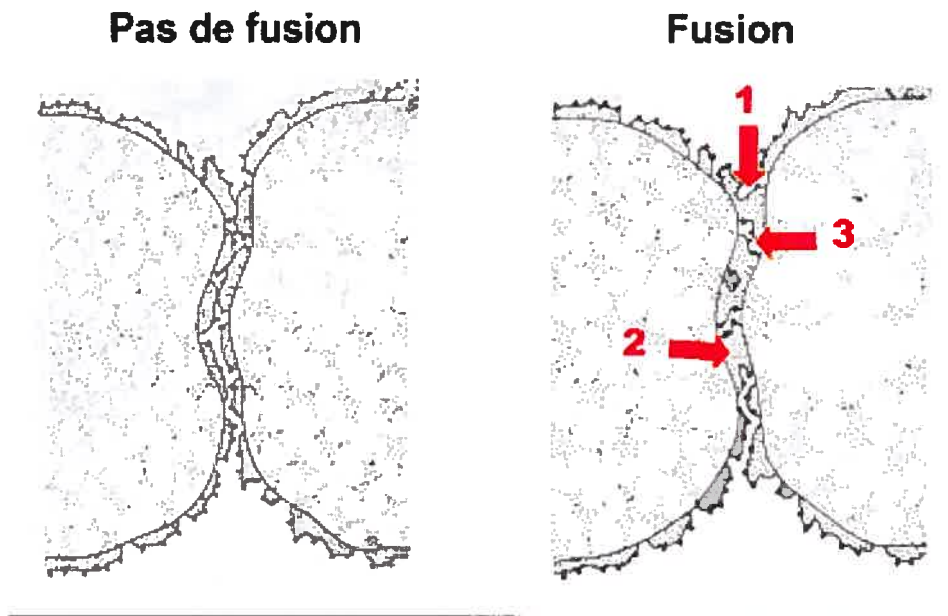


Figure 12: Représentation de la fusion de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Lorsqu'il y a absence de fusion, les noyaux sont côte à côte, mais les membranes externes de chacun des noyaux sont distinctes. Lorsqu'il y a fusion de l'enveloppe externe de deux noyaux adjacents, trois phénomènes sont observables (représentés par les flèches) 1- La membrane externe de l'enveloppe nucléaire des deux noyaux est continue. 2- L'espace nucléaire est commun aux deux noyaux. 3- Il y a formation de vésicules inversées; présentant des ribosomes à l'intérieur de ces vésicules.

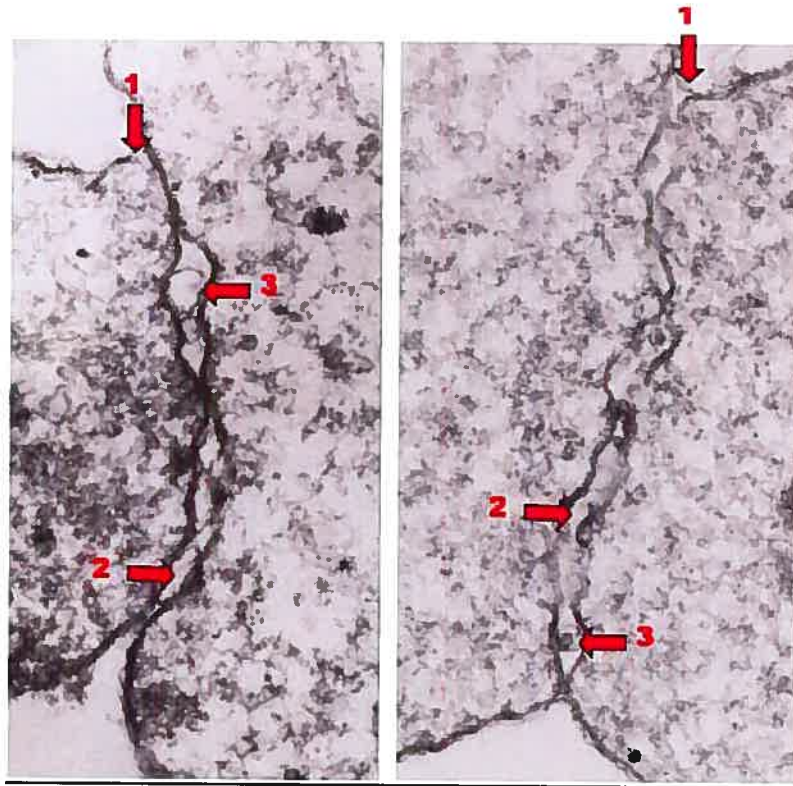


Figure 13 : Représentation en microscopie électronique d'une paire de noyaux fusionnés. Deux exemples de noyaux fusionnés. Chacune des photos présente les trois caractéristiques des membranes externes des enveloppes nucléaires fusionnés. 1- La membrane externe continue entre les deux noyaux. 2- La lumière de l'espace nucléaire est continue et 3- La présence de vésicules inversées, formées par la présence des pores nucléaires.

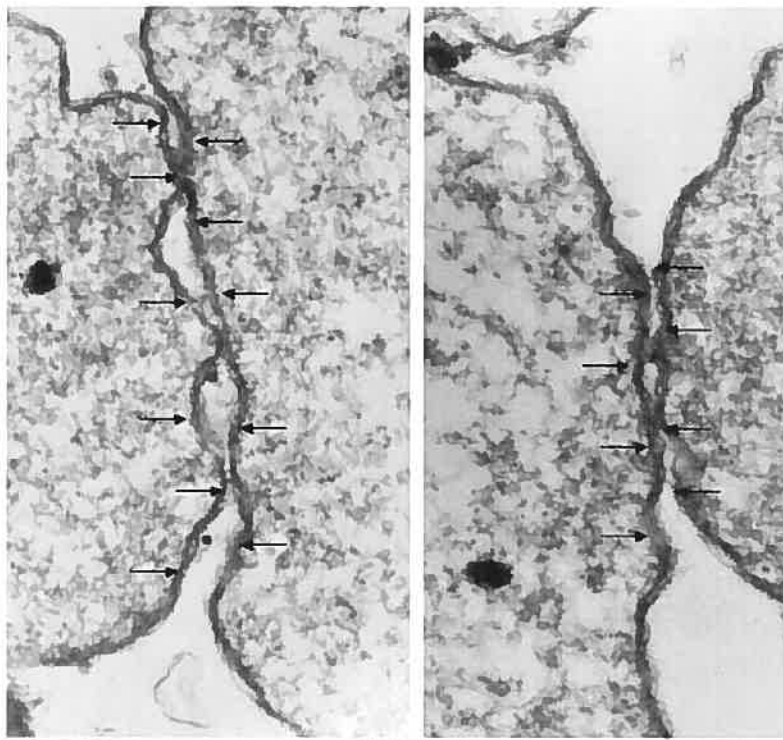
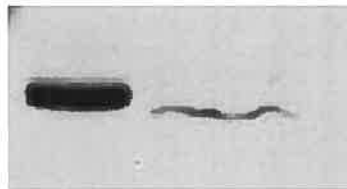


Figure 14: Représentation en microscopie électronique d'une paire de noyaux non fusionnés. Deux exemples de paires de noyaux non fusionnés. Les flèches montrent la membrane externe de l'enveloppe nucléaire de chacun des noyaux bien distincte entre elles.

Tableau 3: Résultats des essais en fusion des membranes externes de l'enveloppe nucléaire.

Conditions	Paires de noyaux observées	Paires de noyaux fusionnées	% de fusion (en %)
Expérience 47 (n=1)			
Contrôle (sans Ac)	50	29	58
Avec Anti-SR β	71	32	45
Contrôle (sans Ac) + préincubation	84	60	71
Avec Anti-SR β + préincubation	102	33	32
Expérience 48 (n=2)			
Contrôle (sans Ac) + préincubation	81	46	56
Avec Anti-SR β + préincubation	83	28	34
Expérience 49 (n=3)			
Contrôle (sans Ac)	89	65	73
Avec Anti-SR β	86	26	30
Contrôle (sans Ac) + préincubation	93	67	72
Avec Anti-SR β + préincubation	98	37	38
Avec Anti-SR β + préincubation + GTP	97	28	29



SRM Noyaux

Figure 15: Immunobuvardage de l'anti-SR β #3618 avec les microsomes rugueux dépourvus de ribosomes et avec les noyaux.

La protéine SR β est beaucoup moins abondante dans la préparation de noyaux, comparativement aux microsomes, car elle est diluée parmi toutes les autres protéines nucléaires.

IV Discussion

À l'aide d'une technique de reconstitution du RE *in vitro*, il a été possible d'étudier des protéines potentiellement nécessaires à la fusion des différents compartiments du RE. Il y a quelques années, il a été démontré que la fusion du RE rugueux était GTP-dépendante (Paiement et al., 1980). Quelques années plus tard, l'ATP s'avérait essentiel à la formation de réseaux tubulaires à partir de microsomes lisses (Lavoie et al., 1996). Dans ce projet, des anticorps anti-GTPases ont été utilisés afin d'identifier la GTPase impliquée dans la fusion GTP-dépendante des membranes.

1. Les rabs

La première famille de protéines GTPases étudiée a été celle des rabs. Leur choix était d'autant plus intéressant compte tenu de leur présence dans les deux types de RE (Lanoix et al., 1996). Aussi, les travaux de Balch et son équipe ont démontré que Rab1 et Rab2 étaient impliquées dans le transport membranaire entre le RE et le Golgi (Tisdale et al., 1992). Il a été également démontré que Rab1 interagit avec le complexe GM130-GRASP65, deux protéines de la matrice golgienne, facilitant la migration des vésicules de transport vers le Golgi (Moyer et al., 2001; Weide et al., 2001). Enfin, Rab1 recruterait la p115, une autre protéine golgienne, dans un complexe cis-SNAREs pour permettre l'accostage des vésicules COPII afin qu'elles fusionnent avec leur membrane cible (Allan, et al. 2000). Plus récemment, on mettait en lumière l'interdépendance de ces deux interactions par la découverte d'une nouvelle protéine nécessaire à ce processus. La protéine Giantine et GM130 se lieraient au domaine acide de P115, permettant ainsi

l'interaction de cette dernière avec Rab1 (Beard et al., 2005). Compte tenu de sa grande implication dans le transport, Rab1 était une candidate de choix. Après avoir confirmé sa présence dans les fractions du RE, et ce, par immunobuvardage, un anticorps dirigé contre Rab1b a été utilisé dans le système de fusion *in vitro*. Cependant, aucun effet n'a été observé sur la fusion, et ce, après trois essais.

La deuxième rab impliquée dans le transport RE-Appareil de Golgi est Rab2. Alors que Rab1 est surtout impliquée dans le transport du RE vers le Golgi, Rab2 est surtout nécessaire au transport inverse; du Golgi vers le RE (Thisdale et al., 1992). Récemment, l'interaction entre Rab2 et une protéine de la matrice du Golgi s'avérait nécessaire à ce type de transport. En effet, lorsque l'on réduisait la quantité de protéine Golgine-45, la structure de l'appareil de Golgi se modifiait et le transport rétrograde était interrompu. Cette protéine forme un complexe avec GRASP55 et Rab2, nécessaire au transport normal des protéines, mais également au maintien de la structure du Golgi (Short et al., 2001). Rab2 est d'ailleurs la seule Rab reconnue par ce complexe, Golgine45/GRASP55, la rendant intéressante à étudier pour vérifier son implication dans la fusion. De plus, dans nos études, l'immunobuvardage avait démontré sa localisation dans le RE rugueux et lisse. Cependant, les tests préliminaires de fusion avec Rab2 en n'ont donné aucun résultat, laissant supposer qu'elle est nécessaire au transport des vésicules, mais pas nécessairement à leur fusion à la membrane réceptrice.

Malgré des résultats négatifs en essai de fusion pour Rab1b et Rab2, les rabs ne peuvent pas être complètement ignorées dans le phénomène de la fusion. En effet, ces résultats négatifs peuvent être dûs uniquement aux anticorps utilisés ou à la méthodologie. Les

modifications apportées au protocole pour l'essai de la SR β n'ont pas été tentées avec les anti-Rabs. Par exemple, aucune pré-incubation ou caractérisation de l'anticorps ont été effectuées. Ces deux modifications auraient pu donner des résultats différents.

2. La sous-unité bêta du récepteur de la particule de reconnaissance des signaux (SR β)

Compte tenu des résultats négatifs obtenus pour l'étude de certaines rabs potentiellement responsables de la fusion des membranes du RE, l'étude s'est portée vers une autre famille de GTPases. Le choix a été déterminé selon deux observations; d'abord, la GTPase potentiellement responsable de la fusion du RE rugueux se situe sous le ribosome (Paiement et al., 1987) et une GTPase du translocon, la sous-unité β de la particule de reconnaissance des signaux, SR β , contrôle la structure du RE dans la levure (Prinze et al., 2000). Le choix de la GTPase à étudier s'est donc porté sur la SR β . Afin de vérifier l'implication de la SR β dans la fusion GTP-dépendante du RE rugueux, plusieurs anti-SR β ont été générés puis caractérisés pour tenter de neutraliser la fusion GTP-dépendante dans un système *in vitro*.

Pour les différents tests à effectuer, un anticorps ayant une réponse spécifique et nette devait être utilisé afin de s'assurer de la validité des résultats obtenus. Pour ce faire, plusieurs expériences ont été faites afin de caractériser cet anticorps; l'anti-SR β #3618, un anticorps polyclonal dirigé contre un peptide de la portion cytosolique de la SR β . Par immunobuvardage, il a été possible de conclure que

l'anticorps était spécifique et reconnaissait bien la SR β dans les trois types de microsomes (SRM, RM et SM), mais également dans la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. En effet, l'anticorps a révélée une bande unique aux environs de 30kDa, poids moléculaire de la protéine SR β . De plus, une immunofluorescence a confirmé la localisation de la protéine. En effet, l'anticorps a donné un marquage caractéristique du réticulum endoplasmique. Par la suite, afin de confirmer que l'épitope contre lequel était dirigé l'anticorps se situait bien du côté cytosolique, un traitement à la protéinase K a été effectué. Comme la diminution du marquage par l'anticorps est remarquable, il est approprié de conclure que l'épitope se situe bien du côté cytosolique, puisqu'elle a été dégradée par la protéinase K. À titre de comparaison, le même traitement a été effectué sur la GRP78 ou BIP, protéine luminale du RE. La concentration de la protéine demeure constante malgré que la concentration de Protéinase K augmente, signifiant qu'elle est hors de portée de la dégradation par la protéase et donc, située dans la lumière des microsomes, protégée par une barrière membranaire. Finalement, il fallait s'assurer, par un test de reconnaissance, que l'anticorps reconnaissait bien la protéine dans sa forme native dans les microsomes utilisés dans les différents tests *in vitro*. Selon les résultats, l'anticorps reconnaît bien une protéine se trouvant dans les microsomes, car la majorité des anticorps a été détectée dans le culot après centrifugation, signifiant la formation d'un complexe anticorps-antigène-microsome.

Après avoir obtenu une vue d'ensemble des propriétés de l'anticorps, les différents tests de fusion ont pu être effectués. D'abord, l'anticorps a été utilisé dans le système de reconstitution *in vitro*, trois fois, sur les microsomes rugueux dépourvus de ribosomes. Dans les trois cas, une différence significative entre le diamètre moyen des

microsomes témoins et le diamètre moyen des microsomes incubés avec l'anticorps a été obtenue. Cette différence a de plus été validée par un test-t. Les essais ont été effectués parallèlement sur des microsomes lisses. Seulement deux essais ont été effectués pour les microsomes lisses.

Lors de l'utilisation de préparation de microsomes lisses, il est important de noter que ce sont les microsomes rugueux de faible densité qui sont sensibles à l'effet de l'anti-SR β . En effet, le dosage morphométrique a été effectué sur ces membranes et non sur les membranes lisses. La fusion des microsomes rugueux précède celle des microsomes lisses. Par la suite, il y a réorganisation de ces microdomaines suivi d'une polarisation qui mène à la formation du réticulum endoplasmique lisse et du réticulum endoplasmique rugueux (observation non publiée).

Afin de confirmer ces résultats, le même anti-SR β a été testé sur des noyaux, et ce, pour trois raisons. D'abord, la membrane externe de l'enveloppe nucléaire possède les mêmes composants physiologiques que le RE car ils sont reliés (Franke et al., 1981; Matsuura et al., 1983). Ensuite, elles fusionnent dans les mêmes conditions que les membranes du RE, en présence de GTP (Paiement, 1981). Enfin, le choix des noyaux était des plus intéressants, car il permettait l'essai de la technique sur des membranes fraîches. En effet, aussitôt obtenus, les noyaux ont été inclus dans le milieu de préincubation. Selon les résultats obtenus, et ce, pour les trois essais, la préincubation des noyaux en avec l'anti-SR β s'est avérée nécessaire, car les noyaux ont tendance à s'agréger davantage lors d'une incubation *in vitro* à 37°C. Cette agrégation est causée par la présence du MgCl₂ dans le milieu d'incubation. De plus, les noyaux doivent être purifiés à partir d'un

homogénat contenant du $MgCl_2$, car ce dernier est nécessaire à la stabilisation de la structure de la chromatine dans les noyaux (Potter et Blodel, 1966). Lors de leur préparation, plusieurs noyaux s'agrègent et sont aptes à se fusionner dès le début de l'incubation en présence de GTP. Afin de favoriser une interaction entre les anti-SR β et la membrane externe de l'enveloppe des noyaux, une préincubation à 4°C a été effectuée en présence et en absence de GTP. Cette préincubation a mener au constat d'un effet de l'anti-SR β sur la fusion GTP-dépendante des membranes de l'enveloppe nucléaire.

À la suite de ces résultats, la présence de la SR β dans la préparation des noyaux a été vérifiée par immunobuvardage. Le résultat a permis de constater que la SR β est bel et bien présente dans la préparation nucléaire. Ce résultat pourrait être dû à une contamination de la préparation de noyaux par des fragments dérivés du RE rugueux. Cependant, cette explication est écartée, car, selon l'étude de la préparation nucléaire au microscope électronique, il y avait peu de microsomes rugueux dans la préparation. De plus, la présence de ribosomes à la surface de l'enveloppe nucléaire témoigne de la présence de la SR β , car elle est nécessaire à l'apposition du ribosome à la membrane lors de la synthèse protéique.

3. Collaborateurs potentiels de la SR β

3.1 La sous-unité alpha du récepteur (SR α)

Les résultats obtenus à l'aide d'un système de reconstitution *in vitro* démontrent l'implication de la SR β dans la fusion de la membrane

du RE rugueux et de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Cependant, il est important de ne pas oublier que d'autres molécules peuvent être impliquées dans cette fusion. Par exemple, la SR β pourrait agir sous forme de complexe; en association avec la deuxième sous-unité du récepteur, la sous-unité α , qui est indispensable à la translocation des protéines. Un complexe de protéines du translocon a déjà été impliqué dans la fusion nucléaire (Ng et Walter, 1996). Cela pourrait être le cas avec le récepteur du SRP.

3.2 Les SNAREs

On ne peut ignorer l'implication des SNAREs dans la séquence d'évènements conduisant à la fusion. Il a été démontré que plusieurs SNAREs étaient impliquées dans les différentes étapes du transport membranaire telles que la fusion et l'accostage des vésicules (Söllner et al., 1993; McNew et al., 2000; Hu et al., 2003). De plus, elles s'associent à plusieurs autres protéines pour assurer leurs fonctions; les rabs (Sogaard et al., 1994), Sec17 (Ungermann et al., 1999) et plus récemment on mettait en lumière l'interaction de Sec17 avec HOP (Collin et al., 2005). Compte tenu de la grande implication des SNAREs dans la fusion ainsi que par leurs multiples interactions avec d'autres protéines GTP-dépendantes, une collaboration avec la SR β est très plausible, car elles remplissent la même fonction.

3.2.1. Syntaxine18

Quelques SNAREs pourraient remplir ce rôle de partenariat avec la SR β . En effet, Syntaxine5, Bet1, Sec22b, Syntaxine17 ainsi que Syntaxine18 sont toutes des SNAREs retrouvées dans le RE. D'ailleurs,

un récepteur pour la SNAP, Syntaxine18, pourrait être une candidate potentielle. En effet, elle possède en immunofluorescence un patron qui chevauche celui de la calnexine, marqueur du RE (Hatsuzawa et al., 2000; Teng et al., 2001). De plus, elle joue un rôle dans le transport impliquant le RE, le compartiment intermédiaire ainsi que l'appareil de Golgi (Hathaway et al., 2000). Plus récemment, son implication dans l'infection par le Papillomavirus était démontrée (Bossis et al., 2005). En effet, lors d'une infection par ce virus, l'attachement du microorganisme à la membrane cellulaire hôte se fait à l'aide de sa capsidie qui reconnaît le complexe d'intégrines $\alpha_2\beta_4$ à la surface de la cellule (Liu et al., 2003). Afin que le génome du virus soit nu pour pénétrer dans le noyau de la cellule hôte où il sera répliqué, le virus doit être désassemblé. Il y a deux voies possibles pour ce désassemblage. La première, la voie des endosomes-lysosomes (March et Helenius, 1989). La deuxième implique le RE comme lieu de désassemblage (Norkin, et al., 2003; Pelkmans et Helenius, 2003). Le SV40 est connu pour utiliser cette dernière voie (Norkin et al., 2003). Selon Bossis et al., un domaine de L2, un composant de la capsidie, se lierait à la Syntaxine18 pour permettre la fusion de la capsidie avec le RE. Une mutation dans le domaine de liaison à la syntaxine18 génère des mutants incapables de lier Syntaxine18 et perturbe le transport des vésicules du RE vers le noyau, puisque la capsidie ne peut se désassembler et, par conséquent, les virions ne peuvent sortir du RE et se rendre au noyau pour être répliqués. Comme l'infection des virus implique un phénomène de fusion et que la syntaxine18 est impliquée dans ce phénomène, peut-être est-il possible qu'elle soit impliquée dans le transport et la fusion du RE dans les cellules saines.

3.2.2. Syntaxine17

La syntaxine17 est une autre SNARE présente dans le RE. Elle serait également impliquée dans le transport entre le RE et le Golgi et serait principalement localisée au niveau du RE lisse (Steehmaier et al., 2000). Compte tenu que le RE rugueux et le RE lisse sont liés, car ils sont en quelque sorte un prolongement l'un de l'autre, il est possible que Syntaxine17 se retrouve dans le RE rugueux et y joue un rôle dans la fusion des membranes du compartiment rugueux du RE. Elle pourrait donc être une candidate intéressante comme partenaire pour la SR β . De plus, la localisation cellulaire de Syntaxine17 serait hétérogène et spécifique selon le type de cellules (Zhang et al., 2005). En effet, selon Zhang et al., la localisation de cette SNARE pourrait varier d'organelles selon le type cellulaire. Une possible localisation commune avec la SR β , laisserait supposer une collaboration entre elles pour la fusion du RE et de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire.

Toute autre SNARE se retrouvant dans le RE rugueux pourrait être une candidate à la fusion du RE. Cependant, le choix de la Syntaxine5 est écarté, car elle s'est avérée impliquée dans la fusion ATP-dépendante du RE lisse (Roy et al., 2000).

3.3 La chaîne naissante

D'autres composantes pourraient être nécessaires à la SR β pour remplir sa fonction, dont la chaîne naissante. C'est cette dernière qui a mené à l'élaboration d'un modèle expliquant sommairement le mécanisme de la fusion impliquant la SR β . La figure 16 présente ce modèle. Selon les résultats obtenus, la SR β est impliquée dans la

fusion. Elle favoriserait un agencement des membranes du RE, ce qui est soutenu par l'observation de Prinz et al. en 1996 qui affirmait que la SR β contrôlait la structure du RE chez la levure. Le modèle propose que la SR β reconnaisse une protéine dans la chaîne naissante sur la membrane opposée, ce qui favoriserait le rapprochement des deux membranes. Cela est en accord avec ce qui avait été proposé auparavant, impliquant une protéine du translocon qui permettait le rapprochement de deux membranes (Ng et Walter, 1996). Dans leur modèle, la protéine Sec63 serait responsable de la fusion et agirait comme une SNARE. Le mécanisme ici, présentant la SR β comme un joueur clé dans la fusion des membranes du RE, ne prétend pas qu'elle agirait sans les SNAREs. En effet, il est plutôt avancé qu'après que la SR β ait favorisé le rapprochement des deux membranes par la reconnaissance d'une protéine dans la chaîne naissance située sur la membrane opposée, une SNARE viendrait compléter la réaction. Comme décrit précédemment, plusieurs SNAREs pourraient remplir cette fonction.

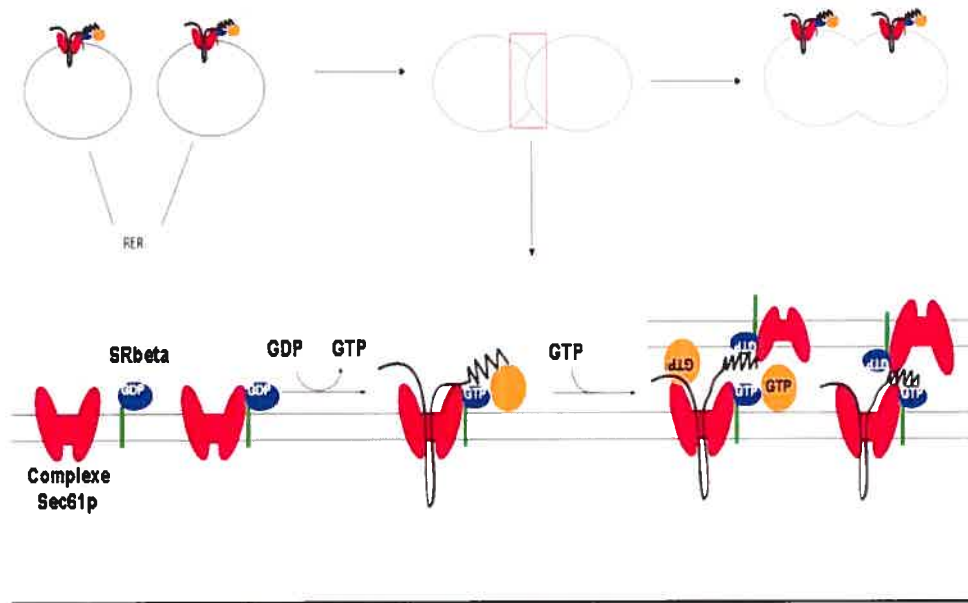


Figure 16: Modèle expliquant la fusion du réticulum endoplasmique impliquant la SR β . D'abord, la SR β se lie au complexe Sec61p. Elle devient sous la forme active (liant le GTP) et forme un complexe avec la SR α (en orange). Le peptide signal de la membrane opposée est reconnu par la SR β , provoquant le rapprochement des deux membranes. Le complexe SR β /SR α se désassemble et une SNARE vient compléter la fusion.

V. Conclusion et perspectives futures

Le but de ce projet était l'étude de GTPases potentiellement responsables de la fusion du réticulum endoplasmique. Elle comportait quatre volets; la confirmation de la localisation des protéines Rabs dans les fractions du RE, déterminer si ces protéines ont un effet sur la fusion du RE, caractériser un anticorps dirigé contre la sous-unité β du récepteur de la particule de reconnaissance des signaux (SR β) et enfin, vérifier l'effet de la SR β dans la fusion du RE et de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire.

D'abord, la première étape de localisation de certaines protéines Rabs a été réussie. En effet, selon les résultats, les rabs sont en plus grande quantité dans les microsomes lisses, ce qui appuie les données obtenues par spectrométrie de masse.

Deux anti-Rabs ont été utilisés dans les tests de reconstitution *in vitro* du RE, soit Rab1b et Rab2. Ce choix avait été déterminé selon la localisation et le lieu de fonction de ces rabs; le RE (Chavrier et al., 1990; Thisdale et al., 1992; Plutner et al., 1992; Pind et al., 1994; Wilson et al., 1994; Saraste et al., 1995). Selon nos résultats, qui ont été refait à trois reprises, aucune réduction visible de la taille des vésicules n'a été observée après l'ajout d'anticorps dirigés contre l'une et l'autre de ces deux rabs.

L'étude s'est donc portée vers la SR β , une autre GTPase, partie intégrante du translocon. Après avoir obtenu un anticorps spécifique que nous avons caractérisé, il a pu être employé dans nos essais de fusion. Après trois essais, les résultats étaient concluants; la SR β avait

bel et bien un effet sur la fusion du RE rugueux et du RE lisse. La confirmation a été obtenue lors de l'essai de ce même anticorps sur une préparation nucléaire. La SR β inhibait la fusion de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire, et ce, pour les trois expériences tentées.

Après avoir élaboré un modèle impliquant la SR β , plusieurs expériences seraient nécessaires afin de confirmer et de compléter ce modèle. D'abord, il serait intéressant de regarder l'implication de la chaîne naissante. Pour ce faire, il suffirait d'introduire de la puromycine dans le milieu d'incubation. La puromycine est un inhibiteur de la synthèse protéique. En effet, elle inhibe l'élongation de la chaîne polypeptidique. Ainsi, il serait possible de vérifier si la chaîne naissante joue un rôle dans la fusion du RE avec la SR β .

Ensuite, il serait important de déterminer quelle est ou quelles sont les SNAREs impliquées dans la fusion du RE. Pour se faire, il pourrait être possible de procéder à une immunoprécipitation avec la SR β et ainsi déterminer si il y a une ou des protéines de type SNARE qui ont précipité avec elle. Le même exercice pourrait être effectué avec d'autres protéines considérées potentiellement collaboratrices de la SR β dans le phénomène de la fusion GTP-dépendante du RE rugueux et de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire.

En conclusion, la sous-unité β du récepteur de la particule de reconnaissance des signaux s'est avérée impliquée dans la fusion du RE rugueux et de la membrane externe de l'enveloppe nucléaire. Plusieurs aspects de cette fusion GTP-dépendante restent à éclaircir afin de comprendre le processus complexe, mais si important qu'est la fusion pour les cellules.

Annexes

Densitométrie

- 1- La première bande est alors sélectionnée à l'aide de l'outil «rectangle».
- 2- Dans le menu déroulant «analyse» sous «gel», la commande «select first lane» est sélectionnée.
- 3- La bande suivante ainsi que celles subséquentes sont entourées à l'aide de l'outil «rectangle». Dans le menu déroulant «analyse» sous «gel», la commande «select next lane» est sélectionnée.
- 4- Lorsque la dernière bande à étudier est sélectionnée, dans le menu déroulant «analyse» sous «gel», la commande «plot lane» est utilisée. Cela amène à la formation de diagrammes en courbes représentant chacune des bandes.
- 5- À l'aide de l'outil «Wand», représentant une baguette magique, chaque aire formée sous la courbe est sélectionné à l'aide de cet outil. Cela permet le calcul de cette aire. Transférer ces données dans Excel (Microsoft Office) les comparer entre elles, afin d'obtenir une quantité relative de chacun des ces fractions.

Immunolocalisation à l'or colloïdal

- 1- Une quantité de 200µg de microsomes est ajoutée à une solution de sérum normal de chèvre /saline 10% préalablement préparée avec une solution saline (0,9%NaCl/10mM tris-HCl).
- 2- La concentration de l'anticorps ajoutée est déterminée par le résultat de ce même anticorps en immunobuvardage. En effet, selon plusieurs tests effectués, la quantité d'anticorps utilisée en immunobuvardage, concentrée d'un facteur 10 est celle qui fonctionne bien en immolocalisation. Par exemple, un anticorps qui serait utilisé à 1/500 dans un immunobuvardage, donnerait un résultat acceptable utilisé à 1/50 en immulocalisation à l'or colloïdal. Les anticorps sont ajoutés doucement aux microsomes
- 3- Les échantillons sont incubés à 4°C durant toute la nuit.
- 4- De la glutaraldéhyde est ajoutée à chacun des échantillons pour une concentration finale de 0,05%.
- 5- Les échantillons sont filtrées sur membranes millipores (pores de 0,45µm; Millipore, Bedford, MA) à l'aide de la solution saline et recouvertes d'une deuxième pellicule préalablement imbibées de solution saline.
- 6- Après trois lavages de 15 minutes à température ambiante dans la solution saline, les pellicules sont bloquées pendant 30

minutes avec une solution de 1%ovalbumine/PBS à température ambiante.

- 7- Les pellicules sont débarrassées de leurs filtres protecteurs et sont mises en contact avec la solution de billes d'or IgG rabbit Gold conjugate (Sigma-Ulrich, Saint-Louis, MO) dilué 1 :10 dans la solution 0,02% PEG/saline, et ce, pour une période de 60 minutes à température ambiante.
- 8- La pellicule est rincée trois fois dans la solution saline avant d'être lavée à nouveau dans la solution saline pour deux périodes de quinze minutes, dont l'une à température ambiante et la deuxième à 4°C.
- 9- Les pellicules subissent deux lavages de 15 minutes à 4°C dans le tampon cacodylate (0,1M, pH 7,4) avant d'être refixées 4°C durant toute la nuit avec 2,5% de glutaraldéhyde dans du tampon cacodylate (100mM, pH 7.4). Le reste du protocole est similaire à celui décrit pour les incubations (voir section II-6, enrobage pour microscopie électronique)

Séquence peptidique de la protéine SR β chez le rat

MASANTRRVG DGAGGAFQPY LDSLRQELQQ **RDPTLLSVAV
ALLAVLLTLV FWKFIWSRKS SQRAVLFVGL CDSGKTLLFV
RLLTGQYRDT QTSITDSSAI YKVNNNRGNS LTLIDLPGHE
SLRFQLLDRF KSSARAVVFV VDSAAFQREV KDVAEFLYQV
LIDSMALKNS PSLLIACNKQ DIAMAKSAKL IQQLEKELN
TLRVTRSAAP STLDSSSTAP AQLGKKGKEF EFSQLPLKVE
FLECSAKGGR GDTGSADIQD LEKWLAKIA**

Figure 17 : Séquence peptidique de la protéine SR β chez le rat.

En **bleu** est représenté le domaine transmembranaire. Le peptide contre lequel est dirigé l'anticorps anti-SR β #3618 utilisé dans les différentes analyses est en **rouge**. Le numéro d'identification de cette protéine dans les banques de données est gi :61676217.

Références

- Acharya U, Jacobs R, Peters JM, Watson N, Farquhar MG et Malhotra V (1995). "The formation of Golgi stacks from vesiculated Golgi membranes requires two distinct fusion events." *Cell* **82**(6): 895-904.
- Alexandrov K, Horiuchi H, Steele-Mortimer O, Seabra MC et Zerial M (1994). "Rab escort protein-1 is a multifunctional protein that accompanies newly prenylated rab proteins to their target membranes." *EMBO J* **13**(22): 5262-5273.
- Allan BB, Moyer BD et Balch WE (2000). "Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion." *Science* **289**(5478): 444-448.
- Anant JS, Desnoyers L, Machius M, Demeler B, Hansen JC, Westover KD, Deisenhofer J et Seabra MC (1998). "Mechanism of Rab geranylgeranylation: formation of the catalytic ternary complex." *Biochemistry* **37**(36): 12559-12568.
- Andrei V. Nikonov, Erik Snapp, Jennifer Lippincott-Schwartz et Gert Kreibich (2002). "Active translocon complexes labeled with GFP-Dad1 diffuse slowly as large polysome arrays in the endoplasmic reticulum." *Journal Of Cell Biology* **158**: 497-506.
- Angelin B, Daneholt B, Jörnvall H, Pettersson RetRingertz N (1999). *The Nobel Committee for Physiology or Medicine*. Blobel G, Stockholm, Sweden.
- Antonin W, Fasshauer D, Becker S, Jahn R et Schneider TR (2002). "Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs." *Nat Struct Biol* **9**(2): 107-111.
- Bacher G, Lutcke H, Jungnickel B, Rapoport TA et Dobberstein B. (1996). "Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting." *Nature* **381**(6579): 248-251.
- Bacher G, Pool M et Dobberstein B. (1999). "The ribosome regulates the GTPase of the beta-subunit of the signal recognition particle

- receptor." *Journal of Cell Biology* **146**(4): 723-730.
- Beard M, Satoh A, Shorter J et Warren G (2005). "A cryptic rab1-binding site in the p115 tethering protein." *J Biol Chem* **publié en manuscrit**.
- Beckmann R, Spahn CM, Eswar N, Helmers J, Penczek PA, Sali A, Frank J et Blobel G (2001). "Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome." *Cell* **107**(3): 361-372.
- Black VH, Sanjay A, van Leyen K, Moeller I, Luring B et Kreibich G (2002). "Cholesterol and steroid synthesizing smooth endoplasmic reticulum of adrenocortical cells contains high levels of translocation apparatus proteins." *Endocr Res* **28**(4): 425-430.
- Blobel G (1980). "Intracellular protein topogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 1496-1500.
- Blobel G et Potter VR (1966). "Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield." *Science* **154**(757): 1662-1665.
- Bloom GS et Goldstein LS (1998). "Cruising along microtubule highways: how membranes move through the secretory pathway." *J Cell Biol* **140**(6): 1277-1280.
- Blumenthal, R (1987). "Membranes fusion." *Curr. Top.membr.trans.* **29**: 203-154.
- Boman AL, Delannoy MR et Wilson KL (1992). "GTP hydrolysis is required for vesicle fusion during nuclear envelope assembly in vitro." *J Cell Biol* **116**(2): 281-294
- Boman AL et Kahn RA (1995). "Arf proteins: the membrane traffic police?" *Trends Biochem Sci* **20**(4): 147-150.
- Boman AL, Taylor TC, Melancon P et Wilson KL, (1992). "A role for ADP-ribosylation factor in nuclear vesicle dynamics." *Nature* **358**(6386): 512-514.
- Bossis I, Roden RB, Gambhira R, Yang R, Tagaya M, Howley PM et Meneses PI (2005). "Interaction of tSNARE syntaxin 18 with the papillomavirus minor capsid protein mediates infection." *J Virol* **79**(11): 6723-6731.

- Brodsky JL, Hamamoto S, Feldheim D et Schekman R (1993). "Reconstitution of protein translocation from solubilized yeast membranes reveals topologically distinct roles for BiP and cytosolic Hsc70." *J Cell Biol* **120**(1): 95-102.
- Brymora A, Valova VA, Larsen MR, Roufogalis BD et Robinson PJ (2001). "The brain exocyst complex interacts with RalA in a GTP-dependent manner: identification of a novel mammalian Sec3 gene and a second Sec15 gene." *J Biol Chem* **276**(32): 29792-29797.
- Chavrier P, Gorvel JP, Stelzer E, Simons K, Gruenberg J et Zerial M (1991). "Hypervariable C-terminal domain of rab proteins acts as a targeting signal." *Nature* **353**(6346): 769-772.
- Chavrier P, Parton RG, Hauri HP, Simons K et Zerial M. (1990). "Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments." *Cell* **62**: 317-329.
- Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD et Zerial M (1999). "The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking." *Nature* **397**(6720): 621-625.
- Cole NB et Lippincott-Schwartz J (1995). "Organization of organelles and membrane traffic by microtubules." *Curr Opin Cell Biol* **7**(1).
- Collins KM, Thorngren NL, Fratti RA et Wickner WT (2005). "Sec17p and HOPS, in distinct SNARE complexes, mediate SNARE complex disruption or assembly for fusion." *EMBO J* **24**(10): 1775-1786.
- Creutz CE (1992). Membrane fusion and exocytosis. Fundamentals of medical cell biology. Membrane dynamics and signaling. B. EE, JAI Press. **5A**: 21-39.
- Dallner G, Siekevitz P et Palade GE (1966). "Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. I. Structural and chemical differentiation in developing rat hepatocyte." *J Cell Biol* **30**(1): 73-96.
- Davidson MW (1995). Molecular Expression Cell Biology, Florida State University. **2005**.
- Dawson AP, Hills G et Comerford JG (1987). "The mechanism of action of GTP on Ca²⁺ efflux from rat liver microsomal vesicles." *Biochem J* **244**(1): 87-92.

- De Meis L et Vianna AL. (1979). "Energy interconversion by the Ca²⁺-dependent ATPase of the sarcoplasmic reticulum." *Annu Rev Biochem* **48**: 275-292.
- Dirac-Svejstrup AB, Sumizawa T et Pfeffer SR (1997). "Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI." *EMBO J* **16**(3): 465-472.
- Doye V et Hurt E (1997). "From nucleoporins to nuclear pore complexes." *Curr Opin Cell Biol* **9**(3): 401-411.
- Farquhar MG et Hauri HP (1997). "Protein sorting and vesicular traffic in the Golgi apparatus". *The Golgi Apparatus*. R. J. Berger EG, Berkhauser Verlag, Basel: 63-128.
- Fasshauer D (2003). "Structural insights into the SNARE mechanism." *Biochem Biophys Acta* **1641**: 87-97.
- Ferro-Novick S et Jahn R (1994). "Vesicle fusion from yeast to man." *Nature* **370**(6486): 1991-1993.
- Finger FP et Novick P (1998). "Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast." *J Cell Biol* **142**(3): 609-612.
- Fischer von Mollard G, Mignery GA, Baumert M, Perin MS, Hanson TJ, Burger PM, Jahn R, Sudhof TC (1990). "rab3 is a small GTP-binding protein exclusively localized to synaptic vesicles." *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(5): 1988-1992.
- Focia PJ, Shepotinovskaya IV, Seidler JA, et Freymann DM (2004). "Heterodimeric GTPase Core of the SRP Targeting Complex." *Science* **303**(5656): 373-377.
- Franke WW, Scheer U, Krohne G et Jarasch ED (1981). "The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery." *J Cell Biol* **91**: 39s-50s.
- Fukuda M (2003). "Slp4-a/granuphilin-a inhibits dense-core vesicle exocytosis through interaction with the GDP-bound form of Rab27A in PC12 cells." *J Biol Chem* **278**(17): 13590-13596.

- Galli T, Chilcote T, Mundigl O, Binz T, Niemann H et De Camilli P (1994). "Tetanus toxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs exocytosis of transferrin receptor-containing vesicles in CHO cells." *J Cell Biol* **125**(5): 1015-1024.
- Galli T, Martinez-Arca S et Paumet F (2002). "Mécanisme de la fusion membranaire." *Médecine Science* **18**(11): 1113-1119.
- Gallwitz D, Donath C et Sander C (1983). "A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product." *Nature* **306**(5944): 704-707.
- Gerace L et Burke B (1988). "Functional organization of the nuclear envelope." *Annu Rev Cell Biol* **4**: 335-374.
- Görllich D et Kutay U (1999). "Transport between the cell nucleus and the cytoplasm." *Annu Rev Cell and Dev. Biol.* **15**: 607-660.
- Gorvel JP, Chavrier P, Zerial M et Gruenberg J (1991). "rab5 controls early endosome fusion in vitro." *Cell* **64**(5): 915-925.
- Gruenberg JE et Howell KE (1986). "Reconstitution of vesicle fusions occurring in endocytosis with a cell-free system." *EMBO J* **5**(12): 3091-3101.
- Guo W, Sacher M, Barrowman J, Ferro-Novick S et Novick P (2000). "Protein complexes in transport vesicle targeting." *Trends Cell Biol* **10**(6): 251-255.
- Haas IG (1991). "BIP-a heat shock protein involved in immunoglobulin chain assembly." *Curr Top Microbiol Immunol* **167**: 71-82.
- Hatsuzawa K, Hirose H, Tani K, Yamamoto A, Scheller RH et Tagaya M (2000). "Syntaxin 18, a SNAP receptor that functions in the endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and cis-Golgi vesicle trafficking." *J Biol Chem* **275**(18): 13713-13720.
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, Hata Y, Sudhof TC et Niemann H (1994). "Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly." *EMBO J* **13**(21): 5051-5061.
- Hu C, Ahmed M, ; Melia T, Söllner TH, Mayer T et Rothman JE, (2003). "Fusion of cells by flipped SNAREs." *Science* **300**(5626): 1745-1749.

- Jahn R, Lang T et Sudhof TC. (2003). "Membrane fusion." *Cell* **112**(4): 519-533.
- Jahn R et Sudhof TC (1999). "Membrane fusion and exocytosis." *Annu Rev Biochem.* **68**: 863-911.
- Johnson AE et van Waes MA (1999). "The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane." *Annu Rev Cell Biol* **15**: 799-842.
- Kuzmin PI, Zimmerberg J, Chizmadzhev YA et Cohen FS (2001). "A quantitative model for membrane fusion based on low-energy intermediates." *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(13): 7235-7240.
- Lanoix J et Paiement J (1995). "Changes in GTP-dependent fusion and ras-related proteins in membranes from rat hepatocellular carcinomas." *Cancer Lett.* **98**(1): 1-8.
- Latterich M, Frohlich KU et Schekman R (1995). "Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes." *Cell* **82**(6): 885-893.
- Lavoie C, Lanoix J, Kan FW et Paiement J (1996). "Cell-free assembly of rough and smooth endoplasmic reticulum." *J Cell Sci* **109**: 1415-1425.
- Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Demolliere C, Duden R, Emr SD, Riezman H, Cosson P. (1994). "Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum." *Cell* **79**(7): 1199-1207.
- Leung SM, Chen D, DasGupta BR, Whiteheart SW et Apodaca G (1998). "SNAP-23 requirement for transferrin recycling in Streptolysin-O-permeabilized Madin-Darby canine kidney cells." *J Biol Chem* **273**(28): 17732-17741.
- Littleton JT (2000). "A genomic analysis of membrane trafficking and neurotransmitter release in *Drosophila*." *J Cell Biol* **150**(2): F77-82.
- Liu X, Mayeda A, Tao M et Zheng ZM, (2003). "Exonic splicing enhancer-dependent selection of the bovine papillomavirus type 1 nucleotide 3225 3' splice site can be rescued in a cell lacking splicing factor ASF/SF2 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway." *J.Virol* **77**: 2105-

2115.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et Randall RJ (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Marsh M et Helenius A (1989). "Virus entry into animal cells." *Adv Wirus Res* **36**: 107-151.
- Matsuura S, Masuda R, Sakai O et Tashiro Y (1983). "Immunoelectron microscopy of the outer membrane of rat hepatocyte nuclear envelopes in relation to the rough endoplasmic reticulum." *Cell Struct Funct* **8**(1): 1-9.
- Mattaj IW et Englmeier L (1998). "Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase." *Annu Rev Biochem.* **67**: 265-306.
- McNew JA, Parlati F, Fukuda R, Johnston RJ, Paz K, Paumet F, Sollner TH et Rothman JE. (2000). "Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins." *Nature* **407**(6801): 153-159.
- Merithew E, Stone C, Eathiraj S et Lambright DG (2003). "Determinants of Rab5 interaction with the N terminus of early endosome antigen 1." *J Biol Chem* **278**(10): 8494-8500.
- Miller JD, Tajima S, Lauffer L et Walter P (1995). "The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane." *J of Cell Biol* **128**(3): 273-282.
- Miller JD, Wilhelm H, Gierasch L, Gilmore R et Walter P (1993). "GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation." *Nature* **366**(6453): 351-354.
- Mizuno M et Singer SJ (1994). "A possible role for stable microtubules in intracellular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus." *J Cell Sci* **107**(Pt 5): 1321-1331.
- Montecucco C et Schiavo G (1994). "Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins." *Mol Microbio* **13**(1): 1-8.

- Moyer BD, Allan BB et Balch WE (2001). "Rab1 interaction with a GM130 effector complex regulates COPII vesicle cis-Golgi tethering." *Traffic* **2**(4): 268-276.
- Newport J et Dunhy W (1992). "Characterization of the membrane binding and fusion events during nuclear envelope assembly using purified components." *J Cell Biol* **116**(2): 295-306.
- Ng DT et Walter P (1996). "ER membrane protein complex required for nuclear fusion." *J Cell Biol* **134**(4): 499-509.
- Nielsen E, Severin F, Backer JM, Hyman AA et Zerial M (1999). "Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules." *Nat Cell Biol* **1**(6): 376-382.
- Niemann H, Blasi J et Jahn R (1994). "Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis." *Trends Cell Bio* **4**(5): 179-185.
- Nikonov A, Snapp E, Lippincott-Schwartz J, et Kreibich G (2002). "Active translocon complexes labeled with GFP-Dad1 diffuse slowly as large polysome arrays in the endoplasmic reticulum." *J Cell Biol* **158**(3): 497-506.
- Noguchi H et Takasu M. (2001). "Self-assembly of amphiphiles into vesicles: a Brownian dynamics simulation." *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* **64**(4 Pt1): 041913.
- Norkin LC, Anderson HA, Wolfrom SA et Oppenheim A, (2002). "Caveolar Endocytosis of Simian Virus 40 Is Followed by Brefeldin A-Sensitive Transport to the Endoplasmic Reticulum, Where the Virus Disassembles." *J Virol* **76**(1): 5156-5166.
- Ogg SC, Barz WP et Walter P (1998). "A functional GTPase domain, but not its transmembrane domain, is required for function of the SRP receptor beta-subunit." *J of Cell Biol* **142**(2): 341-354.
- Paiement J (1981). "GTP-dependent fusion of outer nuclear membranes in vitro." *Exp Cell Res* **134**(1): 93-102.
- Paiement J (1984). "Physiological concentrations of GTP stimulate fusion of the endoplasmic reticulum and the nuclear envelope." *Exp Cell Res* **151**(2): 354-366.
- Paiement J et Bergeron JJ (1983). "Localization of GTP-stimulated core glycosylation to fused microsomes." *J Cell Biol* **96**(6): 1791-1796.

- Paiement J, Rindress D, Smith CE, Poliquin L et Bergeron JJ (1987). "Properties of a GTP sensitive microdomain in rough microsomes." *Biochem Biophys Acta*. **898**(1): 6-22.
- Paiement J, Young R, Roy L, and Bergeron JJM. (2005). Isolation of rough and smooth membrane domains of the endoplasmic reticulum from rat liver. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. J. Celis, Elsevier Academic Press.
- Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S et Rapoport TA (1995). "Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p." *Cell* **81**(4): 561-570.
- Pasqualato S, Senic-Matuglia F, Renault L, Goud B, Salamero J et Cherfils J (2004). "The structural GDP/GTP cycle of Rab11 reveals a novel interface involved in the dynamics of recycling endosomes." *J Biol Chem* **279**(12): 11480-11488.
- Pelkmans L et Helenius A (2003). "Insider information: what viruses tell us about endocytosis." *Curr Opin Cell Biol* **15**(4): 414-422.
- Pereira-Leal JB et Seabra MC (2000). "The mammalian Rab family of small GTPases: definition of family and subfamily sequence motifs suggests a mechanism for functional specificity in the Ras superfamily." *J Mol Biol* **301**(4): 1077-1087.
- Pfeffer SR (1999). "Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs." *Nat Cell Biol* **1**(1): 17-22.
- Pind SN, Noeffler C, McCaffery JM, Plutner H, Davidson HW, Farquhar MG et Balch WE. (1994). "Rab1 and Ca²⁺ are required for the fusion of carrier vesicles mediating endoplasmic reticulum to Golgi transport." *J Cell Biol* **125**: 239-252.
- Plutner H, Davidson HW, Saraste J et Balch WE. (1992). "Morphological analysis of protein transport from the ER to Golgi membranes in digitonin-permeabilized cells: role of the P58 containing compartment." *J Cell Biol* **119**: 1097-1116.
- Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E et Beckwith J (1997). "Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme." *Cell* **91**(5): 563-566.

- Powers T et Walter P (1995). "Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases." *Science* **269**(5229): 1422-1424.
- Rabouille C, Levine TP, Peters JM et Warren G (1995). "An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments." *Cell* **82**(6): 905-914.
- Rapiejko PJ et Gilmore R (1992). "Protein translocation across the ER requires a functional GTP binding site in the alpha subunit of the signal recognition particle receptor." *J of Cell Biol* **117**(3): 493-503.
- Rapiejko PJ et Gilmore R (1997). "Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum." *Cell* **89**(5): 703-713.
- Rothman JE et Orci L (1992). "Molecular dissection of the secretory pathway." *Nature* **355**(6359): 409-415.
- Rothman JE et Wieland FT (1996). "Protein sorting by transport vesicles." *Science* **272**(5259): 227-234.
- Roy L, Bergeron JJ, Lavoie C, Hendriks R, Gushue J, Fazel A, Pelletier A, Morre DJ, Subramaniam VN, Hong W et Paiement J (2000). "Role of p97 and syntaxin 5 in the assembly of transitional endoplasmic reticulum." *Mol Biol Cell* **11**(8): 2529-2542.
- Saraste J, Lathinen U et Goud B (1995). "Localization of the small GTP-binding protein rab1p to early compartments of the secretory pathway." *J Cell Sci* **108**: 1541-1552.
- Schekman R et Orci L (1996). "Coat proteins and vesicle budding." *Science* **271**(5255): 1526-1533.
- Schoch S, Deak F, Konigstorfer A, Mozhayeva M, Sara Y, Sudhof TC et Kavalali ET (2001). "SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice." *Science* **294**(5544): 1117-1122.
- Schwartz T et Blobel G (2003). "Structural basis for the function of the beta subunit of the eukaryotic signal recognition particle receptor." *Cell* **112**(6): 793-803.

- Seemann J, Jokitalo EJ et Warren G (2000). "The role of the tethering proteins p115 and GM130 in transport through the Golgi apparatus in vivo." *Mol Biol Cell* **11**(2): 635-645.
- Short B, Preisinger C, Korner R, Kopajtich R, Byron O et Barr FA (2001). "A GRASP55-rab2 effector complex linking Golgi structure to membrane traffic." *J Cell Biol* **155**(6): 873-875.
- Sogaard M, Tani K, Ye RR, Geromanos S, Tempst P, Kirchhausen T, Rothman JE et Sollner T (1994). "A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles." *Cell* **78**(6): 937-948.
- Söllner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P et Rothman JE (1993). "SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion." *Nature* **362**(6418): 318-324.
- Song W, Raden D, Mandon EC et Gilmore R (2000). "Role of Sec61alpha in the regulated transfer of the ribosome-nascent chain complex from the signal recognition particle to the translocation channel." *Cell* **100**(3): 333-343.
- Stein O, et Stein Y. (1967). "Lipid synthesis, intracellular transport, storage and secretion. I. Electron microscopic radioautographic study of liver after injection of tritiated palmitate or glycerol in dasted and ethanol treated rats." *J Cell Biol* **33**(2): 319-339.
- Stenmark H et Olkkonen VM (2001). "The Rab GTPase family." *Genome Biol.* **2**(5): REVIEWS 3007.
- Stuurman N, Heins S et Aebi U (1998). "Nuclear Lamins: Their structure, Assembly and Interactions." *J Struct Biol* **122**(1-2): 42-66.
- Sutton RB, Fasshauer D, Jahn R et Brunger AT (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." *Nature* **395**(6700): 347-353.
- Tajima S, Lauffer L, Rath VL et Walter P (1986). "The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains." *J of Cell Biol* **103**(4): 1167-1178.
- Teng FY, Wang Y et Tang BL (2001). "The syntaxins." *Genome Biol.* **2**(11): REWIEWS3012.

- Terzi L, Pool MR, Dobberstein B et Strub K (2004). "Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition." *Biochemistry* **43**(1): 107-117.
- Tisdale EJ, Bourne JR, Khosravi-Far R, Der CJ et Balch WE (1992). "GTP-binding mutants of rab1 and rab2 are potent inhibitors of vesicular transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex." *J Cell Biol* **119**(4): 749-761.
- Touchot N, Chardin P et Tavittian A (1987). "Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: molecular cloning of YPT-related cDNAs from a rat brain library" *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(23): 8210-8214.
- Turner MD, Plutner H et Balch WE (1997). "A Rab GTPase is required for homotypic assembly of the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **272**(21): 13479-13483.
- Ungermann C, von Mollard GF, Jensen ON, Margolis N, Stevens TH et Wickner W (1999). "Three v-SNAREs and two t-SNAREs, present in a pentameric cis-SNARE complex on isolated vacuoles, are essential for homotypic fusion." *J Cell Biol* **145**(7): 1435-1442.
- Vigers MJ et Lohka GP (1991). "A distinct vesicle population targets membranes and pore complexes to the nuclear envelope in *Xenopus* eggs." *J Cell Biol* **112**(4): 545-556.
- Vale RD (2003). "The molecular motor toolbox for intracellular transport." *Cell* **112**(4): 467-480.
- Walter P et Johnson AE (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." *Annu Rev Cell Biol* **10**: 87-119.
- Ward DM, Leslie JD et Kaplan J (1997). "Homotypic lysosome fusion in macrophages: analysis using an in vitro assay." *J Cell Biol* **139**(3): 665-673.
- Washbourne P, Thompson PM, Carta M, Costa ET, Mathews JR, Lopez-Bendito G, Molnar Z, Becher MW, Valenzuela CF, Partridge LD et Wilson MC (2002). "Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis." *Nature neurosci* **5**(1): 4-6.

- Watkins JD, Hermanowski AL et Balch WE (1993). "Oligomerization of immunoglobulin G heavy and light chains in vitro. A cell-free assay to study the assembly of the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **268**(7): 5182-5192.
- Weichenrieder O, Wild K, Strub K et Cusack S (2000). "Structure and assembly of the Alu domain of the mammalian signal recognition particle." *Nature* **408**(6809): 167-173.
- Weide T, Bayer M, Koster M, Siebrasse JP, Peters R et Barnekow A (2001). "The Golgi matrix protein GM130: a specific interacting partner of the small GTPase rab1b." *EMBO Rep* **2**(4): 336-341.
- Wilson BS, Nuoffer C, Meinkoth JL, McCarffery M, Feramisco JR et Balch WE. (1994). "A Rab1 mutant affecting guanine nucleotide exchange promotes disassembly of the Golgi apparatus." *J Cell Biol* **125**: 557-571.
- Yang L et Huang HW (2002). "Observation of a membrane fusion intermediate structure." *Science* **297**(5588): 1877-1879.
- Young JC, Ursini J, Legate KR, Miller JD, Walter P et Andrews DW (1995). "An amino-terminal domain containing hydrophobic and hydrophilic sequences binds the signal recognition particle receptor alpha subunit to the beta subunit on the endoplasmic reticulum membrane." *J Biol Chem* **270**(26): 15650-15657.
- Zerial M et McBride H (2001). "Rab proteins as membrane organizers." *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(3): 216.
- Zhang C, Hutchins JR, Muhlhauser P, Kutay U et Clarke PR (2002). "Role of importin-beta in the control of nuclear envelope assembly by Ran." *Curr Biol*. **12**(6): 498-502.
- Zhang Q, Li J, Deavers M, Abbruzzese JL et Ho L (2005). "The Subcellular Localization of Syntaxin 17 Varies among Different Cell Types and Is Altered in some Malignant Cells." *J Histochem Cytochem*(Epub ahead of print).

Remerciements

D'abord, je voudrais remercier mon directeur de recherche, le Dr Jacques Paiement, de m'avoir permis de faire ce projet. Merci infiniment d'avoir cru en moi.

Merci à mon comité de parrainage et de correction; Dr Nicole Leclerc et Dr Roger Lippé. Merci d'avoir pris de votre temps pour m'aider dans mon cheminement.

Merci à tous les gens du département de pathologie et biologie cellulaire. Spécialement à Angela Anton, Marie-Eve Fortin, Guillaume Goyette, Mélissa Meilleur, Laura Neigri, Sara Solinet et Thao «Petite Banane» Dang. Vous êtes devenus plus que des collègues de travail. Merci.

Merci à mes deux meilleures amies; Valérie Alain et Catherine Rhéaume. Merci, les filles pour votre support et votre amitié. Sans vous, je n'aurai jamais pu me rendre jusqu'au bout. Merci.

Merci à Pierre, David, Frank, Benjamin, Joel et LP. Sans le savoir, vous avez été d'un grand divertissement et durant mes deux années de maîtrise, m'avez permis de rêver. Merci!

Enfin, je voudrais remercier les trois personnes les plus importantes dans ma vie. Sans eux, je n'aurai jamais pu accomplir ce grand défi; mes parents, André et Francine, et mon grand frère, François. Vous êtes ma source d'inspiration et mon grand plus support. Une pensée spéciale pour ma belle-sœur, Cynthia. Merci à tous.

